



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**Cuantificación de la proteína Scleraxis en suero de
pacientes con enfermedades intersticiales de
pulmón como posible marcador de fibrosis**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

Presenta:

Gael Güitrón Castillo

Director de Tesis:

Dra. Ana Lilia Torres Machorro

Asesor Interno:

Dra. Elia Roldán Reyes



(Ciudad de México, Cd. Mx., 2017)



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.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Ana Lilia Torres Machorro en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) "Ismael Cosío Villegas".

El trabajo fue financiado con el donativo correspondiente al proyecto CONACYT 261961 titulado "Importancia del factor de transcripción Scleraxis en la patogénesis de enfermedades fibrosantes de pulmón, estudio para definir su utilidad pronóstica y diagnóstica" a cargo de la Dra. Criselda Mendoza Milla (Investigadora en Ciencias Médicas C, INER).

Este estudio fue apoyado con una beca de licenciatura CONACYT (Proyecto 261961).

Jurado:

- Presidente: Dra. María Elena Ayala Escobar
- Vocal: Dra. Ana Lilia Torres Machorro*
- Secretario: Dra. Elia Roldán Reyes
- Suplente: Dra. Lucila Álvarez Barrera
- Suplente: Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por brindarme la infraestructura y oportunidad de realizar el presente trabajo.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" por brindarme los recursos e infraestructura necesaria para realizar el presente trabajo.

A mi tutora la Dra. Ana Lilia Torres Machorro por todo el apoyo y las enseñanzas que me brindó durante todo este tiempo además de ser una excelente guía en el campo de la investigación.

A la Dra. Criselda Mendoza Milla por brindarme apoyo, enseñanzas y guiarme durante el desarrollo de mi trabajo.

Al Dr. Moisés Selman por brindarme el material y los recursos necesarios para un desarrollo satisfactorio de mi trabajo.

A la Dra. Tatiana Rodríguez por brindarme el apoyo con el material necesario para desarrollar mi trabajo.

A la Dra. Martha Montaña por brindarme el material y apoyo en la realización de mi tesis.

A la Dra. Ivette Buendía por el material y apoyo brindado durante el desarrollo de mi trabajo.

A los integrantes del Jurado por el tiempo dedicado no solo en la revisión y asesoramiento en mi tesis, sino también en la culminación de la misma.

Al personal que realizó tramites por el apoyo para facilitar los mismos en la culminación de mis estudios y mi tesis.

A CONACYT por brindarme el apoyo económico para poder desarrollar de manera satisfactoria mi tesis.

Índice

Resumen

Introducción

1

- 1. Sistema respiratorio 1
 - 1.1 Tipos celulares alveolares 4
- 2. Enfermedades intersticiales de pulmón 5
 - 2.1 Fibrosis 6
 - 2.2 Fibrosis pulmonar idiopática 6
 - 2.3 Neumonitis por hipersensibilidad 9
 - 2.4 Esclerosis sistémica 11
- 3. Modelo Animal 15
- 4. Scleraxis (Scx) 16

Justificación

16

Hipótesis

17

Objetivos

17

Métodos

17

Parte 1: Cuantificación de la concentración de Scx en suero de pacientes con enfermedades fibrosantes

23

1.1 Resultados

23

1.2 Discusión

31

Parte 2: Cuantificación de la concentración de Scx en suero sanguíneo de ratones con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina

35

2.1 Resultados

35

2.2 Discusión

42

Conclusiones generales

45

Apéndice

46

Bibliografía

47

Resumen

El sistema respiratorio humano proporciona oxígeno y elimina el dióxido de carbono circulante. Esto se lleva a cabo en los alveolos, pequeños sacos de aire que estructuran a los pulmones.

Dentro de las enfermedades que atañen a los pulmones se encuentran las enfermedades intersticiales de pulmón o ILDs por sus siglas en inglés (Interstitial Lung Disease), las cuales comprenden a un grupo de desórdenes caracterizados por una combinación de inflamación y fibrosis del parénquima pulmonar (acumulación excesiva de colágena). En el presente trabajo se estudiaron tres enfermedades fibrosantes: la Esclerosis Sistémica (ES), la Fibrosis pulmonar Idiopática (FPI) y la Neumonitis por hipersensibilidad (NH). Esto, con el objetivo de establecer si Scleraxis (Scx), un factor de transcripción implicado en la regulación de la síntesis de la colágena, podría usarse como marcador de fibrosis en suero de pacientes afectados con las enfermedades mencionadas.

Se utilizaron ensayos de ELISA para cuantificar Scx en suero, encontrando niveles incrementados de la proteína en pacientes con FPI y con ES. Al correlacionar los datos clínicos, en los casos de FPI, pacientes con capacidad pulmonar disminuida por espirometría mostraron los niveles más altos de Scx circulante. En los casos de ES, los pacientes con Scx alto en suero se encontraban en etapas avanzadas de la enfermedad. Lo anterior sugiere que Scx en suero es un marcador de la gravedad de fibrosis en pacientes con FPI y ES.

Adicionalmente, se implementó un modelo murino de fibrosis pulmonar con el fin de obtener un ambiente controlado de desarrollo de la enfermedad. En este caso, los ratones con fibrosis pulmonar, y con distintos niveles de progresión, no mostraron diferencias en los niveles de Scx en suero en comparación con los controles sanos.

Con base en los resultados con sueros humanos se sugiere que Scx es un marcador de fibrosis en pacientes con ES y FPI.

Introducción

1. Sistema respiratorio

El sistema respiratorio humano se subdivide en dos porciones mayores (conductora y respiratoria) y tiene como función proporcionar oxígeno (O₂) y eliminar el dióxido de carbono (CO₂) de las células del cuerpo^[1]. Para llevar a cabo este objetivo son necesarios cuatro fenómenos:

- Movimiento de aire hacia los pulmones y desde ellos (**respiración o ventilación**)
- Intercambio de O₂ del aire inspirado por el CO₂ de la sangre (**respiración externa**)
- Transporte de O₂ y CO₂ hacia las células y desde ellas (**transporte de gases**)
- Intercambio de CO₂ por O₂ en la cercanía de las células (**respiración interna**)

La ventilación y la respiración externa ocurren dentro de los confines del sistema respiratorio. El aparato circulatorio lleva a cabo el transporte de gases, y la respiración interna ocurre en los tejidos de todo el cuerpo^[1,2].

La porción conductora del sistema respiratorio, situada fuera y dentro de los pulmones, lleva el aire del medio externo a estos órganos. Está compuesta por la cavidad nasal, boca, nasofaringe, faringe, laringe, tráquea, bronquios, bronquios secundarios (bronquios laborales), bronquios terciarios (bronquios segmentarios), bronquiolos y bronquiolos terminales. Las estructuras anteriores no solo transportan el aire inspirado, sino que también lo filtran, humedecen y entibian antes que llegue a la porción respiratoria de los pulmones^[1].

La porción respiratoria del sistema, localizada al interior de los pulmones, tiene como función el intercambio real de O₂ por CO₂^[2]. Se compone de bronquiolos, conductos, sacos alveolares y alveolos (Fig. 1)^[1].

- *Estructura macroscópica de los pulmones*

El pulmón izquierdo se compone de dos lóbulos, mientras que el derecho se estructura de tres. Cada uno tiene una indentación en la parte interna por donde penetran los bronquios principales, las arterias bronquiolares y las arterias pulmonares. Las venas bronquiolares, las venas pulmonares y los vasos linfáticos salen del pulmón^[1].

- *Conducto alveolar, atrio y saco alveolar.*

Los *conductos alveolares* no tienen paredes propias, pues son simples disposiciones lineales de los alveolos. Un conducto alveolar que surge de un bronquiolo se ramifica y cada uno suele terminar en una evaginación ciega compuesta de dos o más grupos pequeños de alveolos y en la que cada racimo se conoce como *saco alveolar*. Estos últimos, se abren en un espacio común, el *atrio* (Fig. 2). El conducto alveolar está reforzado y estabilizado en parte por elementos de tejido conectivo delgado entre los alveolos, llamados tabiques intralveolares^[1].

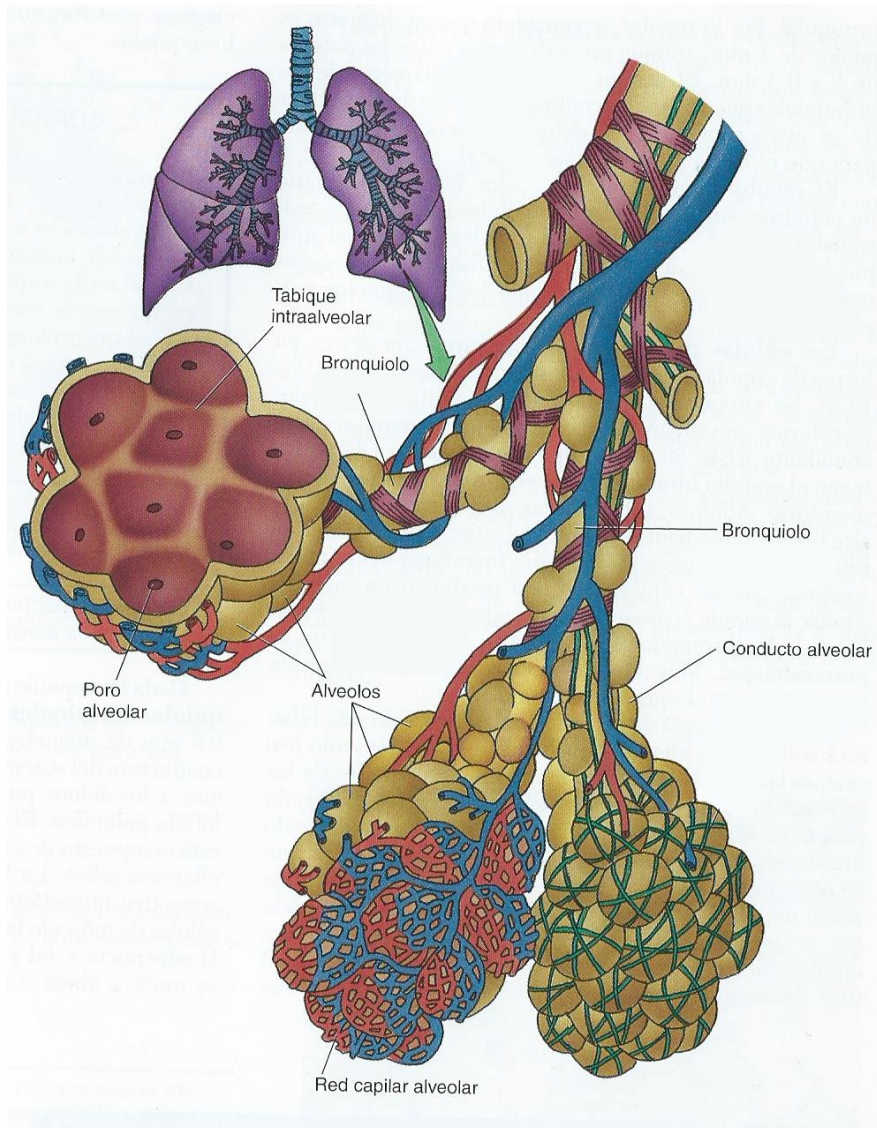


Fig. 1. Esquema del sistema respiratorio donde se muestra la porción respiratoria ^[tomada de 1].

- **Alveolos**

Los alveolos son pequeños sacos (200 μm de diámetro) compuestos de neumocitos tipo I muy atenuados y neumocitos tipo II más grandes, donde se lleva a cabo la respiración interna ^[1,2]. Cada alveolo es una evaginación pequeña de bronquiolos respiratorios, conducto y sacos alveolares. Estos forman la unidad estructural funcional primaria del sistema respiratorio, ya que sus paredes delgadas permiten el intercambio de CO_2 por O_2 entre el aire, su luz y capilares adyacentes ^[1]. Su cifra total se aproxima a 300 millones y le confiere al pulmón su consistencia similar a esponja. Se estima que el área total de superficie de todos los alveolos disponibles para el intercambio de gases excede a los 140 m^2 ^[1].

Debido a su gran número, suelen estar comprimidos entre sí, lo que elimina el intersticio de tejido conectivo entre ellos. En estas áreas de contacto, los espacios aéreos de los dos alveolos pueden comunicarse uno con el otro a través de un *poro alveolar (de Kohn)* (Fig. 3) ^[1].

Los alveolos y los capilares están compuestos de células epiteliales revestidas de una lámina basal prominente ^[1].

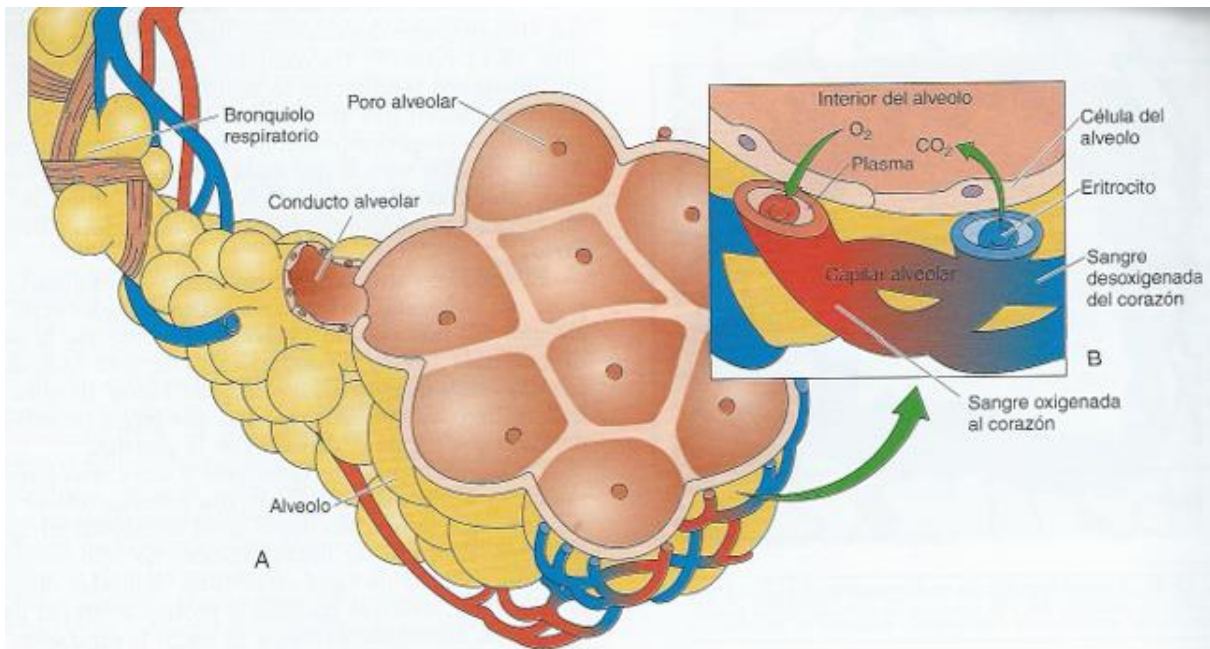


Fig. 2. (A) Bronquiolo respiratorio, saco alveolar, poro alveolar y alveolos. (B) Tabique intralveolar [tomada de 1].

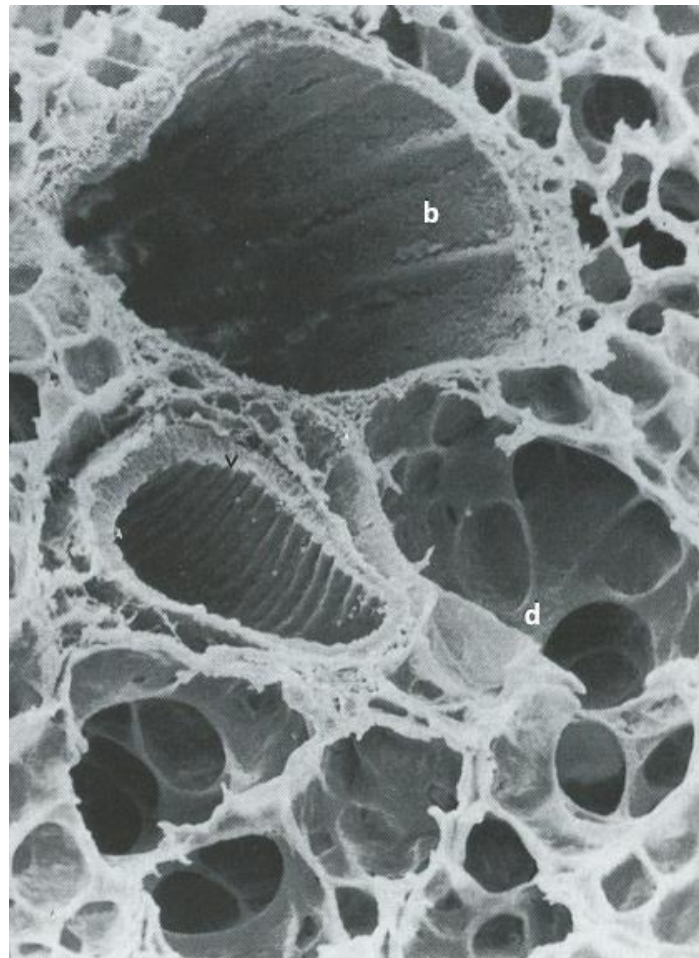


Fig. 3. Fotomicrografía de barrido de un pulmón de rata que muestra un bronquiolo (b), una arteria pequeña (v) y alveolos (d) que presentan poros alveolares [tomada de 1].

1.1 Tipos celulares alveolares

- *Neumocitos tipo I*

Alrededor del 95% de la superficie alveolar se integra con epitelio escamoso simple, cuyas células se conocen como neumocitos tipo I. Dado que las células de este epitelio están sumamente atenuadas, su citoplasma es delgado (80nm), mientras que la región del núcleo es más ancha y contiene gran parte de la población de organelos de la célula. La superficie adluminal de estas células posee un recubrimiento de una lámina basal bien desarrollada, que se extiende hasta el reborde de los poros alveolares ^[1].

- *Neumocitos tipo II*

Aunque los neumocitos tipo II son más numerosos que los neumocitos tipo I, ocupan sólo alrededor del 5% de la superficie alveolar. Estas células cuboides están entremezcladas entre los neumocitos tipo I y se localizan habitualmente en regiones en las que están separados alveolos adyacentes por un tabique y su superficie adluminal se recubre con lámina basal ^[1].

Tienen un núcleo central, retículo endoplásmico rugoso (RER) abundante, aparato de Golgi y mitocondrias. La característica distintiva de estas células es la presencia de cuerpos laminares unidos a las membranas que contienen agente tensoactivo pulmonar (*Fig. 4*), el producto secretorio de estas células ^[1].

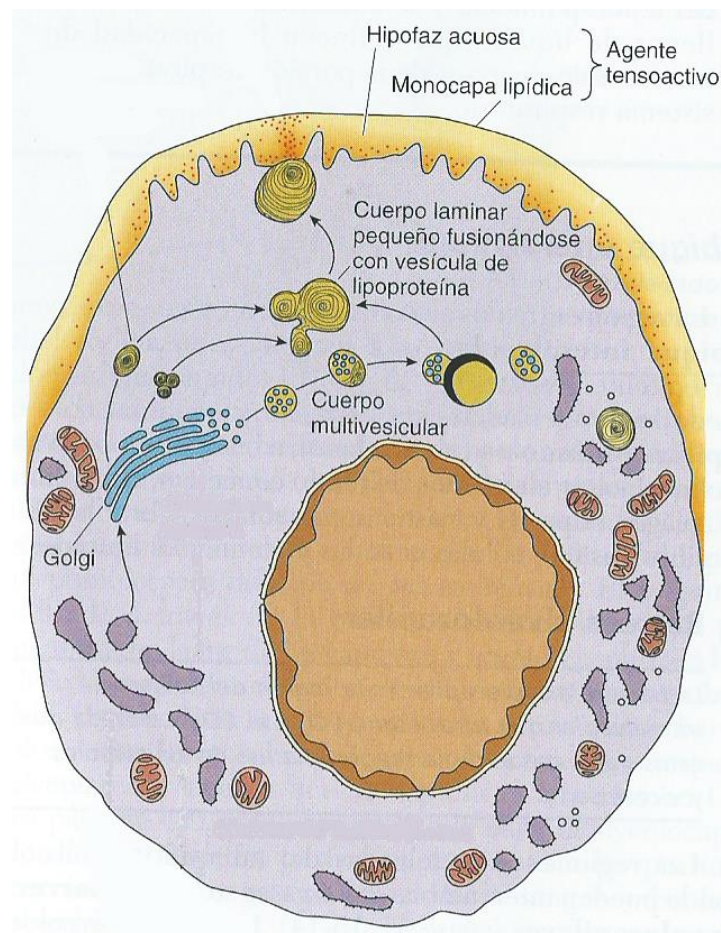


Fig. 4. Esquema de un neumocito tipo II ^[Tomado de 1].

El agente tensoactivo pulmonar se sintetiza en el RER y está compuesto principalmente de dos fosfolípidos y cuatro proteínas únicas, se modifica en el aparato de Golgi y se libera a vesículas secretoras, conocidas como cuerpos compuestos. Este agente se libera por exocitosis y forma una red conocida como mielina tubular (*Fig. 4*).

La función de dicho agente es reducir la tensión superficial e impedir así el colapso de los alveolos. Es elaborado continuamente por los neumocitos tipo II ^[1]. Además de producir y fagocitar agente tensoactivo, los neumocitos tipo II se dividen por mitosis para regenerarse a sí mismos y también a los neumocitos tipo I ^[1].

- *Macrófagos alveolares*

Son las células encargadas de fagocitar material particulado, como polvo y bacterias, para generar un ambiente estéril para los pulmones. Además, ayudan a los neumocitos tipo II en la captación de agente tensoactivo ^[1,2].

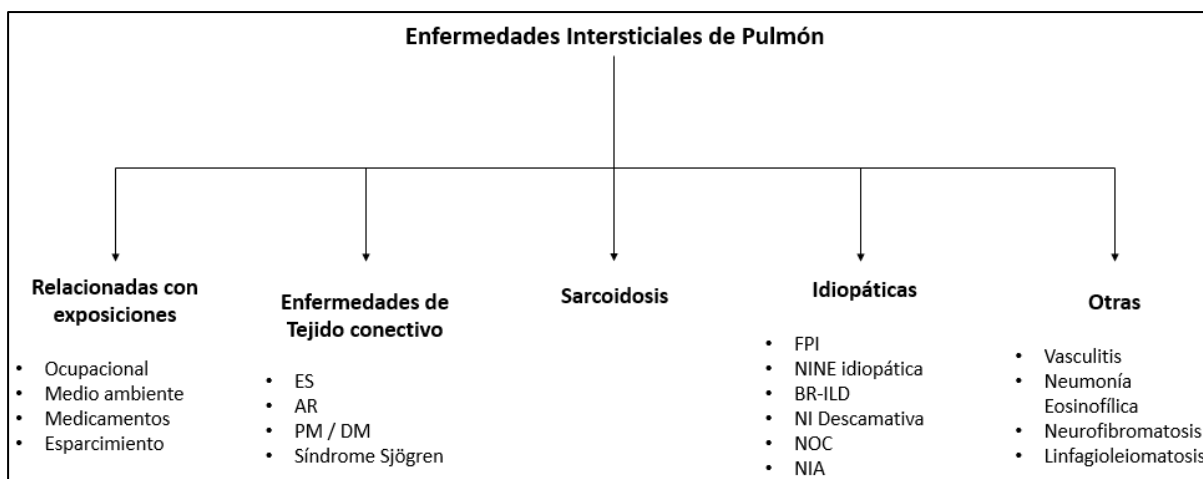
- *Intercambio de gases entre los tejidos y pulmones*

En los pulmones se intercambia O₂ por CO₂ trasladado por la sangre; en los tejidos del cuerpo se intercambia CO₂ por O₂ transportado por la sangre. El oxígeno se difunde a través de la barrera alveolocapilar y se une a la porción *hem* de la hemoglobina del eritrocito, formando oxihemoglobina. Por su parte, el CO₂ sale de la sangre, se difunde a través de la barrera alveolocapilar y sale de los espacios alveolares a medida que se expulsa el aire rico en CO₂. El intercambio gaseoso se debe a la difusión pasiva en respuesta a las presiones parciales de los gases dentro de la sangre y en las luces alveolares ^[1,2].

2. Enfermedades Intersticiales de pulmón (ILDs)

Las enfermedades intersticiales de pulmón (ILD) por sus siglas en inglés (“Interstitial Lung Disease”), son un grupo diverso de desórdenes que se caracterizan por una combinación de inflamación y fibrosis del parénquima pulmonar. Las ILDs actualmente se clasifican con base en características clínicas, radiológica, fisiológica, y/o manifestaciones patológicas, todas ellas, basadas en una clasificación que sienta sus bases en un diagnóstico multidisciplinario ^[3].

Las ILDs han sido categorizadas en diferentes subtipos (*Cuadro 1*), entre los que se encuentran las enfermedades relacionadas con exposiciones ambientales (ej. neumonitis por hipersensibilidad (NH), neumoconiosis), las enfermedades de tejido conectivo (ej. Esclerosis Sistémica (ES), Artritis reumatoide), la sarcoidosis y las neumonías intersticiales idiopáticas (ej. Fibrosis Pulmonar Idiopática, FPI) ^[3,4,5].



Cuadro 1. Clasificación de ILDs: ES, Esclerosis Sistémica; AR, Artritis Reumatoide; PM/DM, Poliomiositis/Dermamiositis; FPI, Fibrosis Pulmonar Idiopática; NINE idiopática, Neumonía Intersticial No Específica idiopática; BR-ILD, Bronquiolitis Respiratoria asociada ILD; NI Descamativa, Neumonía Intersticial Descamativa, NOC, Neumonía Organizada Criptogénica; NIA, Neumonía Intersticial Aguda [tomada y traducida de 4].

2.1 Fibrosis

Se trata de una acumulación excesiva de matriz extracelular. Dicho proceso cicatriza y reemplaza de manera progresiva el tejido normal por tejido compacto y rígido. Este nuevo tejido se caracteriza por la presencia de proteínas como la colágena, α -actina de músculo liso y la resistencia apoptótica [5,6].

2.2 Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)

Es una neumonía intersticial de causas desconocidas, sin exposición crónica ocupacional o ambiental, ni evidencia clínica de enfermedades de tejido conectivo. Tampoco existe historial de radioterapia o tratamiento previo con medicamentos que puedan causar ILDs [3]. Se caracteriza por una alta acumulación de matriz extracelular en el intersticio pulmonar. Es crónica, progresiva, irreversible y usualmente mortal [6].

Se presenta mayormente en pacientes de entre 55 y 77 años de edad, está limitada a los pulmones y se le relaciona con una histopatología o radiología típica de una neumonía intersticial usual [6,7].

Aunque se llegó a creer que la FPI se debía a un proceso de inflamación crónica, actualmente hay evidencia que sugiere como causa una activación anormal de las células del epitelio alveolar. Se propone que micro-lesiones repetitivas en tejido susceptible podrían ser las causantes de la muerte de células epiteliales tipo I y II, lo que induciría a la acumulación de fibroblastos y miofibroblastos, que, a su vez, secretarán una cantidad excesiva de matriz extracelular, principalmente colágena, lo que resulta en una cicatrización excesiva que desencadena una posterior destrucción de la arquitectura pulmonar (Fig. 5) [6].

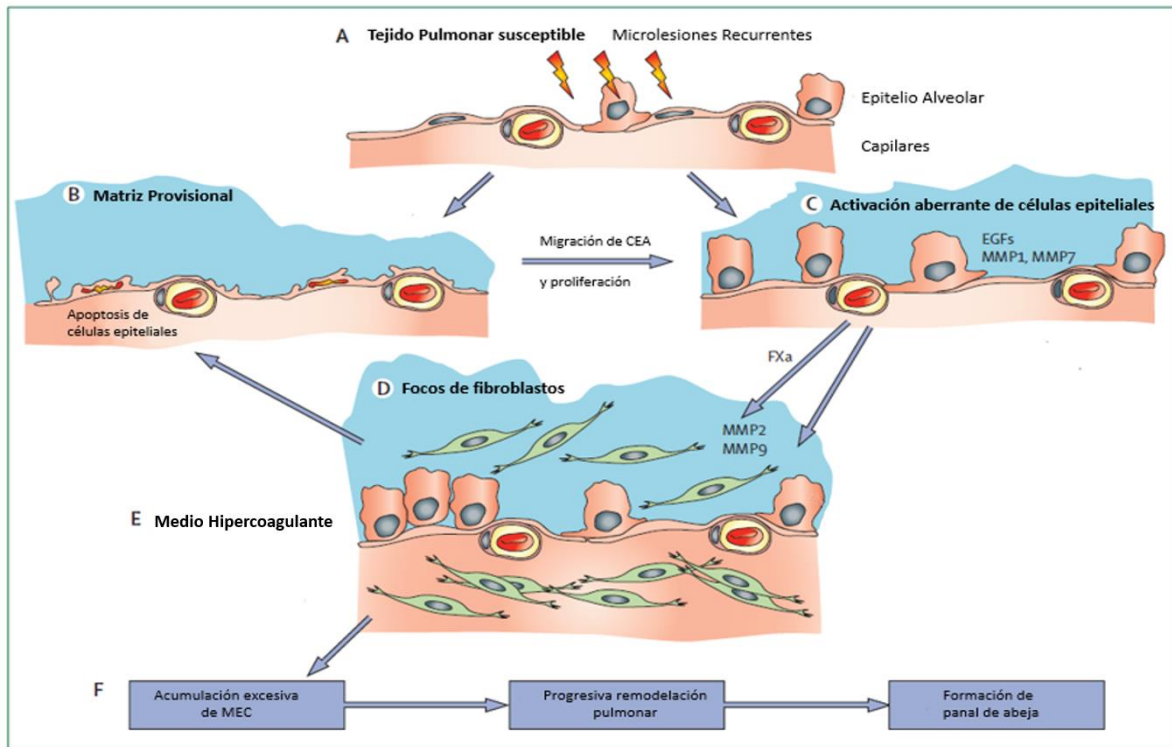


Fig. 5. Mecanismos propuestos en la patogénesis de FPI. (A) En el paso inicial, un pulmón susceptible, ya sea por cambios epigenéticos o una reducción anormal de los telómeros, es blanco de múltiples microlesiones debido al humo del cigarro, virus, entre otros. Esto provoca la muerte de células epiteliales tipo I y II. (B) El aumento de la permeabilidad vascular a proteínas causa la formación de una matriz provisional (wound clot). (C) Este proceso es seguido de una migración y proliferación de células del epitelio alveolar (CEA) en un esfuerzo fallido de reparar el pulmón (activación aberrante de células epiteliales). Las metaloproteasas MMP1 y MMP7 contribuyen a la migración de células epiteliales. En este microambiente, las células epiteliales se activan de manera anormal produciendo diversos factores de crecimiento y quimiocinas que inducen la migración de fibroblastos residentes y fibrocitos a los sitios donde ocurrieron las microlesiones. Adicionalmente se activa TGF β 1, que promueve la transición epitelio mesénquima (TEM) y la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. (D) Dichas células participan en la formación de focos de fibroblastos y miofibroblastos. (E) Se estructura un medio hipercoagulante que evita la degradación de la matriz provisional, propiciando un medio fibrótico. (F) Los miofibroblastos secretan una cantidad excesiva de proteínas de la matriz extracelular (MEC), principalmente de fibras de colágena. En esta remodelación anormal del pulmón las acumulaciones de cicatrices, junto con la desapropiada secreción de enzimas, pueden provocar la formación de lo que se conoce como pulmón de panal de abeja a nivel macroscópico [tomada y traducida de 6].

La progresión de la FPI se define de acuerdo al desarrollo de la enfermedad a lo largo del tiempo y se clasifica en: estable o lento (con episodios de estabilidad y deterioro) y deterioro agudo o rápido (Fig. 6).

- **Epidemiología**

Debido al envejecimiento progresivo de la población mundial, la incidencia anual de la enfermedad va en aumento, estimándose que la padecerán entre 4.6 y 16.3 personas por cada 100,000, mientras que la prevalencia de la misma es de 13 a 20 casos por cada 100,000. La FPI es más común en hombres que en mujeres (1.5-1.7:1) y el riesgo de desarrollarla incrementa con la edad [6].

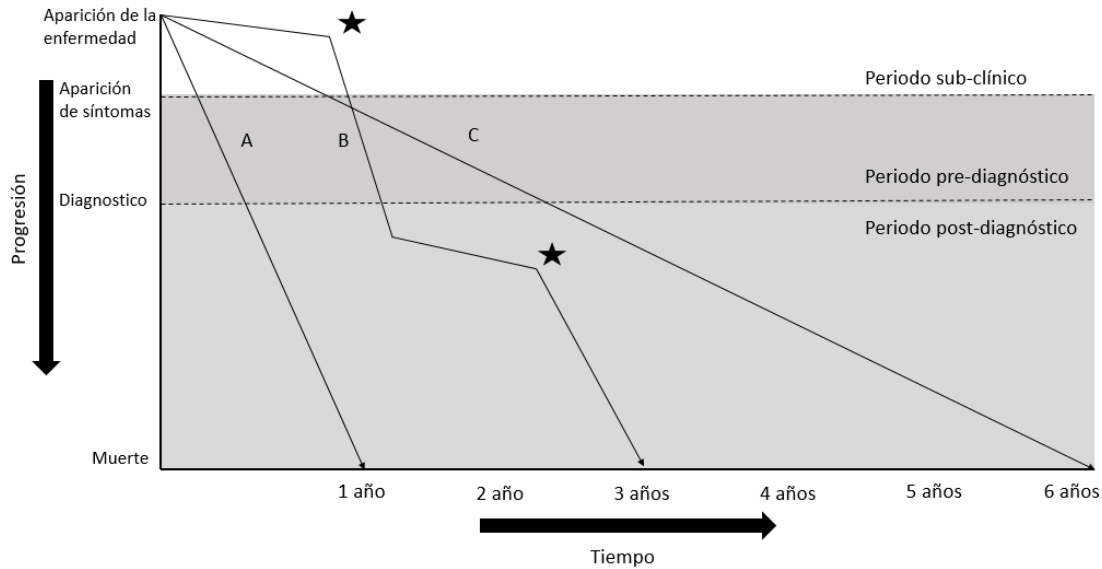


Fig. 6. Representación esquemática de los subtipos de FPI.

Como se indica en la figura, la progresión puede tener un avance acelerado (A), ser relativamente estable (B o C) o bien, alternar entre episodios de estabilidad y empeoramiento agudo (estrellas) (B) [Tomada y traducida de 7].

- **Factores de riesgo**

El hábito de fumar y la exposición a polvo de diversas fuentes se destacan como los principales factores de riesgo para desarrollar FPI. Sin embargo, la diabetes, obesidad, reflujo gastrointestinal, hipertensión pulmonar, apnea del sueño y enfisemas también se consideran factores de riesgo [6]. El hábito de fumar puede estar asociado con un 58-60% de incremento en el riesgo de desarrollar FPI [7]. Asimismo, Taskar et. al, determinaron que un 49% de los casos de FPI podría ser prevenido mediante la eliminación del hábito de fumar [8].

- **Patogénesis y tratamiento**

La mayoría de las enfermedades intersticiales de pulmón tienen un fuerte componente inflamatorio. Sin embargo, el caso de FPI se trata de una condición diferente al asociarse con procesos de activación anormal de fibroblastos y con una mala regulación de mecanismos de inmunidad adaptativa. Por ello, se cree que existen al menos dos rutas celulares para el desarrollo de FPI: la vía epitelial y la vía inflamatoria [9].

La primera de ellas desencadenada por una reparación inefectiva del epitelio alveolar dañado, resultado de la presencia de células epiteliales anormales resistentes a apoptosis [10]. La segunda es desencadenada por lesiones recurrentes en el tejido pulmonar, dando como resultado acumulación de células pro-inflamatorias [9].

Los tratamientos para la FPI con antioxidantes, prednisona y células madre han sido infructuosos. La Sociedad Americana de Tórax (ATS) sólo recomienda la terapia con oxígeno a largo plazo en casos de hipoxemia en reposo mientras que el trasplante de pulmón es el único tratamiento que prolonga la supervivencia del paciente de manera considerable [7,11].

2.3 Neumonitis por Hipersensibilidad (NH)

También conocida como alveolitis alérgica extrínseca, representa un grupo de enfermedades resultantes de la exposición inhalatoria a diversas partículas que en individuos susceptibles puede ocasionar una reacción inmunopatológica de vías respiratorias o del parénquima pulmonar.

Puede presentarse en diversas formas clínicas (aguda, sub-aguda o crónica) que dependen de la naturaleza de la partícula, del tiempo y la frecuencia de exposición al antígeno ^[4,12].

- *NH aguda y sub-aguda*

NH aguda: Ocurre generalmente entre 4 y 8 horas después de una exposición intensa e intermitente con el antígeno. Los síntomas aparecen de manera abrupta e incluyen fiebre, escalofríos, sensación de opresión en el pecho, disnea y tos seca, muy similares a una gripa o una neumonía atípica y gradualmente disminuyen los días posteriores a la exposición. Sin embargo, pueden reaparecer con una nueva inhalación del antígeno causante ^[13].

NH sub-aguda: Se desarrolla de forma similar a la NH aguda, pero con síntomas menos severos, los cuales suelen ocurrir semanas o meses después de la exposición al antígeno ^[13].

- *NH crónica*

Puede desarrollarse de 2 maneras distintas. La primera debido a una exposición a largo plazo, la cual es continua y donde los niveles del antígeno no son elevados. En estos casos el principal síntoma suele ser una disnea lenta y progresiva, aunque en algunos casos no se presenta ningún síntoma. Este padecimiento puede ser erróneamente diagnosticado como una fibrosis pulmonar idiopática o algún desorden fibrótico pulmonar avanzado si no se realizan pruebas específicas y cuidadosas ^[13].

La segunda manera de desarrollar NH crónica es debido a la ausencia de diagnóstico de episodios recurrentes de NH aguda o sub-aguda, lo cual, con el tiempo, puede llegar a convertirse en fibrosis pulmonar o en un enfisema (acumulación patológica de aire en los tejidos o en los órganos del cuerpo), aunque las razones para esto son poco claras ^[13,14].

- *Antígenos responsables*

Existe un amplio espectro de antígenos causantes que incluyen proteínas de mamíferos o aves, hongos, bacterias e incluso compuestos químicos de bajo peso molecular (isocianatos y anhídridos de ácidos) ^[13,15].

Entre los microorganismos, los actinomicetos termofílicos son responsables del cuadro prototipo de la enfermedad conocida como pulmón de granjero, sin embargo, casi cualquier hongo acumulado en paredes, zonas húmedas y aire acondicionado pueden ocasionar la enfermedad ^[16].

Entre las proteínas animales, una de las formas más frecuentes en la NH es producida por glicoproteínas provenientes de las aves, sin embargo, proteínas provenientes de ratón y gusanos de seda también se han descrito como agentes causantes ^[17].

La exposición a los antígenos tiene lugar en una gran variedad de trabajos y aficiones, e incluso puede suceder de forma involuntaria. A pesar de ello, la mayoría de los pacientes con NH se agrupan en un pequeño espectro de profesiones que se caracterizan por el contacto continuo con lugares propicios para el crecimiento de hongos (granjeros y agricultores) ^[16,17].

- *Ejemplos clásicos de NH*

Pulmón de granjero: Debido a la exposición repetida a altas concentraciones de antígenos provenientes de heno mohoso o bien de paja. También puede ser causada por una exposición prolongada a bajas concentraciones de los mismos antígenos. El riesgo de desarrollar NH es mucho más alto cuando las condiciones ambientales favorecen humedad excesiva en la paja o el heno ^[13,18].

A pesar de que la fibrosis puede ocurrir en pacientes con pulmón de granjero, la obstrucción de las vías aéreas y enfisema parecen ser las consecuencias más comunes. Finalmente, aunque algunos estudios reportan que fumar incrementa el riesgo de enfisema en pacientes con pulmón de granjero, se ha reportado también que dicho hábito puede estar asociado a una respuesta fibrótica ^[13].

Relacionada con aves: Probablemente la más común sea debido a la exposición a excreciones (dispersas en el polvo, después de secarse) de palomas, periquitos o canarios en los hogares. Este llamado antígeno aviar, es una mezcla compleja de antígenos que provoca sensibilidad en algunos pacientes. La fibrosis intersticial es la consecuencia frecuente ^[13,14].

- *Patogénesis*

La NH es una enfermedad causada por antígenos inhalados que inducen el desarrollo de una respuesta inflamatoria linfocitaria en las vías aéreas. Los antígenos deben de poseer cierto tamaño y solubilidad que faciliten la inducción de NH a través de una respuesta inmunológica e inflamatoria inespecífica ^[15].

La respuesta inmunológica se caracteriza por la proliferación de linfocitos citotóxicos CD8+ y la producción de anticuerpos específicos, luego de que los antígenos inhalados han sido procesados por macrófagos. La existencia de una respuesta inflamatoria inespecífica parece ser el factor que precipita el desarrollo de NH en individuos sanos pero sensibilizados ^[17,18].

- *Histopatología*

La histología de NH aguda se caracteriza por la infiltración de neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos a los espacios alveolares, que pueden contener exudados amorfos de proteína, edemas o hemorragia. Por el contrario, la histología de NH sub-aguda y NH crónica es una neumonitis granulomatosa intersticial (*Fig. 7*). La fase crónica es caracterizada por grados variables de fibrosis intersticial ^[11,14,15].

Una neumonía intersticial es principalmente mononuclear, compuesta de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Los granulomas varían dependiendo del tipo de NH. Por ejemplo, en el “pulmón de cuidador de aves” los granulomas suelen ser pequeños, pobremente diferenciados y laxos ^[13].

Los cambios bronquiolares varían de acuerdo al tipo de NH: En pulmón de granjero ha sido descrita la bronquiolitis proliferativa obliterante; por otro lado, en la enfermedad del cuidador de palomas se presenta una inflamación prebronquiolar, así como una fibrosis con hipertrofia de músculo blando y estrechamiento de las vías respiratorias ^[13].

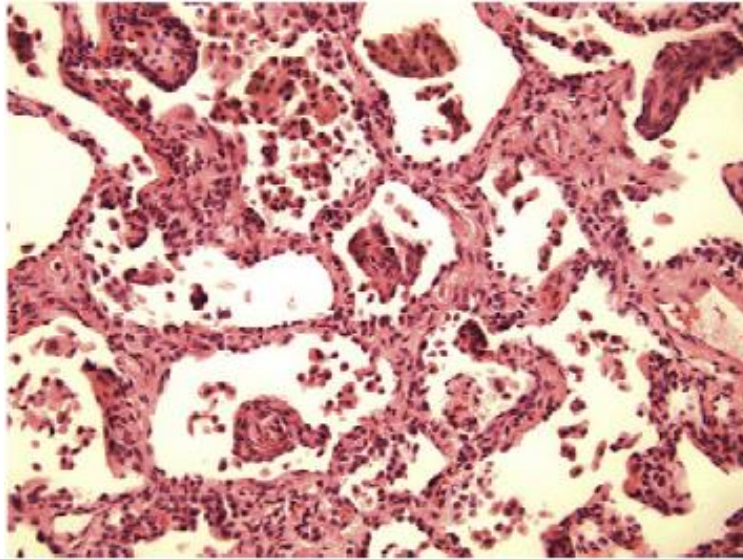


Fig. 7. Infiltración de linfocitos y lesiones granulomatosas intersticiales [tomada de 12]

- **Diagnóstico**

El criterio para diagnosticar NH requiere de un historial detallado del paciente, tanto de la ocupación como del lugar de residencia. Esto con el fin de conocer los antígenos a lo que podría estar expuesto ya sea de manera directa o indirecta ^[19].

La NH aguda se asemeja mucho a una infección en el tracto respiratorio, por lo que si no se realiza un historial adecuado será difícil distinguir dicho síndrome de otros padecimientos como infección respiratoria aguda, episodio de resfriado o neumonía atípica causada por un virus o agentes microbianos. En algunos tipos de NH, particularmente las presentadas por granjeros, el diagnóstico puede incluir síndrome de polvo tóxico orgánico, provocado por la exposición a endotoxinas bacterianas y hongos tóxicos del heno con moho ^[13,18].

En el caso de la NH sub-aguda y la NH crónica, ambas pueden asemejarse a alguna enfermedad intersticial de pulmón. La NH sub-aguda es similar a desórdenes pulmonares no granulomatosos, como neumonía intersticial linfoide o neumonía criptogénica organizada (bronquiolitis obliterante organizada). La NH crónica puede ser confundida con la fibrosis pulmonar idiopática. Por lo mismo, la biopsia de pulmón puede ser requerida para hacer un diagnóstico preciso ^[13].

- **Conexión con Fibrosis**

Muchos pacientes con episodios repetidos sub-agudos o con incidencia crónica desarrollan fibrosis intersticial y eventualmente, en fases finales, pueden presentar características pulmonares similares a una neumonía intersticial ^[13].

2.4 Esclerosis Sistémica (ES)

Es una enfermedad autoinmune compleja que se caracteriza por trastornos vasculares con engrosamiento y fibrosis de la piel y otros órganos, incluyendo intestino, pulmón, corazón, riñón, articulaciones y músculos ^[20,21].

La patogénesis se caracteriza por daño micro-vascular, falta de regulación tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa y fibrosis generalizada en múltiples órganos, lo que resulta en la cicatrización irreversible y posterior falla de los órganos ^[20,22].

En el año de 1980 fueron propuestos algunos criterios para clasificación de ES, con el fin de distinguirla de otras enfermedades de tejido conectivo (ETC) por el Grupo Cooperativo de Criterios de Esclerodermia (GCCE) de la Asociación Americana de Reumatismo (AAR). El principal criterio que distinguió los casos de ES de pacientes con otras ETC fue el engrosamiento cutáneo que es muy poco común en otras ETC. Asimismo, se sugirieron criterios como esclerodactilia, fibrosis pulmonar y la caracterización del perfil de auto-anticuerpos del paciente ^[21,23]. Se han identificado un total de 9 anticuerpos séricos asociados a ES, entre los cuales destacan el anticuerpo anticentrómero y el anti-topoisomerasa I. Se sospecha que dichos anticuerpos son detectables mucho tiempo antes de que se presenten manifestaciones clínicas ^[24].

- *Clasificación clínica y de laboratorio*

Con base en las manifestaciones clínicas, perfiles de auto-anticuerpos y respuesta a los tratamientos, se ha agrupado a los pacientes de ES en 4 tipos principales ^[20,21]:

-Esclerosis Sistémica limitada (ESI): El paciente presenta auto-anticuerpos que reconocen proteínas de centrómero. La fibrosis se restringe a dedos, extremidades distales y a la cara. Generalmente el fenómeno Raynaud (vaso-espasmo de las arterias) precede a otras manifestaciones. En casos como estos, las enfermedades intersticiales de pulmón y la crisis renal son poco comunes ^[20,21].

-Esclerosis Sistémica difusa (ESd): Se presentan auto-anticuerpos que reconocen a topoisomerasa I y a la RNA polimerasa III. Se afectan el tronco y las extremidades proximales, además de las extremidades distales. En contraste con la limitada, la progresión es rápida, presentando complicaciones fibrosantes pulmonares, cardíacas y/o renales ^[20,21].

-Esclerosis Sistemática *sine* esclerodermia: No se observan cambios en la piel, sin embargo, se observa el fenómeno de Raynaud e hipertensión arterial pulmonar ^[20,21].

-Síndrome Sobrelapado: Se presenta en conjunto con otras enfermedades autoinmunes ^[20,21].

Los subtipos clínicos más aceptados en términos de afección cutánea para ES son ES difusa (ESd) y ES limitada (ESI) cada una con características clínicas definidas (*Cuadro 2*), las cuales se ven mejor reflejadas si se dividen en estadios temprano y tardío (*Fig. 8*) ^[22].

Cuadro 2: Subtipos de esclerosis sistémica ^[tomada de 21 y actualizado con 20].

| |
|---|
| <p>Esclerosis Sistémica difusa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inicio del fenómeno de Raynaud dentro del primer año de inicio de los cambios cutáneos • Alteración cutánea de tronco y regiones acrales • Presencia de frotos tendinosos • Incidencia significativa y aparición temprana de enfermedad pulmonar intersticial, insuficiencia renal, enfermedad gastrointestinal y compromiso de miocardio • Ausencia de anticuerpo anticentrómero • Dilatación y destrucción de capilares del lecho ungueal • Anticuerpos antitopoisomerasa |
| <p>Esclerosis Sistémica limitada</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fenómeno de Raynaud por años • Alteración cutánea limitada a manos, cara, pies y antebrazos • Tardíamente hay incidencia de hipertensión arterial pulmonar, con o sin enfermedad intersticial pulmonar, neuralgia de trigémino, calcinosis y telangiectasias • Asas capilares del lecho ungueal dilatadas, usualmente sin pérdida de capilares |

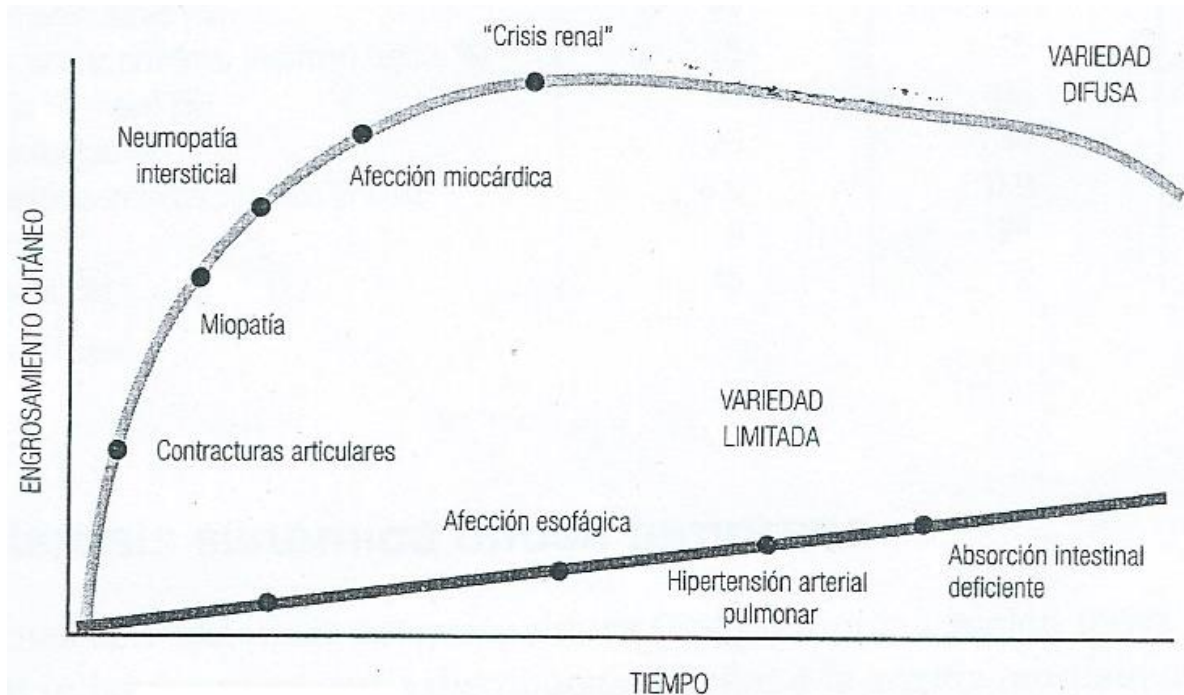


Fig. 8. Representación de los estadios de ES difusa y limitada a lo largo del tiempo, incluyendo las relaciones típicas entre engrosamiento cutáneo y compromiso de órganos internos. Se entiende como variante temprana de 0-5 años luego de la aparición del primer síntoma, y tardía una vez transcurridos 5 años. [tomada de 22].

- *ES limitada temprana*

Comúnmente la primera manifestación es la aparición del fenómeno de Raynaud, el cual suele presentarse cinco o más años antes de la aparición de edemas en los dedos o reflujo leve. El engrosamiento cutáneo afecta solo los dedos y en algunos pacientes, el dorso de las manos. Es poco común que haya síntomas generales (fatiga, pérdida de peso) o poliartralgias [21].

Respecto a la alteración de órganos internos, sólo es frecuente la dismotilidad esofágica durante los primeros cinco años de la ESl. La fibrosis pulmonar es poco común, igual que la enfermedad miocárdica y la crisis renal [21].

- *ES limitada tardía*

En esta etapa no hay progresión del engrosamiento cutáneo, pero hay incremento estable en la proporción de pacientes con telangiectasias y calcinosis. La complicación más seria es el desarrollo de hipertensión arterial pulmonar, mientras que el síntoma más frecuente es la disnea [21].

- *ES difusa temprana*

Los pacientes suelen tener fatiga, poliartralgias inflamatorias, ocasionalmente verdadera poliartritis, y síndrome del túnel del carpo. El fenómeno de Raynaud suele preceder a los síntomas articulares por varias semanas o meses. También puede aparecer simultáneamente [21].

La progresión del engrosamiento cutáneo en la ESd es rápida, avanzando desde las manos hasta los antebrazos. Posteriormente avanza hacia el torso. En el caso de las extremidades inferiores, ocurre algo parecido pero el daño suele ser menos grave [21].

La crisis renal por esclerodermia se asocia con presencia de anticuerpos anti-RNA polimerasa III. La fibrosis pulmonar está relacionada con auto-anticuerpos anti-topoisomerasa I y anti-ribnucleoproteínas U11/U12 [21].

- *ES difusa tardía*

La transición de ESd temprana a tardía ocurre después de que el engrosamiento cutáneo ha alcanzado su pico (porcentaje de engrosamiento cutáneo máximo) y ha comenzado a regresar. Este pico ocurre típicamente de 12 a 15 meses después del inicio de la enfermedad. La disminución del engrosamiento cutáneo es casi universal en las fases tardías de la enfermedad. Dicha mejoría cutánea suele empezar por las áreas afectadas más recientemente como el tórax y el abdomen. El puntaje para la piel modificado de Rodnan, mRSS por sus siglas en inglés (modified Rodnan Skin Score) es una medición del engrosamiento cutáneo [25] y suele ser menor a 10. El fenómeno de Raynaud es menos frecuente y la fatiga, artritis y frotos tendinosos desaparecen haciendo que los pacientes recuperen funcionalidad. Sin embargo, las contracturas articulares en dedos y carpos, que aparecen en fases tempranas, persisten en la mayoría de los casos [21].

Aunque es inusual que aparezca nuevo daño visceral después del pico del engrosamiento cutáneo, el proceso fibrótico tiende a continuar progresando en la ESd tardía. La fibrosis pulmonar puede empeorar e incluso complicarse con hipertensión arterial pulmonar [21].

Dentro de las afecciones observadas en ES se encuentran:

- *Afección cutánea*

Característica distintiva de la enfermedad, típicamente se describe en tres fases, una inicial (edematosa), una clásica (esclerótica) y una tardía (atrófica). La velocidad de progresión en la afección cutánea dependerá del subtipo de ES que se presente: lenta para ESi y rápida para ESd [26].

- Fase Inicial: La piel es tensa, con edema difuso e indoloro, y pueden aparecer cambios de coloración.
- Fase Clásica: Se presenta engrosamiento duro de la dermis con pérdida de los pliegues cutáneos y anexos, apareciendo contractura de los dedos y disminución de la apertura bucal y cambio de coloración de la piel.
- Fase Tardía: La piel recobra movilidad, aunque se mantiene atrófica y suelen aparecer otras complicaciones, como úlceras digitales, telangiectasias y calcinosis.

- *Fenómeno de Raynaud*

Es una manifestación vascular casi universal de la enfermedad que habitualmente se presenta al inicio de la sintomatología. Se caracteriza por ser un trastorno isquémico episódico en los dedos de las manos y los pies, manifestado por palidez, cianosis y rubor de la piel en respuesta a estímulos como frío y estrés emocional [27].

- *Afección Gastrointestinal*

El tracto gastrointestinal se afecta hasta en 90% de los casos de ES. De los segmentos del mismo, el esófago es el principal, seguido del ano-recto, estómago, colon e intestino delgado. Aunque las manifestaciones clínicas son diversas y de grado variable, el reflujo gastroesofágico y la disfagia son las más comunes [28,29].

- *Afección Pulmonar*

Es una causa común de mortalidad que ocurre en ambas formas de ES. Las principales manifestaciones incluyen enfermedad del parénquima pulmonar (enfermedades intersticiales, neumonía y bronquiectasis) y enfermedad vascular pulmonar (hipertensión pulmonar tanto aislada como asociada con enfermedad intersticial, además de edemas pulmonares). La enfermedad intersticial pulmonar es el padecimiento pulmonar más frecuente en pacientes con ES ^[30].

- *Afección Cardíaca*

La ES puede afectar el pericardio, el miocardio, las arterias coronarias, el sistema de conducción, las válvulas cardíacas y las arterias periféricas. Las manifestaciones van desde dolor torácico y arritmias, hasta la insuficiencia cardíaca derecha. La fibrosis miocárdica en parches es la afección más común en la ES, sin embargo, también se presentan arritmias, alteraciones en la conducción, rigidez de arterias periféricas y afecciones secundarias al corazón (hipertensión arterial pulmonar y sistémica) ^[31].

- *Afección Renal*

Cerca del 50% de los casos de ES suelen reportar diversas formas de afecciones renales, siendo la proteinuria leve sin pérdida renal la más común. La crisis renal se presenta en 10-15% de los casos, principalmente en la forma difusa ^[32].

3. Modelo Animal

Los modelos animales tienen un papel muy importante en la investigación de enfermedades, incluyendo las pulmonares. Para estudiar la Fibrosis Pulmonar existen varios modelos que inducen fibrosis en ratones. El daño inicial puede ser generado por radiación, instilación con bleomicina, sílica o asbestos. También se utilizan ratones transgénicos o transferencia génica de citosinas pro-fibróticas. Sin embargo, el tratamiento más utilizado para la inducción de fibrosis en el modelo murino es la instilación intratraqueal de bleomicina ^[33].

- *Bleomicina*

Es un antibiótico quimioterapéutico producido por la bacteria "*Streptomyces verticillus*" ^[33]. Su uso en modelos animales de fibrosis pulmonar está basado en el hecho de que la fibrosis es el principal efecto colateral en la terapia para el cáncer con bleomicina en humanos ^[34]. Lo anterior sucede por el efecto de daño al DNA que tiene la bleomicina, lo que genera una respuesta inflamatoria en los pulmones, toxicidad, activación de fibroblastos y subsecuentemente fibrosis ^[35]. El efecto de este fármaco es dosis-dependiente ^[33].

- *Modelo animal de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina*

La instilación intratraqueal con bleomicina causa inflamación y reacciones pro-fibróticas en periodos cortos de tiempo (21-28 días) ^[35]. Existe una elevación inicial de citosinas pro-inflamatorias, seguida de un incremento en la expresión de marcadores pro-fibróticos, alcanzando su pico alrededor del día 14. La transición de la respuesta inflamatoria a la pro-fibrótica ocurre alrededor de 9 días después de la aplicación de bleomicina ^[35]. Dos a tres semanas después de la instilación se acumula la colágena en los pulmones ^[36]. Las características histológicas de la fibrosis pulmonar, como la incorporación de colágena y obliteración del espacio alveolar se encuentran presentes en el modelo animal de fibrosis por tratamiento con bleomicina y son similares a las de pacientes con FPI ^[33,36]. A diferencia de la fibrosis pulmonar en humanos, en roedores, la fibrosis causada por bleomicina es parcialmente reversible ^[37,38].

Existen varias cepas de ratón utilizadas en el modelo de bleomicina que muestran diferencias en la susceptibilidad al desarrollo de fibrosis. Las cepas C57BL/6 y CBA presentan una mejor respuesta a bleomicina en comparación con la cepa BALB/c que es relativamente resistente ^[39].

4. Scleraxis (Scx)

Es una proteína básica tipo hélice-giro-hélice (bHLH) que cuenta con un dominio de unión a DNA (Fig. 9) y perteneciente a una amplia familia de factores de transcripción que juegan un papel importante en el control de la diferenciación celular, proliferación y oncogénesis ^[40]. En concreto, Scx forma heterodímeros principalmente con las proteínas E12 y E47. Los cuales interactúan con secuencias de DNA "CANNTG" (donde "N" se refiere a cualquier nucleótido) conocidas como cajas E (E-box) que se localiza en los promotores de diversos genes, como los de colágena COL1 α 1 y COL1 α 2 ^[41,42].

Por otro lado, Scx se ha visto relacionada en la regulación de la expresión génica en células mesenquimales y condrogenicas durante la embriogénesis de ratón y en la formación de células de tendón ^[40,43].

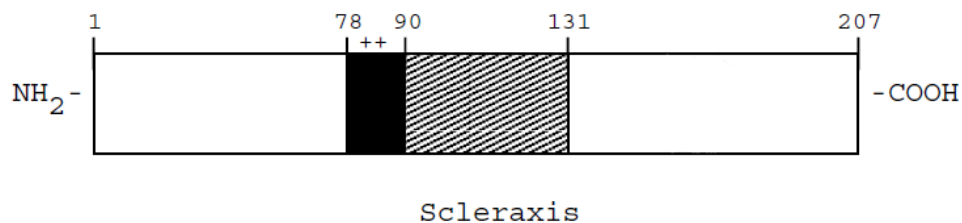


Fig. 9. Esquema de la proteína Scleraxis. La parte sombreada corresponde a la región bHLH de la proteína (78-131). La zona oscura indica la región básica de la proteína (78-90) ^[44].

Se ha demostrado que Scx puede regular la expresión de COL1 α 2 en fibroblastos cardiacos primaros y COL1 α 1 en tendones ^[40,45]. Estudios realizados por Bagchi y Czubryt utilizando genes reporteros con tres cajas E sugieren que Scx contribuye directamente a la expresión normal de colágena en fibroblastos cardiacos ^[46]. Por otro lado, la existencia de lesiones en el tejido cardiaco (infarto) desencadena la infiltración de células inflamatorias y una posterior remodelación de la matriz extracelular (MEC) formando una cicatriz. Cuando estos cambios se extienden más allá de la zona dañada, la fibrosis generalizada se desarrolla debido a la sobreexpresión de colágena mediada por Scx, ocasionando falla cardiaca ^[47].

Justificación

En condiciones normales el factor de transcripción Scx está implicado en el desarrollo de tejido rico en colágena como tendones y válvulas cardiacas ⁽³⁹⁾. También se ha implicado en la fibrosis cardiaca post-infarto. Este efecto pro-fibrosante en corazón se debe a una sobreactivación de Scx en miofibroblastos, los cuáles sintetizan una cantidad excesiva de colágena ^[42]. Scx es capaz de regular directamente la expresión de colágena I α 2 y I α 1.

Ensayos preliminares en nuestro laboratorio encontraron niveles altos de Scx en fibroblastos provenientes de pacientes con FPI en comparación con fibroblastos de sujetos sanos (Datos sin publicar, M. en C. Miguel Ramírez y Dra. Criselda Mendoza). De la misma forma, se encontró un incremento en los niveles proteicos de Scx en ratones con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en comparación con los controles (Datos sin publicar, Dra. Ana Lilia Torres). Por lo tanto, planteamos

que niveles altos de la proteína Scx en las condiciones anteriores podrían resultar en el aumento de los niveles de Scx en suero y que su presencia podría correlacionarse con el grado de fibrosis en los órganos afectados. Es por ello que en este trabajo estudiamos dos ILDs fibrosantes (FPI y NH) y una enfermedad autoinmune caracterizada por fibrosis generalizada (ES).

Hipótesis

Ya que Scleraxis regula la expresión de colágena y que la fibrosis se caracteriza en parte por la sobre-expresión de la misma, las concentraciones de Scleraxis medidas en suero proveniente de pacientes con enfermedades fibrosantes (FPI, NH y ES) y de ratones con FP inducida por bleomicina, se podrán correlacionar con el grado de fibrosis presente en cada caso.

Objetivos

1. Cuantificar la expresión de la proteína Scleraxis en suero de pacientes diagnosticados con Neumonitis por Hipersensibilidad, Esclerosis Sistémica y Fibrosis Pulmonar Idiopática.
2. Correlacionar el nivel de expresión de Scleraxis con los datos clínicos de los pacientes.
3. Establecer si Scleraxis podría ser un indicador de la presencia y/o gravedad de la enfermedad fibrosante de pulmón.
- 4.- Determinar la mejor técnica de instilación para establecer el modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.
- 5.- Corroborar la inducción de fibrosis pulmonar por bleomicina en ratones de la cepa C57BL/6 mediante un ensayo de cuantificación de hidroxiprolina e imágenes histológicas.
- 6.- Correlacionar los niveles de la proteína Scleraxis en suero de ratones con el grado de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina a distintos tiempos.

Métodos

Se analizaron muestras de suero sanguíneo mediante un ensayo ELISA de pacientes del INER con diagnóstico documentado de FPI ó NH según las guías de las siguientes asociaciones: “The American Thoracic Society” (ATS), “European Respiratory Society” (ERS), “The Japanese Respiratory Society” (JRS) y “The Latin America Thoracic Association” (ALAT). También se analizaron sueros de pacientes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) con diagnóstico documentado de ES (*Muestras donadas por la Dra. Tatiana Rodríguez de Reumatología*). Se estudiaron en total de 236 muestras: 56 controles, 125 pacientes con ES, 36 con FPI y 19 con NH.

Los pacientes incluidos en el protocolo fueron hombres y mujeres de 30 años de edad en adelante que previamente fueron diagnosticados con alguna de las enfermedades mencionadas, además de que no presentaron signos de enfermedad aguda (exacerbación aguda) en los 30 días anteriores a la primera visita, ni diagnóstico conocido de otros trastornos respiratorios (tuberculosis, sarcoidosis, aspergilosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica). Cada paciente aceptó participar en el estudio y firmó la carta de consentimiento correspondiente.

Los controles, fueron hombres y mujeres sanos mayores de 30 años, con consentimiento informado firmado, que no presentaran signos sugestivos de enfermedad respiratoria aguda o crónica, ni patrón obstructivo o sugerente de restricción pulmonar en el estudio espirométrico.

Las muestras de sangre de pacientes se recolectaron en tubos BD Serum Separator tube (SST) y se centrifugaron para obtener el suero. Alícuotas de 400 μ L se almacenaron a -80 $^{\circ}$ C hasta su uso.

- *Ensayo ELISA*

Se utilizó un kit para ensayo ELISA de (Cloud-Clone Corp SEN 330Hu), el cual incluye una la placa de 96 pozos cubierta previamente con un anticuerpo específico anti-SCXA de humano.

En los primeros 10 pozos se elaboró una curva patrón utilizando concentraciones conocidas de Scx además de un blanco. Las concentraciones de la curva fueron determinadas de acuerdo a las especificaciones del kit utilizado (*Fig. 10*).

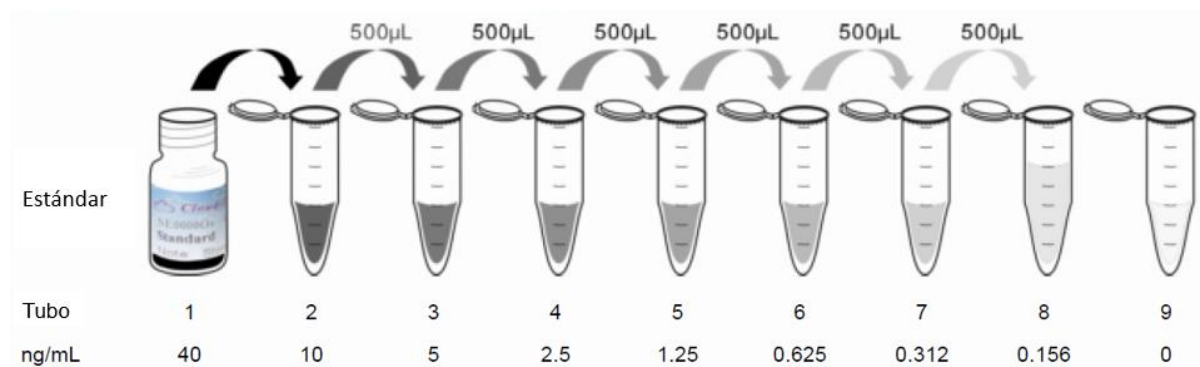


Fig. 10. Elaboración de la curva patrón utilizando concentraciones conocidas a partir de un estándar de Scx

En los pozos restantes se añadieron, por duplicado, 100 μ L de suero de pacientes con las enfermedades estudiadas. Se incubaron los sueros en la placa durante 1 hora a 37 $^{\circ}$ C. En este paso la proteína SCXA presente en el suero se reconoce por el anticuerpo que se encuentra en la placa. Como estándar se utilizaron 100 μ L de concentraciones conocidas de la proteína Scx recombinante. Posteriormente se removieron los sueros y se agregó un anticuerpo conjugado a biotina anti-SCXA. Este anticuerpo se incubó durante 1 hora a 37 $^{\circ}$ C.

El “sándwich” de anticuerpos fue reconocido por avidina conjugada para peroxidasa de rábano (HRP por sus siglas en inglés, “Horseradish Peroxidase”). Posteriormente se agregó Tetrametilbenzidina (TMB) que al ser procesado por la peroxidasa generó un producto de color azul. La concentración de este producto es proporcional a la cantidad de Scx presente en las muestras y en la curva estándar. Antes de medir la placa, la reacción es detenida con una solución ácida que genera un cambio de color de azul a amarillo. La absorbancia de la placa completa se midió en un lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

Utilizando las densidades ópticas (D.O) de la curva patrón y el blanco, se tabularon los datos con ayuda del programa Microsoft Excel para obtener una gráfica de correlación de la D.O. con la concentración de Scx (ng/mL) y la ecuación de la recta de la misma (*Fig. 12*)

| Scx (ng/mL) | D.O. |
|-------------|--------|
| 0 | 0 |
| 0.16 | 0.014 |
| 0.312 | 0.03 |
| 0.625 | 0.0495 |
| 1.25 | 0.132 |
| 2.5 | 0.282 |
| 5 | 1.037 |

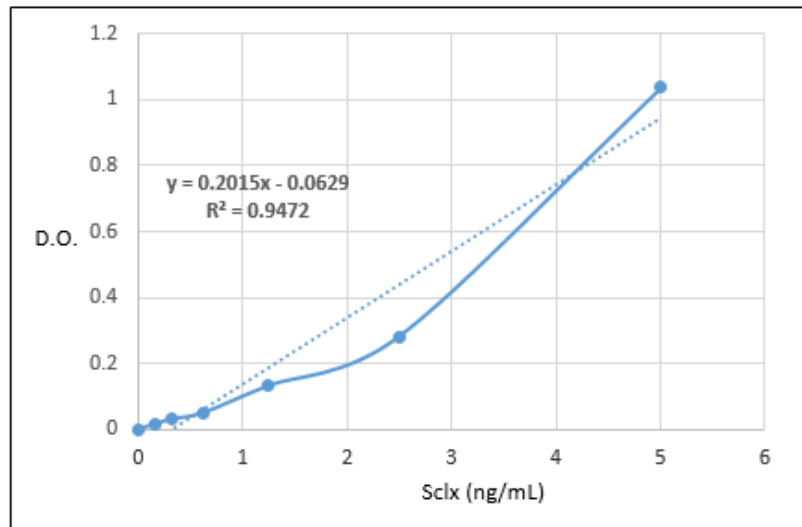


Fig. 11. Ejemplo de la gráfica de la correlación de D.O y Scx (ng/mL) para el ensayo ELISA obtenida mediante Microsoft Excel, donde se observa la ecuación de la recta y las concentraciones usadas para Scx. A pesar de que la curva patrón contemplaba un pozo de 10 (ng/mL), fue omitido al realizar los cálculos, con base en la ley Lambert-Beer, puesto que presentaba una D.O. mayor a 2.

Con la ecuación se determinaron las concentraciones de cada pozo con base en su D.O. Una vez obtenidos los valores correspondientes a cada muestra, se correlacionaron los niveles de Scx que revelaron los ensayos de ELISA con los datos clínicos de cada uno de los pacientes, incluyendo criterios como el hábito de fumar, género y presencia de enfermedades cardíacas o gastrointestinales. Asimismo, se correlacionaron datos de espirometría como la capacidad pulmonar total (CPT), o la capacidad vital forzada (CVF). Cada uno de los criterios fue elegido con base en su importancia y relación con la enfermedad.

También se utilizaron muestras de suero sanguíneo de 24 ratones de la cepa C57BL/6 con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (7mg/kg). Los ratones tratados con bleomicina fueron sacrificados 14, 21, 28 y 35 días posteriores a la instilación [33,39,48]. El suero sanguíneo fue obtenido mediante punción cardíaca (ventrículo derecho). La concentración de Scx en el suero sanguíneo de ratones se determinó mediante el ensayo ELISA de la misma forma descrita para el suero de humanos.

Posterior a la obtención del suero, se extrajo el bloque cardiopulmonar. El pulmón derecho fue fijado en formol 10% para obtener imágenes histológicas y el izquierdo se utilizó para realizar el ensayo de OH-Pro.

- *Instilación de bleomicina en el modelo de ratón.*

Con el fin de establecer el mejor método para instilar ratones con bleomicina se probaron 3 métodos usando tinta china (diluida 1:10) para visualizar su localización a nivel pulmonar.

Los métodos de instilación usados fueron el orofaríngeo con cánula, la instilación intra-traqueal por inyección (cirugía) y la instilación intranasal.

Para cada uno de los casos se utilizaron 2 ratones, los cuáles fueron previamente anestesiados con 0.4 mL de Avertin en concentración de 20 mg/ml mediante inyección intraperitoneal. Se utilizaron 40 µL de tinta china diluida 1:10 para instilar.

Posterior a la instilación, a cada ratón le fue suministrado intraperitonealmente 0.1 mL de pentobarbital sódico para sacrificarlos y proceder a la extracción del bloque cardiopulmonar.

A continuación, se indica a detalle la forma en que se realizó cada uno de los métodos de instilación:

Instilación intra-nasal: Se colocó el ratón anestesiado en posición decúbito supina con una inclinación de aproximadamente 45°. Con ayuda de una micropipeta se le administró tinta china por goteo directamente en una fosa nasal esperando a que el ratón respirara cada gota antes de agregar la siguiente.

Instilación orofaríngea con cánula: Se le colocaron 2 racks, pasando y fijando encima de ellos un hilo o resorte, el cuál funcionó como ancla para la boca del ratón. Se colocó al ratón anestesiado en posición decúbito ventral. Después se anclaron los dientes superiores al hilo, de tal forma que el cuerpo del ratón formara un arco cercano a 90°. Una vez en esa posición, con ayuda de unas pinzas se abrió la boca del ratón jalando la lengua ligeramente hacia afuera y hacia abajo. Esto deja paso libre a la cánula, previamente cargada con 40 µL de tinta china. Después se introduce cuidadosamente la cánula cargada en la tráquea del ratón. Se mantiene por aproximadamente 1 minuto en dicha posición hasta que el ratón aspire la carga de la cánula. Es importante señalar que si el ratón no se encuentra correctamente posicionado no aspirará la carga de la cánula ^[49*].

**Se realizaron modificaciones al método reportado en la bibliografía citada.*

En el caso de este método, se manejaron dos variantes, en la primera, una vez aspirada la carga de la cánula se procedía a dejar reposar el ratón para que pasara el efecto de la anestesia. Para la segunda variante, una vez aspirada la carga de la cánula, antes de dejar en reposo al ratón, se suministró una pequeña cantidad de aire (100 µL) utilizando una jeringa. Esto con la intención de promover una mejor distribución de la tinta en los pulmones.

Cuando se presentaban episodios de ahogamiento, se suministró aire por la nariz con ayuda de una jeringa de 5 mL y se masajé el pecho a la altura de los pulmones con el fin de evitar un posible paro respiratorio.

Instilación intra-traqueal por inyección (cirugía): Se colocó al ratón anestesiado en posición supina, anclando los dientes superiores a un hilo o resorte previamente fijado perpendicularmente a la tabla. Se hizo un sutil corte en la piel del cuello del ratón. Utilizando las pinzas se separaron las glándulas salivales. Después, se separaron los músculos que cubren la tráquea hasta poder sostener la tráquea con las pinzas sin ningún tejido cubriéndola. Posteriormente, con una jeringa de insulina se suministraron 40 µL de tinta china y una porción de aire de 50µL.

Cabe aclarar que, al ser una prueba de eficacia, en este último método, se sustituyó el corte en la piel del cuello, por un corte más amplio a la altura del pecho para asegurarnos que la tinta fuera correctamente inyectada en la tráquea.

Una vez finalizado cada uno de los procedimientos, se procedió al sacrificio del ratón para realizar la extracción del bloque cardio-pulmonar y documentar la tinción del pulmón con tinta china.

Recolección de muestras sanguíneas en ratón: A cada ratón se le administraron 0.085 mL de pentobarbital sódico para obtener una anestesia profunda. Se realizó un corte sagital a la altura del tórax para separar la piel. Posteriormente se tomó la apófisis xifoides con unas pinzas y con tijeras se cortó la cavidad torácica sobre el esternón.

Se utilizó un blefaróstato para separar las costillas y visualizar al corazón. Entonces se extrajo la sangre venosa del corazón mediante la técnica de punción cardiaca. Se utilizó una jeringa de 3 mL para picar el ventrículo derecho y succionar suavemente la sangre.

Al mismo tiempo se le suministraba aire al ratón con ayuda de una perilla de succión para evitar un paro respiratorio por la pérdida de presión pleural y el subsiguiente paro cardiaco. Es importante destacar la necesidad de que el corazón continúe latiendo durante la extracción de sangre para poder obtener al menos 500 μ L de sangre ^[50].

Purificación del suero de sangre da ratón obtenida mediante punción cardiaca: Se recolectaron las muestras de sangre (aproximadamente 500 μ L) obtenidas mediante punción cardiaca en tubos eppendorf de 1.5 mL. La sangre se dejó coagular durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 2000 xg. Se colecto el suero cuidando no resuspender ni aspirar el coágulo de sangre. Se utilizó una segunda centrifugación durante 5 minutos a 2000 xg para eliminar cualquier contaminación con glóbulos rojos. El suero obtenido de la sangre de ratón se almacenó a -80° C. Posteriormente se utilizó la técnica de ensayo ELISA para medir la concentración de Scx en suero de ratón.

- *Cuantificación de hidroxiprolina (OH-pro)*

Como método indirecto para comprobar un aumento en los niveles de colágena y de esta manera la posible aparición de fibrosis pulmonar inducida por la instilación con bleomicina, después de haberse obtenido el bloque cardiopulmonar de cada ratón, se cortó el pulmón izquierdo para utilizarlo en el ensayo. Cada pulmón izquierdo completo (un solo lóbulo) se colocó en tubos de vidrio y se dejó secar en un horno a 110° C durante 10 días. Posteriormente se trituro el tejido seco y se agregaron 750 μ L de HCl 6N. La hidrólisis de las proteínas se realizó a 110° C durante 18 horas con el fin de obtener aminoácidos libres.

Luego de una centrifugación de 5 minutos a 1200 r.p.m., la totalidad de los hidrolizados fue transferida a tubos eppendorf de 1.5 mL. Se ajustó nuevamente el volumen de las muestras a 750 μ L con HCl 6N, sobre todo en los tubos que perdieron volumen por evaporación. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 14,000 r.p.m. para después transferir 100 μ L de los sobrenadantes a tubos nuevos, evitando arrastrar partículas del tejido carbonizado.

Se elaboró una curva estándar de hidroxiprolina (*Tabla 1*), utilizando una solución estándar de trabajo de 0.1 μ g/ μ L, de la cual se colocaron 10 μ L de cada concentración indicada en la tabla por duplicado. Para esto se utilizaron los primeros 12 pozos de una placa de 96 pozos. En los 84 pozos restantes se colocaron 5 μ l de los hidrolizados libres de ceniza por duplicado.

Tabla 1. Concentraciones de la curva estándar para el ensayo de la medición de hidroxiprolina

| Std OH-Pro 0.1 μ g/ μ l | Agua (μ l) | OH-Pro (μ g totales) | OH-Pro (μ g pozo) |
|------------------------------------|--------------------|------------------------------|---------------------------|
| 0 | 100 | 0 | 0 |
| 10 | 90 | 1 | 0.1 |
| 20 | 80 | 2 | 0.2 |
| 40 | 60 | 4 | 0.4 |
| 60 | 40 | 6 | 0.6 |
| 80 | 20 | 8 | 0.8 |
| 100 | 0 | 10 | 1 |

Una vez colocadas todas las muestras en la placa de 96 pozos, se utilizó un “thermoblock” a 80° C para evaporar la totalidad del líquido. Posteriormente se agregaron 100 µL de Cloramina T (para 10 ml: 0.14g de Cloramina T, 8 mL de buffer de citratos pH 6, 1 mL de n-propanol y 1 mL de H₂O) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Pasados los 30 minutos se agregaron 100 µL de reactivo de Ehrlich (para 10 mL: 1.5g de para-dimetilaminobenzaldehido, 6.6 mL de n-propanol y 3.3 mL de ácido perclórico), se cubrió la placa con parafilm y se incubó durante 30 minutos a 65°C en baño maría. Finalizado el tiempo se leyó la placa en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. Se graficó la D.O. en comparación con los valores conocidos de OH-pro utilizando Excel. La ecuación de la gráfica se usó para calcular la concentración de OH-pro en cada una de las muestras.

- *Cortes Histológicos*

El pulmón derecho se perfundió con formol 10% y se incubó al menos dos días en formol. Después se incluyeron en parafina. Los cortes histológicos fueron realizados por el laboratorio de histología del INER, donde se tiñeron utilizando las siguientes técnicas: tricrómica de Masson y Hematoxilina-Eosina.

- *Análisis Estadístico*

Con ayuda del programa GraphPad Prism 7 versión 7.00 se graficaron los datos y se hizo el análisis estadístico utilizando la prueba de ANOVA de 1 vía, para saber si existía una diferencia entre las medias de nuestras poblaciones. También se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey que se utilizó para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de los grupos estudiados.

1. Cuantificación de la concentración de Scx en suero de pacientes con enfermedades fibrosantes.

Para estudiar la posible utilización de Scx como un marcador de fibrosis, se realizó un ensayo para medir su concentración en sangre, tanto de sujetos control como en pacientes con enfermedades fibrosantes (ES, FPI y NH). Esta cuantificación se basa en que la acumulación de colágena caracteriza a los procesos fibrosantes y que Scx es un regulador de la expresión de colágena.

1.1 Resultados

Con el fin de conocer la concentración de Scx circulante en suero, se realizó un ensayo de ELISA tipo “sándwich” que reconoce a la proteína blanco mediante 2 anticuerpos anti-Scx. El primero se encuentra previamente unido a la placa y captura a Scx presente en suero. Después se incubó el segundo anticuerpo anti-Scx acoplado a biotina formando el “sándwich”. Finalmente, la biotina se reconoce con estreptavidina que a su vez está acoplada a una enzima que genera un producto colorimétrico al ponerse en contacto con su sustrato. La concentración de Scx en las muestras es proporcional a la densidad óptica de la reacción colorimétrica leída en un espectrofotómetro. Se analizaron sueros de pacientes y sujetos control. De un total de 236 muestras analizadas y tabuladas, 56 corresponden a sueros de sujetos control. 36 muestras provienen de pacientes con FPI, 19 con NH y 125 con ES.

Luego de obtener las densidades ópticas (D.O.) de las muestras estudiadas, se tabularon los datos en el programa Microsoft Excel. Utilizando la curva patrón y el blanco se realizó la gráfica de correlación de la D.O. con la concentración de Scx.

Se procedió a calcular la concentración de Scx de los pozos restantes que contenían las muestras estudiadas utilizando la D.O. y la ecuación de la gráfica para cada uno de los ensayos. Debido a que las muestras se cargaron por duplicado, las concentraciones de los 2 pozos que contenían la misma muestra fueron promediadas.

Los promedios resultantes de la concentración de Scx en suero fueron graficados y comparados entre sujetos sanos y pacientes con FPI, NH y ES (*Fig. 12*).

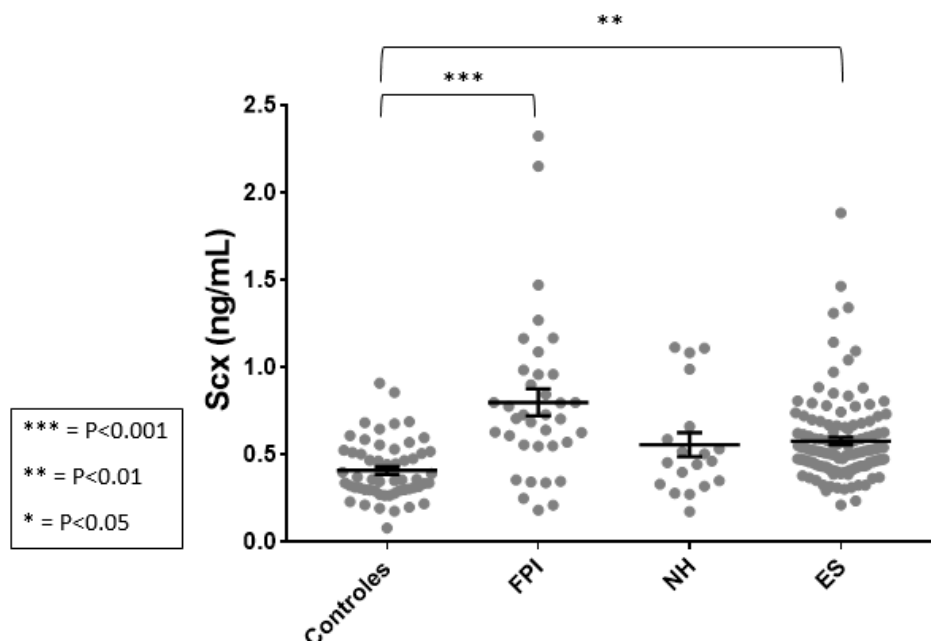


Fig. 12. Concentración de Scx en suero de sujetos control vs pacientes que sufren FPI, NH y ES.

Los puntos en gris representan la concentración de cada una de las muestras, mientras que las líneas horizontales en cada grupo representan la media y el error estándar respectivamente. Las líneas de la parte superior representan la comparación de los datos que presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control, mientras que los asteriscos indican el valor de p para cada comparación.

Se observa incremento en las concentraciones de Scx en los casos clínicos en comparación con los controles. Utilizando el paquete estadístico Prism 7, se observaron diferencias significativas al realizar la prueba de ANOVA de 1 vía, con una $p < 0.0001$. Además, al realizar la prueba de comparación múltiple de Tukey, se observaron diferencias significativas en la concentración de Scx entre los pacientes con FPI comparados contra controles $p < 0.0001$ y pacientes con ES contra controles $p < 0.01$ (Fig. 13)

Posteriormente, se realizaron gráficas y correlaciones con datos clínicos para cada una de las enfermedades estudiadas, incluyendo en todos los gráficos, el grupo control para un mejor contraste. Asimismo, se aplicaron las pruebas estadísticas ANOVA de 1 vía y Tukey.

Los datos clínicos y sueros, para el caso de pacientes con FPI y NH, fueron proporcionados por el Dr. Moisés Selman (Director de Investigación del INER) y la Dra. Ivette Buendía (neumóloga del INER). La Dra. Tatiana Rodríguez (Reumatóloga del INCMNSZ) proporcionó los datos clínicos y sueros para los casos de ES. El apéndice 1 define los datos clínicos utilizados en este estudio. A continuación, se detallan los resultados para cada una de las enfermedades estudiadas.

- *Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)*

Las concentraciones de Scx en suero sanguíneo de sujetos control y de pacientes con FPI obtenidas se correlacionaron con datos clínicos. Éstos incluyeron el hábito de fumar, el estado físico y de salud, concentraciones celulares en lavados bronquioalveolares (LBA) y datos extraídos de la espirometría realizada a cada paciente (especificaciones en el apéndice 1). Con base en las pruebas estadísticas, para el caso de los datos generales (Fig. 13), existen diferencias significativas al comparar controles contra el total de pacientes con FPI ($p < 0.001$), controles contra exfumadores ($p < 0.05$), controles contra pacientes sin hipertensión ($p < 0.01$) y controles contra pacientes sin obesidad ($p < 0.01$).

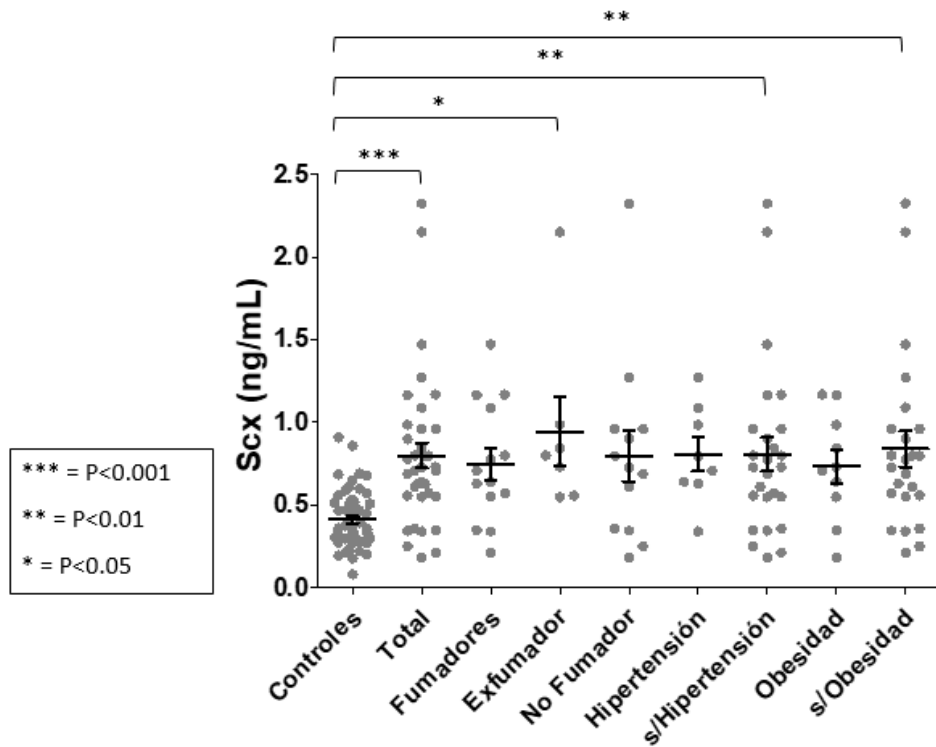


Fig. 13. Correlación de los datos generales con la concentración de Scx en sueros de pacientes con FPI.

Para los datos obtenidos de la espirometría (Fig. 14), existen diferencias significativas entre pacientes con Capacidad Pulmonar Total (CPT) Severa (≤ 60) contra Controles ($p < 0.01$) y entre pacientes con Capacidad Vital Forzada (CVF) < 80 contra Controles ($p < 0.001$).

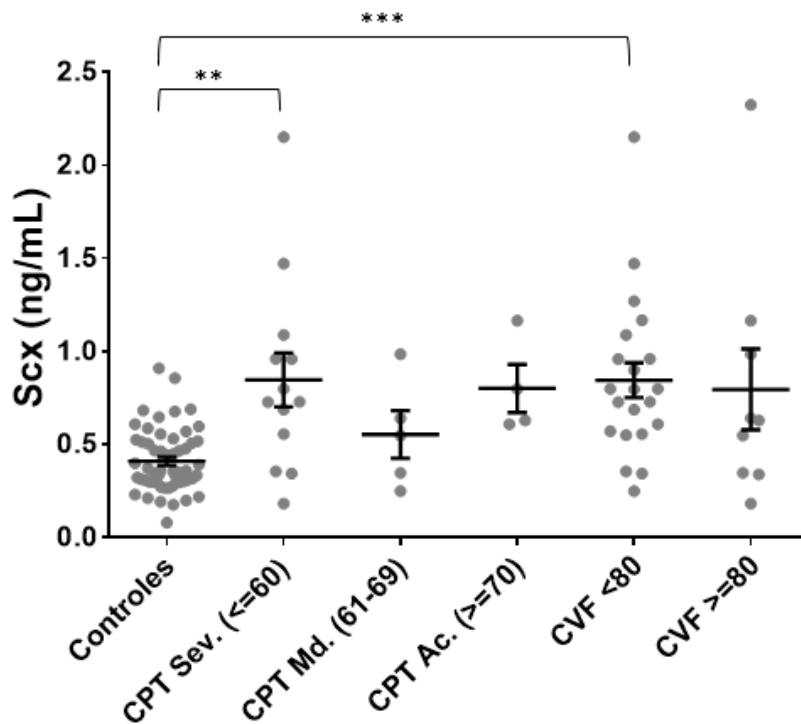


Fig.14. Correlación de los datos espirométricos con la concentración de Scx en suero de pacientes con FPI.

Finalmente, en la concentración de Scx graficada con base en los datos obtenidos en los lavados bronquioalveolares y la saturación de O₂ (Fig. 15) se observan diferencias significativas al comparar el grupo control contra cada uno de los otros criterios.

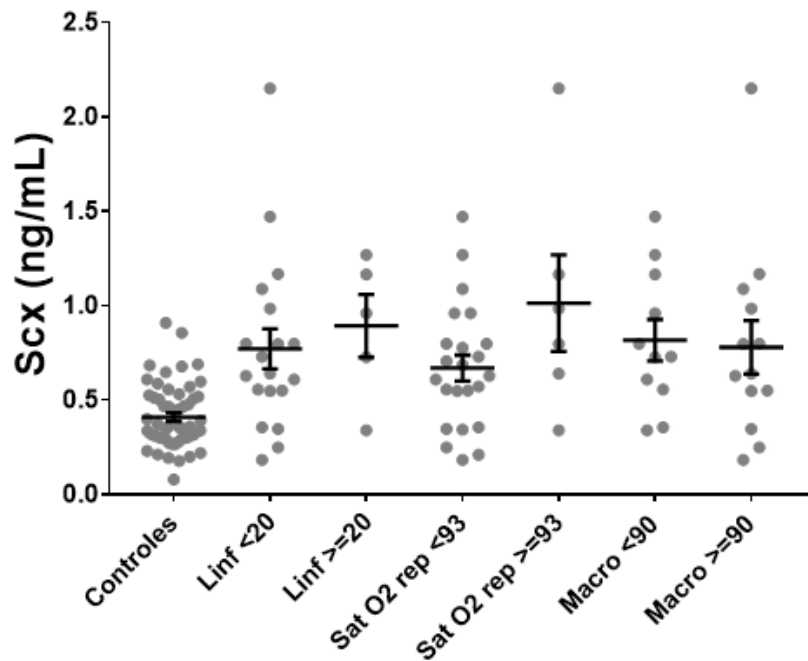


Fig. 15 Correlación de los LBA y la Saturación de O₂ con la concentración de Scx en suero de pacientes con FPI

- Neumonitis por Hipersensibilidad (NH)

Cuando se analizaron las concentraciones de Scx en suero de pacientes con NH en comparación con los datos clínicos (especificados en el apéndice 1), se observaron diferencias significativas en pacientes control comparados contra aquellos que tienen CVF ≥ 80 ($p < 0.01$) (Figs. 16-18). De acuerdo con los datos de la figura 12, no se observaron diferencias entre ningún otro grupo.

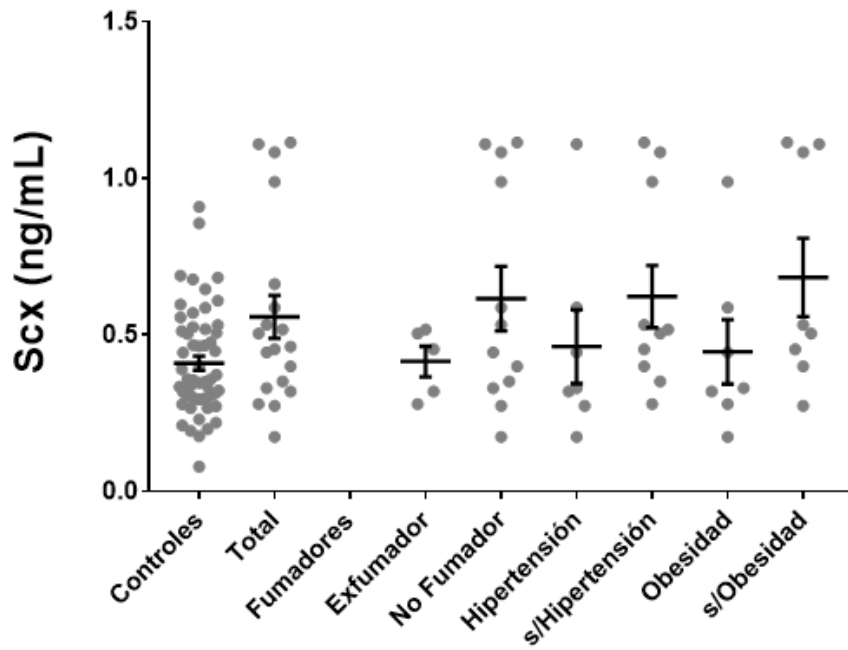


Fig. 16 Correlación de los datos generales con la concentración de Scx en suero de pacientes con NH

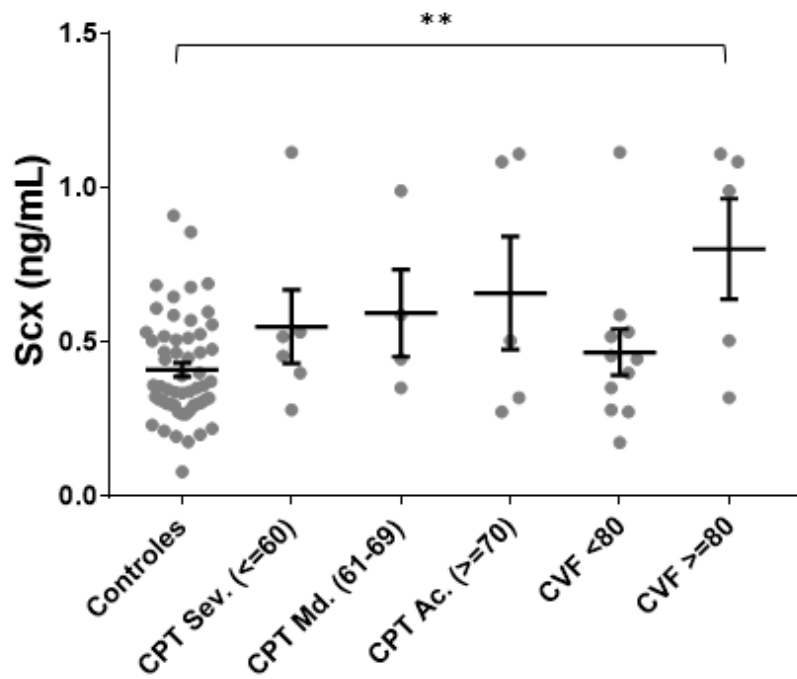


Fig. 17 Correlación de los datos espirométricos con la concentración de Scx en suero de pacientes con NH

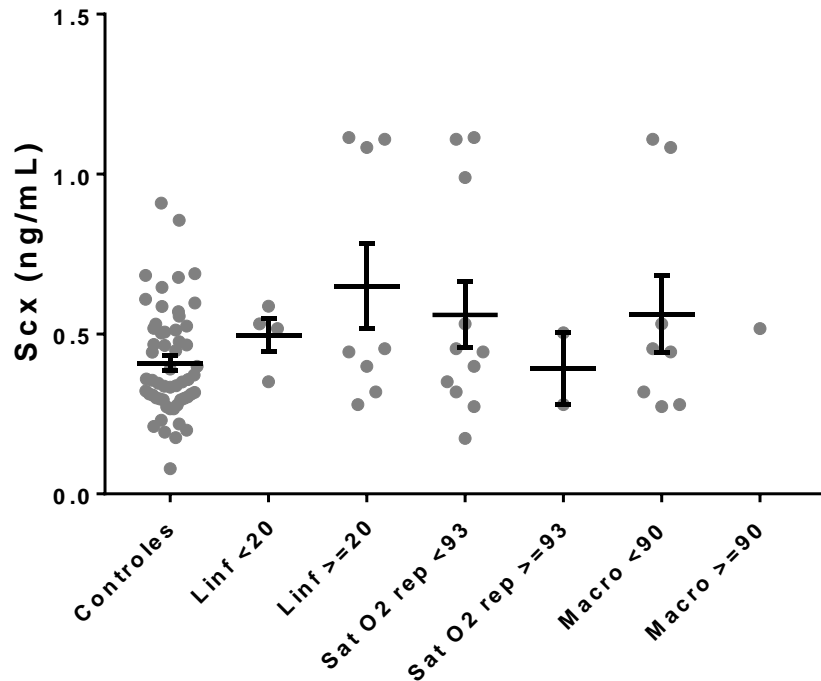


Fig. 18 Correlación de los LBA y la Saturación de O₂(Sat O2) con la concentración de Scx en suero de pacientes con NH

- *Esclerosis Sistémica (ES)*

Como en los dos casos anteriores, las correlaciones se hicieron utilizando datos clínicos (apéndice 1). En este caso, también se incluyeron el tipo y progresión de la enfermedad, el estado general de salud del paciente y un perfil inmunológico (auto-anticuerpos).

Para el caso de la concentración de Scx en ES en relación a los datos generales del paciente (Fig. 19), y con base en las pruebas estadísticas, existen diferencias significativas entre el grupo de pacientes control y la totalidad de los pacientes con ES ($p < 0.001$), controles contra exfumadores ($p < 0.05$), controles contra no fumadores ($p < 0.001$) y controles comparados con pacientes sin obesidad ($p < 0.0001$)

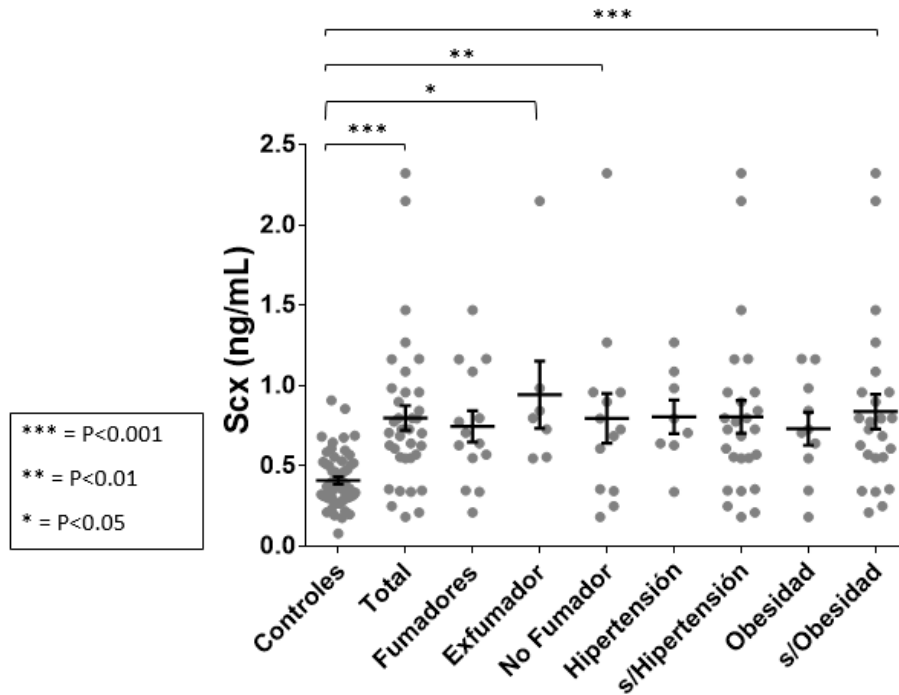


Fig. 19 Correlación de los datos generales con la concentración de Scx en suero de pacientes con ES

De igual manera, para el tipo y progresión de la enfermedad (Fig. 20), se observan diferencias significativas entre el grupo control y todas las formas tardías de la enfermedad, así como en pacientes con menos de 15 puntos en el índice modificado de Rodnan (mRSS) en comparación con los controles. Los valores variaron de $p < 0.05$ en casos como controles frente a ES difusa/tardía (Dif/Tar), a $p < 0.001$ en controles frente a ES tardía.

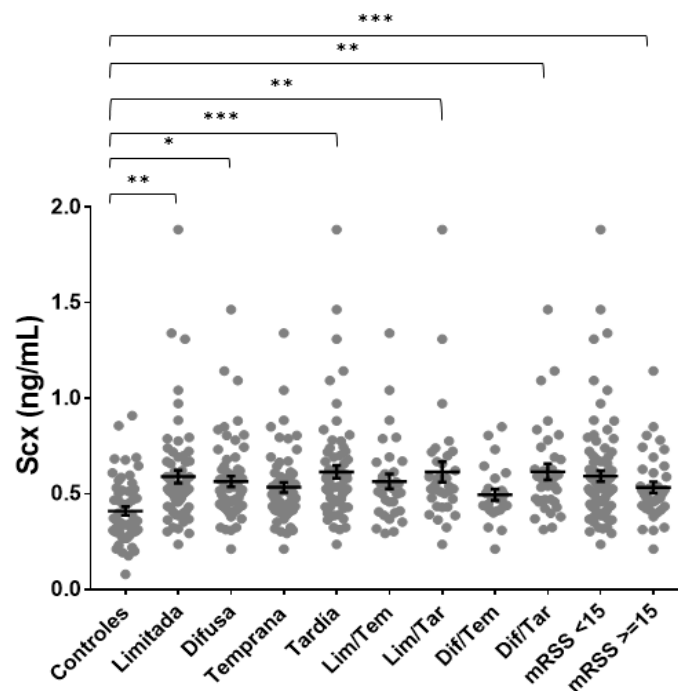


Fig. 20. Correlación de la progresión de la enfermedad con la concentración de Scx en suero de pacientes con ES

En el análisis de afecciones asociadas a ES (Fig. 21), con base en las pruebas estadísticas, existen diferencias significativas solamente en pacientes control contra los que sufren FP ($p < 0.001$), control contra pacientes sin problemas renales ($p < 0.001$), control frente a pacientes sin problemas cardiacos ($p < 0.001$), control frente a pacientes con problemas gastrointestinales ($p < 0.001$) y control frente a pacientes sin artritis ($p < 0.001$).

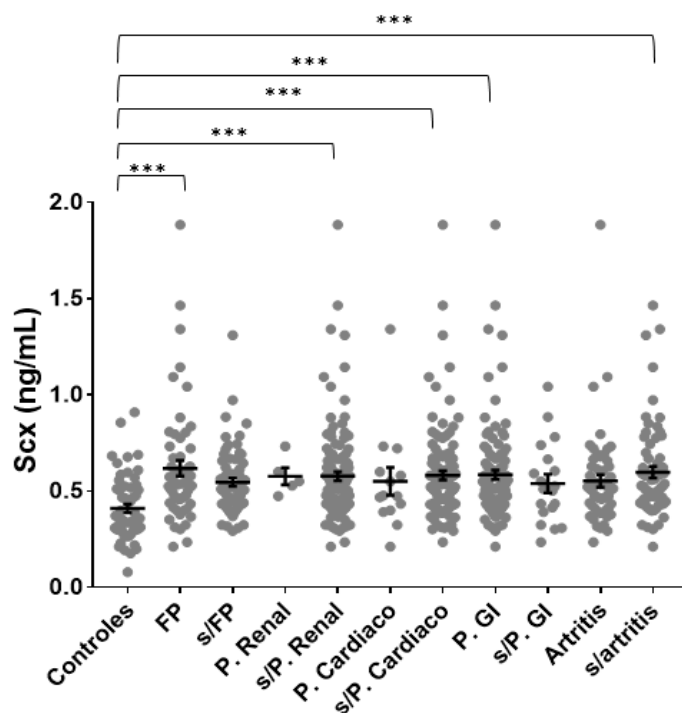


Fig. 21. Correlación de las afecciones asociadas con la concentración de Scx en suero de pacientes con ES

Para el perfil inmunológico (Fig. 22), el grupo control tiene diferencias significativas frente a pacientes con auto-anticuerpos anti-topoisomerasa I (Scl 70) ($p < 0.001$), frente a pacientes sin anticuerpos anti-topoisomerasa I (s/SCL 70) ($p < 0.001$), y frente a pacientes sin anticuerpos anti-centrómero (s/ACA) ($p < 0.001$), frente a pacientes con auto-anticuerpos anti-nucleares (ANA) con un título ≥ 1280 ($p < 0.001$).

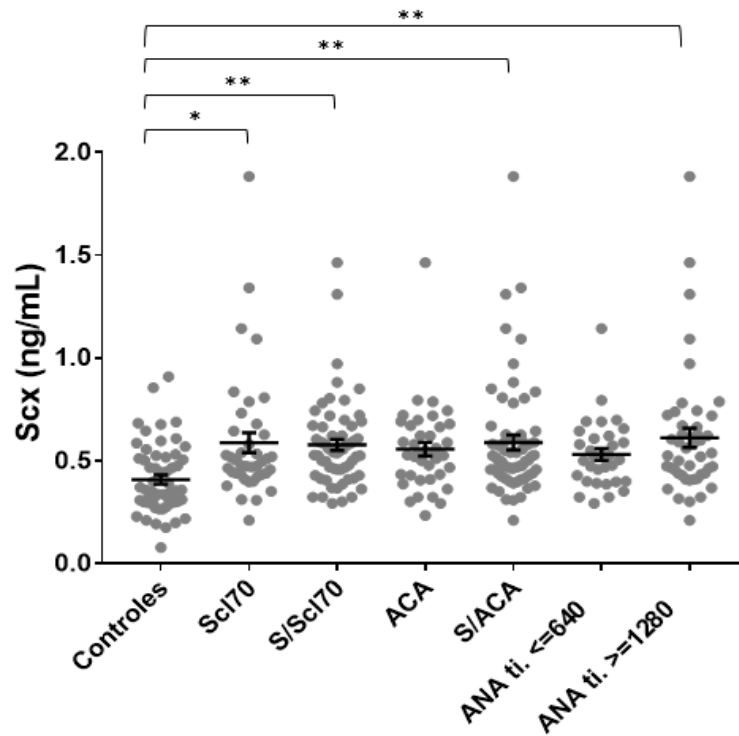


Fig. 22. Correlación del perfil inmunológico con la concentración de Scx en suero de pacientes con ES

1.2 Discusión

Uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar la posibilidad de utilizar la concentración de Scx como un marcador de fibrosis en suero. Con base en el principio de que Scx regula la expresión de colágena y que sus niveles proteicos se encuentran elevados en fibrosis cardiaca y en cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con FPI [38,39,40], las concentraciones de la misma se esperaban más elevadas en pacientes que padecen enfermedades fibrosantes como las analizadas en este trabajo. Esto en comparación con las concentraciones de Scx en sujetos control.

Los resultados muestran diferencias significativas en la concentración de Scx en suero de pacientes con FPI y ES contra los controles. Por otro lado, los datos para NH fueron muy dispersos, con algunas muestras con niveles muy altos de Scx y otras con niveles muy bajos, cercanos a cero. Por lo mismo, no se encontraron diferencias estadísticas en la concentración de Scx cuando se comparó el grupo control con el suero de los pacientes con NH.

La NH se caracteriza por una serie de reacciones inmunopatológicas en el parénquima pulmonar, dependiendo tanto del tiempo de exposición al antígeno como de la susceptibilidad del individuo [4,11]. No todos los pacientes con NH desarrollan fibrosis pulmonar, pues en ocasiones, los episodios de las reacciones son momentáneos y dependen de factores como el tiempo de exposición al antígeno y la cantidad del mismo [12]. Esto explica el hecho de que en la NH se observa un alto grado de variabilidad en la concentración de Scx. De acuerdo con lo anterior, la patología de la NH se restringe al pulmón (a diferencia de la ES), además de que es la enfermedad menos grave de las tres estudiadas.

Al clasificar la concentración de Scx en suero con base en parámetros clínicos de los pacientes, se esperaba observar diferencias relacionadas a la progresión o gravedad de la enfermedad correspondiente. Se observó la tendencia esperada para los sueros de pacientes con FPI y ES, pero no para los de NH. Por esta razón, el resto del trabajo se enfocó a el análisis de los sueros de pacientes con FPI y ES en comparación con los controles.

Se observaron altas concentraciones de Scx en la mayoría de los pacientes con FPI en comparación con los sujetos sanos, sin embargo, también hubo muestras con concentraciones bajas de Scx. Para explicar esto, debemos de recordar que la FPI es una enfermedad crónica y progresiva ^[6]. Las muestras de sangre, por lo tanto, se tomaron de pacientes con distintos grados de progresión, y por lo mismo, con distintos grados de fibrosis pulmonar, lo que explica la variabilidad en las concentraciones cuantificadas de Scx en los sueros de pacientes con FPI.

La figura 13 muestra que pacientes exfumadores tienen niveles más altos de Scx en suero en comparación con los controles. Por otro lado, para los pacientes con ES, los exfumadores y los no fumadores tuvieron niveles más altos de Scx en comparación con los controles. Dentro del grupo de exfumadores con FPI no existe ningún paciente con niveles bajos de Scx, lo que sugeriría que el hecho de haber fumado en algún punto de la vida, repercute negativamente en la concentración de Scx en suero. Esta tendencia sugiere que el hábito de fumar protegería de alguna forma a los pacientes de acumular niveles altos de Scx en suero, sin embargo, como se discute a continuación, el dato parece estar más relacionado con número de pacientes que integra a cada grupo. Para la FPI, la mayoría de los pacientes son fumadores o exfumadores, lo que está de acuerdo al reporte que menciona que el hábito de fumar incrementa el riesgo de desarrollar fibrosis ^[7].

Por otro lado, el número de pacientes con ES que pertenecen a los grupos de exfumadores y no fumadores componen el 90% de la población, que es la mayoría. Esto podría deberse a que la mayoría de los pacientes con ES son mujeres (90%) y a que el porcentaje de fumadoras a nivel mundial (9%) es mucho menor que el de fumadores hombres (40%) ^[OMS, 2010].

En cuanto a los análisis espirométricos, pacientes con capacidad pulmonar total (CPT) severa (pacientes que contienen 60% o menos del volumen de aire normal en el sistema respiratorio) tuvieron las concentraciones más altas de Scx en suero, con diferencias significativas en comparación con los controles. Una persona sana puede contener 5.8 litros, mientras que dichos pacientes pueden contener un máximo de 3.4 litros ^[51]. Esto sugiere que los pacientes con FPI que sufren mayor daño en la capacidad pulmonar, acumulan más Scleraxis en sangre (*Fig. 14*).

La *Fig. 16* muestra diferencias significativas al comparar la concentración de Scx en suero de los controles con el resto de los parámetros de la gráfica, que incluyen el porcentaje de linfocitos y macrófagos en los lavados bronquialveolares, así como la saturación de oxígeno. De esa manera, es posible concluir que ni los datos de lavados bronquioalveolares, ni los de saturación de oxígeno correlacionan con las concentraciones de Scx en suero de pacientes con FPI. Sin embargo, se consideró interesante que los pacientes con saturación de oxígeno normal (Sat O₂ mayor a o igual a 93% en CDMX ^[51]) tenían niveles altos de Scx circulante, del mismo modo que los pacientes con capacidad vital forzada (CVF) menor a 80.

Si analizamos la CVF y la Sat O₂ en pacientes con CPT severa, (*Tabla 3*) podemos constatar que una disminución en la CPT, no supone un decremento en las dos anteriores, indicando que la concentración de Scx correlaciona mejor con la CPT severa.

Tabla 3. Relación de CVF y Sat O₂ en pacientes con CPT sev..

| ID# | Genero | Edad | Scx [] | Tabaquismo | Hipertension | Obesidad | Linfos BAL | CPT | CVF | Sat O ₂ | Macrof BAL |
|----------|--------|------|-------------|------------|--------------|----------|------------|-----|-----|--------------------|------------|
| Z-340 | Mas | 63 | 0.98424015 | Exfumador | Si | Si | 3 | 61 | 105 | 93 | 96 |
| Z-371 | Mas | 67 | 2.004210526 | Exfumador | No | No | 6 | 57 | 66 | 93 | 94 |
| Z-340 | Mas | 63 | 0.415457663 | Fumador | Si | Si | 3 | 61 | 105 | 93 | 96 |
| ILD 2268 | Mas | 72 | 0.472170931 | Fumador | Si | No | 20 | | 81 | 94 | 80 |
| ILD 2367 | Mas | 70 | 1.863624374 | No | Si | No | 3 | | 63 | 94 | 97 |

CPT=Capacidad Pulmonar Total. CVF= Capacidad Vital Forzada. Sat O₂= Saturación de O₂ en reposo. Macrof BAL= Macrófagos cuantificados en lavados bronquioalveolares

La ES es una enfermedad multisistémica, caracterizada entre otras cosas por la presencia de fibrosis en la piel, que con el tiempo puede desencadenar afecciones fibróticas en otros órganos, incluyendo los pulmones [25]. Se encontraron diferencias significativas al comparar el grupo control contra pacientes con fibrosis pulmonar (FP), lo que está de acuerdo con los datos de pacientes con FPI. La presencia de diferencias significativas en la concentración de Scx en suero en los pacientes con problemas gastrointestinales (P. GI) se explica con el dato que indica que el tracto gastrointestinal se ve afectado en el 90% de los casos de ES [28,29].

Las variantes difusas de ES se caracterizan por afecciones fibróticas en otros órganos además de la piel. En contraste, la ES limitada se encuentra principalmente en piel [20,22]. Por esto, se esperaba que los pacientes con ES difusa tuvieran niveles más altos de Scx en comparación con los pacientes con ES limitada. En la figura 20 se observa que no fue el caso. Sin embargo, los niveles de Scx en suero fueron diferentes significativamente cuando se compararon los controles contra las variantes tardías de la enfermedad. Esto sugiere que los niveles de Scx son más altos en suero cuando la ES se encuentra en etapas más avanzadas.

Los pacientes con el índice modificado de Rodnan <15 (mRSS) también tenían niveles más altos de Scx en comparación con los controles. Este resultado podría parecer opuesto a lo esperado, pues valores altos del mRSS indican mayor fibrosis en la piel. Sin embargo, en fases tardías de la enfermedad existe regresión de la fibrosis cutánea [25]. Por lo tanto, este dato también correlaciona etapas avanzadas de la enfermedad con Scx alto en suero. Del mismo modo, existen reportes que señalan que además del mejoramiento cutáneo, existe una desaparición de la artritis y los frotos tendinosos [21], explicando así, la diferencia significativa entre controles y pacientes sin artritis que muestra la figura 20.

Cabe mencionar que el proceso fibrótico en los órganos viscerales puede continuar progresando a pesar de que el engrosamiento cutáneo (mRSS) y la artritis hayan presentado una regresión. Esto está de acuerdo con la correlación entre la FP [21] y los niveles altos de Scx en suero.

Por último, en el perfil inmunológico se presentaron diferencias en pacientes con anticuerpos anti-nucleares (ANA) con un título mayor a 1280 en comparación con los controles. Este dato clínico se asocia con enfermedades autoinmunes en general. Sin embargo, el título alto nos puede hablar de la severidad de la enfermedad, aunque este no es siempre el caso, pues la gravedad de la ES está más relacionada con el tipo específico de anticuerpo anti-nucleares presente en el suero de los pacientes [52]. Lamentablemente, en este trabajo no se encontraron diferencias en pacientes con auto-anticuerpos específicos, ya que existen diferencias significativas en pacientes que poseen anticuerpos anti-topoisomerasa I al igual que en aquellos que no los presentan. Por lo tanto, el perfil de autoanticuerpos no correlaciona con la concentración de Scx circulante.

Con base en los resultados de FPI y ES se sugiere que Scx es un marcador de fibrosis para estas enfermedades. Esto está de acuerdo con que ambas enfermedades fibrosantes se caracterizan por una acumulación excesiva de colágena extracelular ^[5,6], cuya transcripción a su vez se encuentra regulada en gran parte por el factor de transcripción Scx ^[41,42].

2. Cuantificación de la concentración de Scx en suero sanguíneo de ratones con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina

Con base en lo encontrado en suero de pacientes, se planteó la posibilidad de encontrar una correlación más directa entre los niveles elevados de Scx en suero y el desarrollo de fibrosis mediante la utilización de un modelo controlado de fibrosis pulmonar. Por esta razón se decidió implementar el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en el modelo de ratón. Comenzamos por establecer el mejor método de instilación con bleomicina en ratones. Una vez establecido el modelo, los ratones se sacrificarían a distintos tiempos durante el desarrollo de la enfermedad para obtener suero. Asimismo, se obtuvieron los pulmones de cada uno de los ratones para realizar una cuantificación de Hidroxiprolina (OH-Pro), un aminoácido presente principalmente en la proteína colágena ^[53] y un análisis histológico.

✚ 2.1 Resultados

- Estandarización y elección del mejor método de instilación

Previo a la instilación con bleomicina, fueron puestos a prueba 3 métodos de instilación utilizando tinta china con el fin de conocer la eficacia de esparcimiento del fármaco en el pulmón, así como el método menos invasivo posible. A continuación, se mencionan brevemente las ventajas y desventajas de cada uno de los métodos probados.

Instilación intra-nasal: Este método no es invasivo y es el menos agresivo, pues sólo agrega el líquido a instilar en una de las fosas nasales del ratón y éste procede a respirarlo. Sin embargo, el método resultó poco eficaz, pues al analizar los pulmones de ambos ratones instilados con esta técnica, no se encontraron rastros de tinta en los mismos (*Fig. 23*).

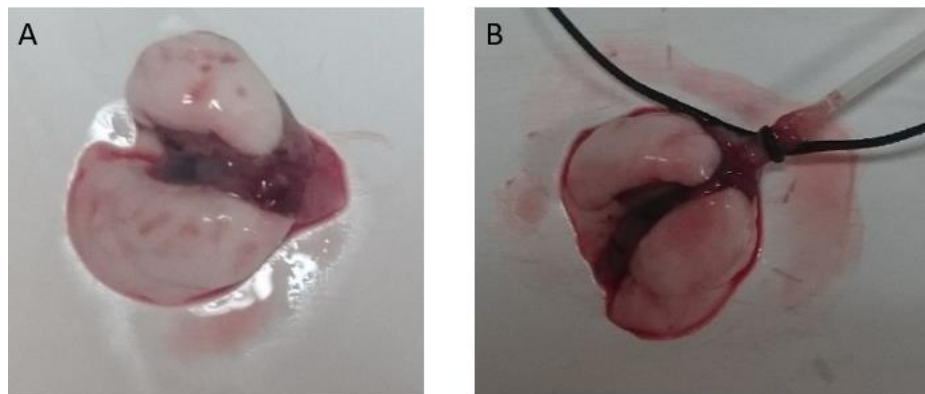


Fig. 23. Pulmones de los 2 ratones instilados usando la técnica intra-nasal. La tinta china no es apreciable. A y B pulmones de ratones independientes instilados de la misma forma.

Posterior a la extracción del bloque cardio-pulmonar, fue posible constatar que en ambos casos el ratón tragó la tinta en lugar de aspirarla (*Fig. 24*) pues la tinción se encontró en el estómago y no en los pulmones como se esperaba.

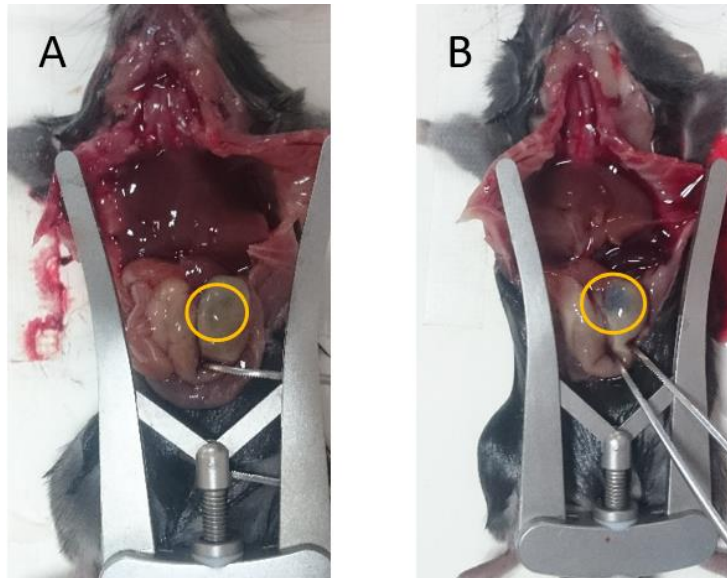


Fig. 24. Ratones instilados con el método intra-nasal una vez extraído el bloque cardio-pulmonar. Tanto en el ratón A como en el ratón B, se aprecia tinción en el estómago, explicando la ausencia de la misma en los pulmones.

Instilación orofaríngea con cánula: Este método tampoco es invasivo ya que utiliza una cánula insertada en la tráquea a través de la boca. El líquido de la cánula es aspirado por el ratón de forma natural. A diferencia al método anterior, fue posible tintar ambos pulmones (Fig. 25). Sin embargo, la tinción no fue homogénea al concentrarse cerca de los bronquios. El suministrar aire a través de la cánula, posterior al aspirado del líquido, no afectó el resultado.

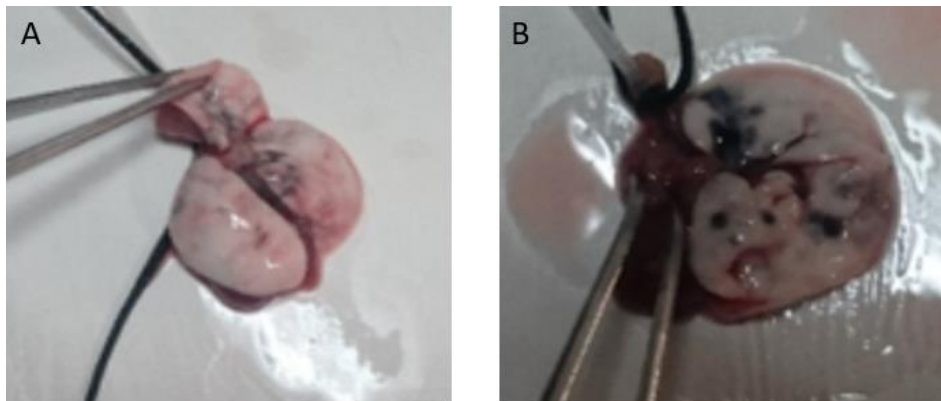


Fig. 25. Pulmones tintados con el método orofaríngeo con cánula. A: Pulmón instilado con la forma tradicional del método intra-traqueal con cánula. B: Pulmón instilado con la variante de suministrar aire usando una jeringa. En ambos se logra ver una tinción heterogénea, en la parte más próxima a los bronquios.

Después de la extracción del bloque cardio-pulmonar fue posible confirmar que la tinta fue aspirada, con la ausencia de tinción en el estómago de los ratones (Fig. 26).

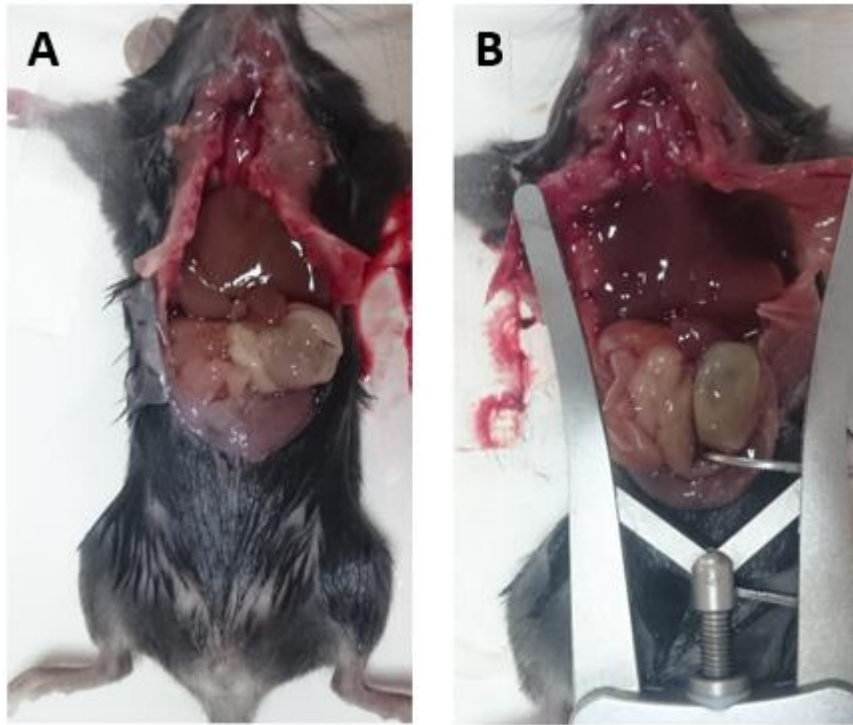


Fig. 26. Ratones instilados con el método de instilación orofaríngea con cánula luego de la extracción del bloque cardio-pulmonar. Utilizando la forma tradicional de método (A) al igual que la variante con aire extra (B), se observa ausencia de tinta en el estómago, sugiriendo que la totalidad de la tinta se encuentra en los pulmones.

Instilación intra-traqueal por inyección: Esta técnica es la más invasiva pues requiere de cirugía (ver métodos). Sin embargo, resultó ser la técnica más eficaz pues generó los mejores resultados en cuanto a la distribución de la tinta en el pulmón (Fig. 27).

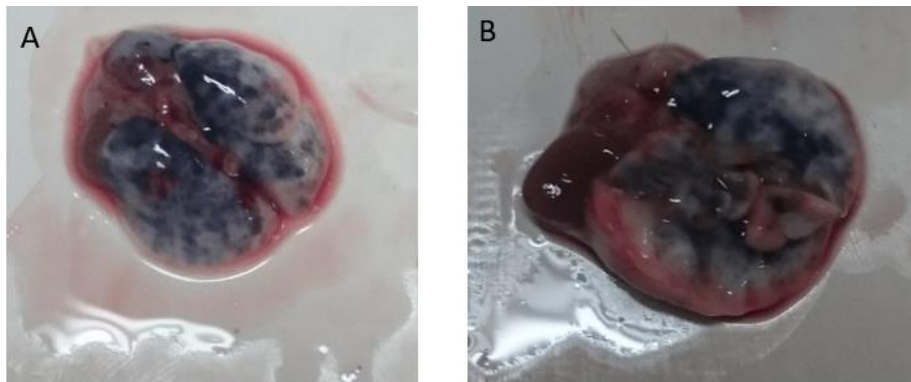


Fig. 27. Pulmones de los 2 ratones instilados con el método intra-traqueal por inyección en la traquea. La distribución de la tinta china fue homogénea en ambos casos.

- *Inducción de FP en ratones mediante instilación con bleomicina*

Posteriormente, con el fin de probar si existían niveles circulantes de Scx en suero sanguíneo en ratones con grados conocidos de fibrosis pulmonar, decidimos utilizar la técnica de instilación intra-traqueal por inyección en 60 ratones (técnica indicada en métodos).

Posterior a la instilación indicada a detalle en métodos, se reacomodó el tejido y se suturó la piel del cuello, dejando reposar a los ratones en la plancha a 37° C. Una vez recuperados y despiertos se colocaron nuevamente en sus jaulas respectivas. Se sacrificaron 14, 21, 28 y 35 días después de la instilación con bleomicina. Se obtuvo el bloque cardio-pulmonar: el pulmón derecho se fijó con formol para obtener imágenes histológicas, mientras que el izquierdo fue utilizado para cuantificar OH-Pro, un aminoácido contenido principalmente en colágena ^[54], con lo que se puede estimar de manera indirecta la cantidad de ésta última en el pulmón.

Una vez obtenidas las concentraciones de OH-Pro, se utilizó el programa Prism 7 para graficar los datos a distintos tiempos de sacrificio (*Fig. 28*). Se observó una tendencia a niveles más altos de OH-pro en los ratones sacrificados 21 y 28 días posteriores a la instilación con bleomicina.

De manera conjunta, el grado de fibrosis que generó la bleomicina también se analizó en los pulmones fijados con formol. Éstos fueron enviados al laboratorio de histología del INER. Ahí se obtuvieron cortes histológicos que fueron teñidos mediante 2 técnicas: tinción tricrómica de Masson y tinción por hematoxilina-eosina (*Figs 29 y 30*). Como se observa en las figuras mencionadas, la fibrosis pulmonar se pudo observar claramente en pulmones de ratones sacrificados 21 y 28 días posteriores a la instilación con bleomicina.

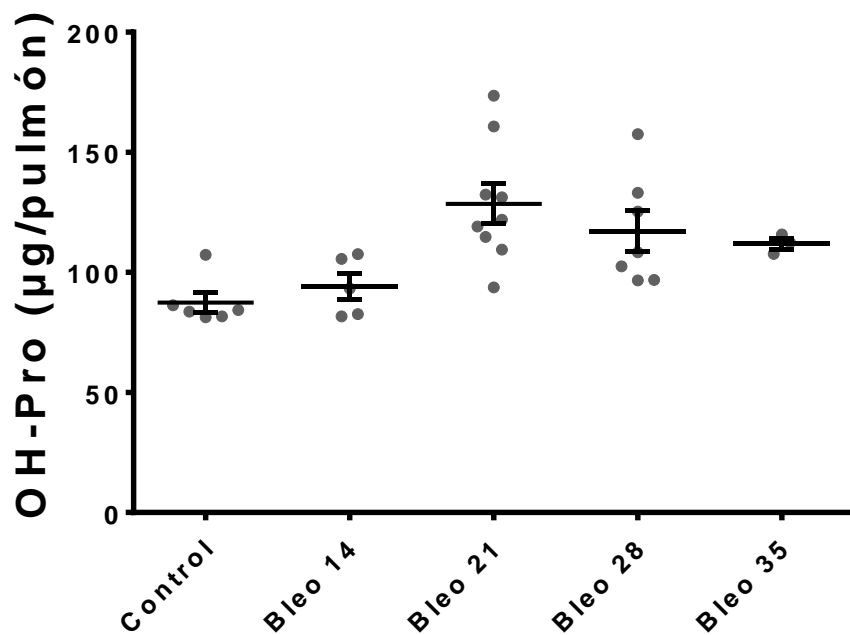


Fig. 28. Concentración de OH-Pro en los distintos tiempos de sacrificio de los ratones

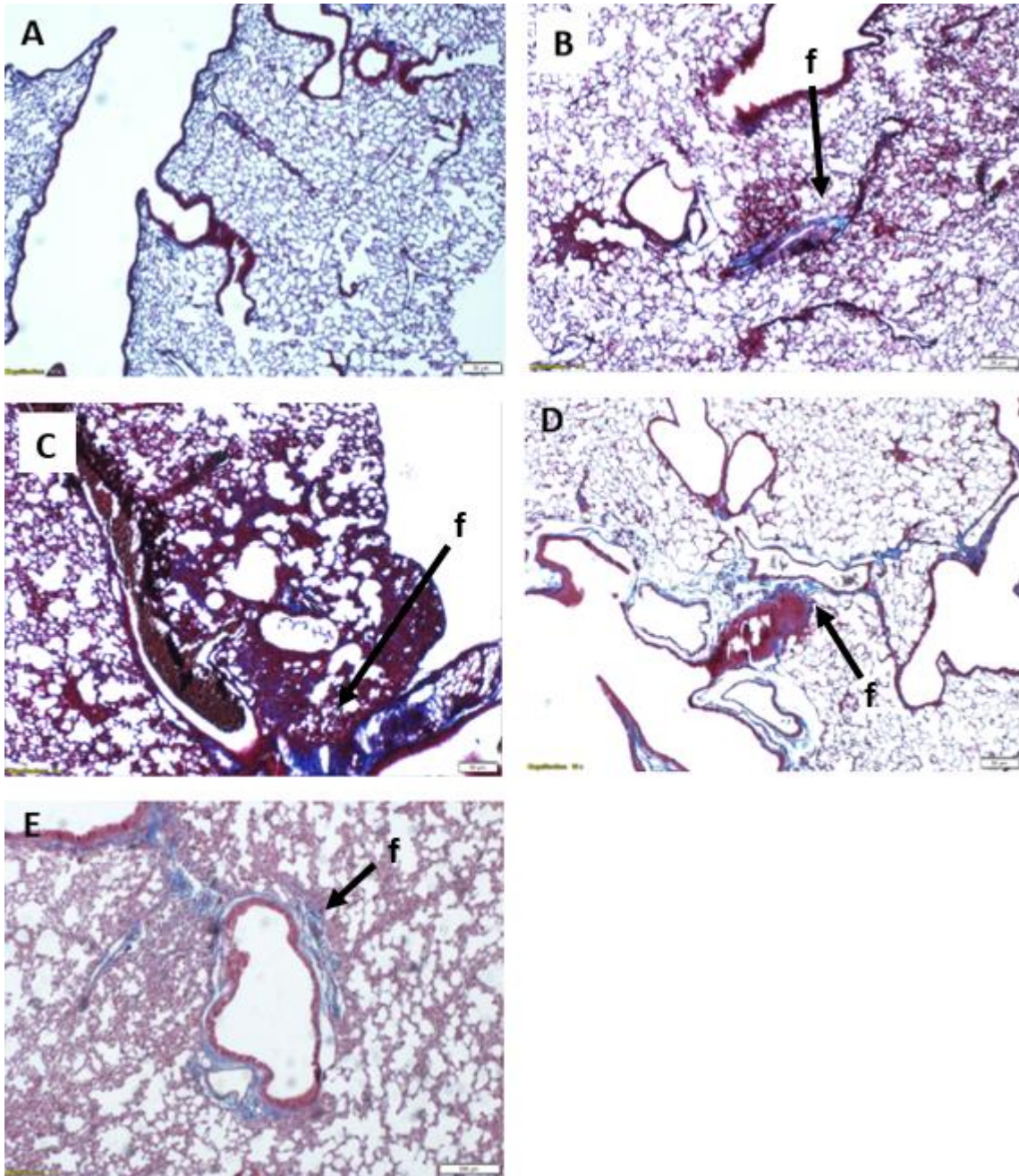


Fig. 29. Cortes histológicos de pulmón de ratón teñidos mediante la técnica tricrómica de Masson (4x) utilizando microscopía de luz. Dicha técnica se basa en la utilización de 3 colorantes que actúan de acuerdo a su acidez, en color rojo se tiñen partes como el citoplasma, mientras que en azul se observan las fibras de colágena, como en el caso de B-E, donde se visualizan en azul las zonas de fibrosis (f). (A) Corte histológico de pulmón sin instilar (Control): No se aprecian daños en la estructura pulmonar. (B) Corte histológico de pulmón 14 días después de la instilación. (C) Corte histológico de pulmón 21 días después de la instilación. (D) Corte histológico de pulmón 28 días después de la instilación. (E) Corte histológico de pulmón 35 días después de la instilación.

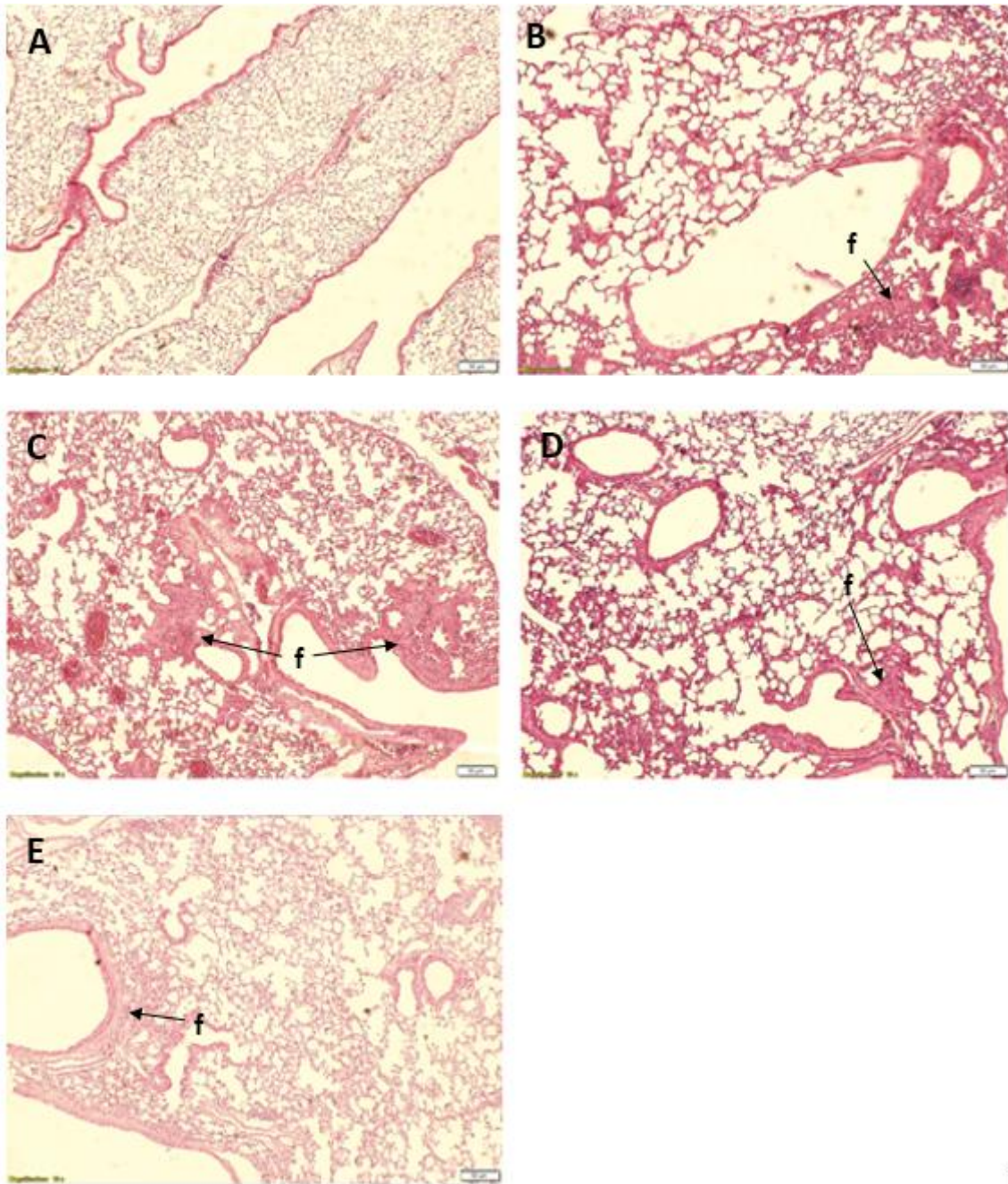


Fig. 30. Cortes histológicos de pulmón de ratón teñidos mediante la técnica Hematoxilina-eosina (4x) utilizando microscopía de luz. Cortes adyacentes de las mismas muestras de la Fig. 23. Esta técnica está basada en el pH tanto de la muestra a teñir como de los colorantes usados, mientras que la hematoxilina al ser de naturaleza básica teñirá las partes ácidas del tejido en tonos azules o púrpuras, la eosina al ser de naturaleza ácida, teñirá las partes básicas en tonos rojos o rosas. (A) Corte histológico de pulmón sin instilar (Control): No se aprecian daños en la estructura pulmonar. (B) Corte histológico de pulmón 14 días después de la instilación. (C) Corte histológico de pulmón 21 días después de la instilación. (D) Corte histológico de pulmón 28 días después de la instilación. (E) Corte histológico de pulmón 35 días después de la instilación. (B-E) En color morado se observan brotes fibróticos causados por la instilación con bleomicina (f).

Con base en el ensayo de OH-Pro y el análisis de las imágenes histológicas, cuantificó la concentración de Scx en suero (Fig. 31). Con el fin de asegurar que las muestras de suero provinieran de ratones con daño fibrosante elevado y, por lo tanto, tuvieran mayores probabilidades de contener Scx circulante en suero, se seleccionaron los sueros sanguíneos de los ratones que presentaban concentración elevada de OH-pro (Tabla 4), clara fibrosis en los ensayos histológicos y daño macroscópico de los pulmones documentado al momento de la extracción del bloque cardio-pulmonar. Entonces se realizó el ensayo de ELISA como se hizo para los sueros de los pacientes.

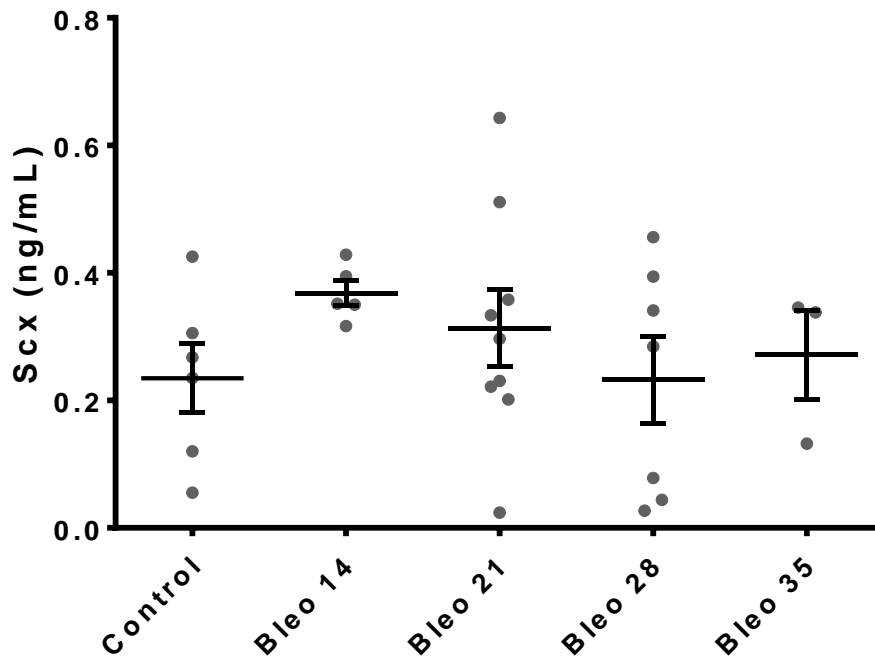


Fig. 31. Concentración de Scx en suero sanguíneo de ratón.

Al graficar las concentraciones de Scx halladas en suero sanguíneo de ratones, se observa que transcurridos 14 días de la instilación con bleomicina los niveles de Scx aumentan ligeramente. Posteriormente, los niveles de Scx bajan paulatinamente, acercándose a los valores de los controles. Las pruebas estadísticas no mostraron diferencias significativas entre grupos.

Tabla 4 Concentración de OH-Pro, daño macroscópico y daño histológico en pulmones de los ratones analizados

| | Nº | ID# | OH-Pro (µg/µL) | Tiempo | Macro | Histo |
|-----|-------------|-------------|----------------|-------------|------------|-------|
| (A) | 1 | c2 | 81.71 | control 14d | | No |
| | 2 | c3 | 81.32 | control 14d | | No |
| (B) | 3 | b14 (1) | 93.24 | bleo 14d | Daño | Si |
| | 4 | b14 (2) | 81.51 | bleo 14d | Poco daño | |
| | 5 | b14 (3) | 81.71 | bleo 14d | Poco daño | Si |
| | 6 | b14 (4) | 82.59 | bleo 14d | Poco daño | Si |
| | 7 | b14 (5) | 85.23 | bleo 14d | Daño | |
| | 8 | b14 (6) | 107.61 | bleo 14d | Mucho daño | Si |
| | 9 | b14 (7) | 80.83 | bleo 14d | | |
| | 10 | b14 (8) | 105.56 | bleo 14d | Mucho daño | No |
| | 11 | c6 | 104.88 | control 21d | | |
| | 12 | c7 | 107.22 | control 21d | | |
| (C) | 13 | b21 (1) | 119.05 | bleo 21d | | Si |
| | 14 | b21 (2) | 95.10 | bleo 21d | Poco daño | No |
| | 15 | b21 (3) | 114.75 | bleo 21d | Daño | No |
| | 16 | b21 (4) | 85.23 | bleo 21d | Daño | |
| | 17 | b21 (6) | 89.24 | bleo 21d | | |
| | 18 | b21 (7) | 90.90 | bleo 21d | Poco daño | |
| | 19 | b21 (8) | 132.34 | bleo 21d | Mucho daño | Si |
| | 20 | c4 | 102.92 | control 28d | | |
| (D) | 21 | c5 | 107.32 | control 28d | | |
| | 22 | b28 (1) | 133.12 | bleo 28d | Poco daño | No |
| | 23 | b28 (2) | 108.30 | bleo 28d | Poco daño | No |
| | 24 | b28 (3) | 95.98 | bleo 28d | | |
| | 25 | b28 (4) | 95.69 | bleo 28d | Poco daño | |
| | 26 | b28 (5) | 125.30 | bleo 28d | Daño | Si |
| (E) | 27 | b28 (6) | 114.65 | bleo 28d | Mucho daño | No |
| | 28 | b28 (7) | 96.67 | bleo 28d | Poco daño | |
| | 29 | b28 (8) | 93.44 | bleo 28d | Daño | |
| | 1 | c6 | 85.70 | control 21d | | |
| | 2 | bleo 21 (1) | 173.56 | bleo 21d | Daño | Si |
| | 3 | bleo 21 (2) | 131.25 | bleo 21d | Poco daño | Si |
| | 4 | bleo 21 (3) | 160.73 | bleo 21d | Daño | Si |
| 5 | bleo 21 (4) | 93.73 | bleo 21d | Mucho daño | | |
| 6 | bleo 21 (5) | 109.43 | bleo 21d | | | |
| 7 | bleo 21 (6) | 95.53 | bleo 21d | Poco daño | | |
| 8 | bleo 21 (7) | 94.69 | bleo 21d | | | |
| 9 | bleo 21 (8) | 121.90 | bleo 21d | Daño | Si | |
| 10 | bleo 21 (9) | 100.56 | bleo 21d | Poco daño | | |
| 11 | c11 | 102.36 | control 21d | | | |
| 12 | c12 | 109.67 | control 21d | | | |
| 13 | bleo 28 (1) | 97.69 | bleo 28d | | | |
| 14 | bleo 28 (4) | 99.24 | bleo 28d | | | |
| 15 | bleo 28 (3) | 96.85 | bleo 28d | Daño | | |
| 16 | bleo 28 (5) | 88.22 | bleo 28d | Daño | | |
| 17 | bleo 28 (6) | 157.50 | bleo 28d | Daño | s/histo | |
| 18 | bleo 28 (7) | 72.03 | bleo 28d | Daño | | |
| 19 | bleo 28 (8) | 102.48 | bleo 28d | Poco daño | s/histo | |
| 20 | bleo 28 (9) | 81.14 | bleo 28d | | | |
| 21 | c2 | 95.89 | control 28d | | | |
| 22 | c1 | 83.66 | control 28d | | s/histo | |
| 23 | c3 | 84.26 | control 35d | | No | |
| 24 | c4 | 94.93 | control 35d | | | |
| 25 | c5 | 86.30 | control 35d | | s/histo | |
| 26 | bleo 35 (1) | 91.47 | bleo 35d | | | |
| 27 | bleo 35 (2) | 112.43 | bleo 35d | | Si | |
| 28 | bleo 35 (3) | 107.63 | bleo 35d | Daño | | |
| 29 | bleo 35 (4) | 105.72 | bleo 35d | Daño | | |
| 30 | bleo 35 (5) | 115.79 | bleo 35d | Daño | s/histo | |
| 31 | bleo 35 (7) | 99.72 | bleo 35d | Poco daño | | |
| 32 | bleo 35 (8) | 101.64 | bleo 35d | Poco daño | | |

En verde se muestran los pulmones elegidos como ejemplo para las Figs. 29 y 30. La letra del lado izquierdo indica la imagen de microscopía a la que corresponde cada caso en dichas figuras.

2.2 Discusión

El modelo animal fue probado con la intención de tener un ambiente más controlado en cuanto al grado de fibrosis y a los tiempos en la toma de muestras. La idea era establecer correlaciones más claras entre la concentración de Scx y el desarrollo de fibrosis en los pulmones, descartando así algunas variables como las discutidas en **la parte 1**.

Nuestro primer objetivo fue la elección del mejor método de instilación, buscando aquel que diera la distribución más homogénea de nuestro fármaco en los pulmones y que fuera lo menos invasivo posible. Fueron probados 3 métodos de instilación con ayuda de tinta china para lograr una tinción en color negro y así comprobar la eficacia de cada uno. El primero de ellos se trató de un método de instilación intra-nasal, con el cual nos fue imposible hacer que la tinta china llegara a los pulmones, lo anterior, debido quizás a que el ratón era capaz de tragar la tinta en lugar de aspirarla, suposición que pudimos comprobar posterior a la extracción del bloque cardio-pulmonar (*Fig. 23*). Al analizar el estómago de ambos ratones, pudimos corroborar que efectivamente el ratón había tragado la tinta (*Fig. 24*).

El segundo método que se probó fue la instilación orofaríngea con cánula, en el cual, a pesar de lograr la tinción, consideramos que el método no sería el más óptimo ya que la tinción no fue homogénea (*Fig. 25*). Por lo tanto, la bleomicina no se expandiría en la totalidad del pulmón, reduciendo así la eficacia en la generación de fibrosis pulmonar.

Finalmente se probó el método de instilación intra-traqueal por inyección, el cuál fue, además, el seleccionado para realizar las instilaciones con bleomicina, puesto que generó la tinción más homogénea (Fig. 27). Este resultado se debe probablemente a que la inyección se realiza directo a la tráquea de manera conjunta con aire, lo que ayuda al esparcimiento de la tinta en la totalidad del pulmón. Del mismo modo, la inyección intratraqueal evita que el ratón trague líquido.

Los resultados no mostraron diferencias en las concentraciones de Scx en suero al comparar ratones control con los ratones con distintos grados de fibrosis inducida por bleomicina. Esto sugiere que los niveles circulantes de Scx en ratones son muy bajos o inexistentes. Sin embargo, debido a que el resultado fue negativo, debemos de descartar posibles errores en el procedimiento o problemas técnicos. Para comenzar, un error podría haber sido que ningún ratón tuviera fibrosis pulmonar, sin embargo, las imágenes histológicas y el ensayo de OH-Pro ayudan a descartar dicha posibilidad (Figs 29 y 30, Tabla 4).

Entre los posibles problemas técnicos, podría ser que el anticuerpo anti-Scx humano no reconociera a Scx de ratón. Para descartar esta posibilidad, comparamos la secuencia de Scx de ambas especies utilizando el programa Clustalx 2.1 y observamos una identidad de 88% como se muestra en la Fig. 32. Además, hicimos una búsqueda de los sitios de reconocimiento de diversos anticuerpos anti-Scx comerciales (Tabla 5) ya que los anticuerpos incluidos en el kit de ELISA utilizado no especifican el epítipo reconocido por los mismos. Existe la posibilidad de que los sitios de reconocimiento de los anticuerpos del kit sean la causa de nuestros resultados negativos, sin embargo, creemos que dicha posibilidad es muy escasa, puesto que la mayoría de los anticuerpos comerciales anti Scx reconocen una secuencia altamente conservada (Fig. 32 [A]), la cual tiene una identidad de 96.6% (29/30 aminoácidos) entre ratón y humano. Por lo tanto, se esperaría que el anticuerpo del kit reconociera a Scx tanto en suero de pacientes, como en suero de ratones. Nuestros resultados sugieren entonces, que Scx no circula en suero sanguíneo de ratones con FP inducida por bleomicina.

| | | |
|--------------------|--|-----------------------------------|
| <i>H. sapiens</i> | MSFATLRPAPP-GRYLYPEVSPLSEDEDRGSDSSGSDEKPCRVHAARCGLQGARRRAGGR | |
| <i>M. musculus</i> | MSFAMLRSAAPPGRYLYPEVSPLSEDEDRGSESSGSDEKPCRVHAARCGLQGARRRAGGR | |
| | | Hélice 1 Vuelta |
| <i>H. sapiens</i> | RAGGGGPG--GRPGREPRQRHTANARERDR | TNSVNTAFTALRTLIPTEPADRKLSKIETL |
| <i>M. musculus</i> | RAAGSGPGGGRPGREPRQRHTANARERDR | TNSVNTAFTALRTLIPTEPADRKLSKIETL |
| | | [A] |
| | Hélice 2 | |
| <i>H. sapiens</i> | RLASSYISHLGNVLLAGEACGDGQPCHSGPAFFHAARAGSPPPPPPPPP-- | ARDG-ENTQ |
| <i>M. musculus</i> | RLASSYISHLGNVLLVGEACGDGQPCHLGPAFFHSGRAGSPLPPPPPPPLARDGGENTQ | |
| <i>H. sapiens</i> | PKQICTFCLSNQRKLSKDRDRKTAIRS | Identidad: 183/207 (88.4%) |
| <i>M. musculus</i> | PKQICTFCLSNQRKLSKDRDRKTAIRS | |

Fig. 32. Secuencias alineadas de la proteína Scx de humano (*Homo sapiens*) y de ratón (*Mus musculus*). Los recuadros azules indican la región en donde se encuentran el dominio característico de Scx (HLH)^[44]. [A]. En color verde se muestra la región que reconocen la mayoría los anticuerpos anti-Scx de humano encontrados.

Tabla 5. Anticuerpos comerciales de distintas marcas para Scx de humano y su sitio de reconocimiento

| Nombre | Compañía | Sitio de reconocimiento | Reacciona con ratón | Reconocido en ratón |
|--|-------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| SCX Polyclonal Antibody | ThermoFisher Scientific | AA 172-201 | - | - |
| anti-SCX (Scleraxis) antibody | Antibodies-online | AA179-209 | Sí | - |
| anti-SCX (Scleraxis) antibody | Antibodies-online | N-término | - | - |
| Anti-SCXA antibody | abcam | AA 150-C término | - | Sí |
| Anti-SCXA antibody | abcam | N- término | Sí | - |
| SCXA Antibody- C-terminal región (OAAB00449) | Aviva System Biology | C-término | Sí | - |
| Anti Scleraxis (SCX) (C-térm) | Acris Antibodies GmbH | C- término | Sí | - |
| Anti-SCX Antibody (aa172-201) | LifeSpan BioSciences | AA 172-201 | - | - |
| SCXA Polyclonal Antibody | Invitrogen Antibodies | AA 172-207 | Sí | - |
| Anti-SCXA (N-terminal) polyclonal antibody | Creative Diagnostic | N-término | Sí | - |

Conclusiones

- * Los pacientes que sufren ES y FPI presentan niveles altos de Scx en suero en comparación con sujetos sanos.
- * Dentro del grupo de pacientes con FPI y ES, los pacientes con mayor discapacidad pulmonar con CPT severa al igual que aquellos que presentan fases tardías, son también quienes presentaron los niveles más altos de Scx en suero sanguíneo.
- * Con base en los resultados de pacientes con FPI y ES es posible afirmar que los niveles de Scx en suero funcionan como un marcador de fibrosis en dichas enfermedades.
- * La instilación intratraqueal de 7mg/kg de bleomicina utilizando inyección intratraqueal probó ser funcional en la generación de fibrosis pulmonar en ratones de la cepa C57BL/6. Los ratones con fibrosis pulmonar presentaron niveles altos de hidroxiprolina en comparación con los controles. Por otro lado, cortes histológicos de pulmones de los mismos ratones presentaron focos de daño fibrótico con la coloración azul característica de la tinción tricrómica de Masson.
- * Las concentraciones de Scx medidas en suero de ratones fueron muy cercanas al blanco y sin incrementos significativos en ratones con fibrosis pulmonar documentada por niveles incrementados de hidroxiprolina y por daño fibrótico a nivel histológico.

Apéndice

Fumador: Todo paciente que actualmente continúe con dicho hábito *

Exfumador: El paciente ha permanecido por lo menos 1 año sin fumar *

No fumador: El paciente nunca tuvo dicho hábito *

* *Parámetros establecidos por la Dra. Iveth Buendía, Neumóloga del INER*

Hipertensión: Valores superiores a 139 mmHg en la presión sistólica y 89mmHg en la presión diastólica [54].

Sin hipertensión: Valores dentro del rango normal, 130-139 mmHg en la presión sistólica y 80-89 en la presión diastólica [54].

Obesidad: Se tomaron como referencia los valores del Índice de Masa Corporal (IMC) reportado por la OMS [55].

- Obesidad: IMC>25
- Sin Obesidad: IMC<25

Espirometría: Test de función pulmonar diseñado para medir tanto el flujo como los volúmenes pulmonares, se realiza en condiciones relajadas y forzadas [51].

- Capacidad Vital: Se refiere a los volúmenes dinámicos de los pulmones, es decir, la cantidad de aire que un individuo es capaz de inhalar y exhalar en condiciones relajadas [51].
 - Capacidad Vital Forzada (CVF): Se refiere al volumen total de aire que un individuo es capaz de expulsar luego de una inhalación total, una CVF normal corresponde a aproximadamente 4.6 litros [51].
- Capacidad Pulmonar Total (CPT): Es el volumen total de aire que pueden contener los pulmones después de una inhalación máxima voluntaria, una persona normal es capaz de inhalar aproximadamente 6 litros [51].
- Saturación de Oxígeno (Sat. O₂): Se refiere a la cantidad de oxígeno disponible en sangre, se considera que el porcentaje adecuado de oxígeno en sangre es de entre 90-100% [51].

Lavado Bronquioalveolar (LBA): Procedimiento poco invasivo para obtener una muestra de células alveolares. En pacientes con enfermedades pulmonares es utilizado para la recolección de datos importantes como los linfocitos, neumocitos y macrófagos. El hábito de tabaquismo de los pacientes, afecta en gran medida los valores esperados en los LBA para una persona sana, sin embargo, los porcentajes son cercanos a 87.6% para los macrófagos y 9% para los linfocitos. [56].

SCL70: Anticuerpos anti-topoisomerasa I

ACA: Anticuerpo anti-centrómero

ANA: Anticuerpos anti-nucleares

Bibliografía

- [1] Leslie P. G., James L. H. "Texto Atlas de Histología". Segunda edición. McGraw-Hill Interamericana; 2003.
- [2] Harding R., Pinkerton K. E. "The lung development, aging and the environment, Segunda edición. California, USs: Academic Press; 2014.
- [3] Buzan M.T, Pop C. M. "State of the art in the diagnosis and management of interstitial lung disease". *Culujul Medical* (2015) Vol. 88 (2): 116-123.
- [4] Reyrson CJ, Collard HR. "Update on the diagnosis and classification of ILD". *Curr Opin Med.* (2013) Vol. 19 (5): 453-459.
- [5] Peros T., Sharma P. "Clinical atlas of interstitial lung disease". Springer; 2006
- [6] King T. E., Pardo A., Selman M. "Idiopathic pulmonary fibrosis". *Lancet* (2011) Vol. 378 (11): 1949-1961.
- [7] Meyer K. C., Nathan S. D. "Idiopathic Pulmonary Fibrosis a Comprehensive Clinical Guide". Nueva York: Human Press; 2014.
- [8] Taskar V. S, Coultas D. B. "Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease?" *Proc Am Thorac Soc.* (2006) Vol. 3 (8): 293-298.
- [9] Selman M, King TE Jr, Pardo A. "Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy" *Ann Intern Med* (2001) Vol. 134 (51): 136-161.
- [10] Sisson TH, Mendez M, Choi K, et al. "Targeted injury of type II alveolar epithelial cells induces pulmonary fibrosis" *Am J Respir Crit Care Med* (2010) Vol. 181 (63): 254-263.
- [12] ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis "An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management". *Am J Respir Crit Care Med* (2011) Vol 183: 788-824.
- [12] Selman M. "Hypersensitivity pneumonitis: a multifaceted deceiving disorder". *Clinical Chest Med* (2004), Vol. 25: 531-547.
- [13] Ohtani Y, Saiki S, Sumi Y, Inase N, Miyake S, Costabel U, et al. "Clinical features of recurrent and insidious chronic bird fancier's lung". *Ann Allergy Asthma Immunol* (2003) Vol. 6: 604-614.
- [14] Pérez-Padilla R, Salas J, Chapela R, Carrillo G, Pe´rez R, Sansores R, et al. "Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeders lung compared to those with usual interstitial pneumonia". *American Revisions Respiratory Diseases* (1993) Vol. 148: 49- 53.
- [15] Selman M. "Hypersensitivity pneumonitis". In: Schwarz M, King T., editors. *Interstitial lung disease* (2003): 454 (84), Ontario: BC Decker INC.
- [16] Patel AM, Ryu JH, Reed CE. "Hypersensitivity pneumonitis: current concepts and future questions". *Allergy Clin Immunol* (2001) Vol. 108: 661-670.
- [17] Bourke SJ, Dalphin JC, Boyd G, McSharry C, Baldwin CI, Calvert JE. "Hypersensitivity pneumonitis: current concepts". *Eur Respir* (2001), Vol. 18 (Sup 32): 81s-92s.

- [18] Malmberg P, Rask-Andersen A, Rosenhall L. "Exposure to microorganisms associated with allergic alveolitis and febrile reactions to mold dust in farmers" *Chest* (1993), Vol. 103: 1202-1209
- [19] Engelhart S, Sennekamp J, Gilges S, Pleischl S, Exner M. "Workplace-related complaints due to exposure to contaminated humidifier water and the VDI guideline". *Medical Researches* (2000), Vol. 5: 126-140.
- [20] Yannick A., Simms R., Distler O., Trojanowska M., Pope J., Denton C. P., Varga J. "Systemic sclerosis, *Nature Reviews*". *Disease Primers* (2015), Vol 1: 1-21.
- [21] Le Roy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, et al. "Scleroderma (systemic sclerosis); classification, subsets and pathogenesis". *J. Rheumatology* (1988) Vol. 15: 202
- [22] Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA Jr, Altman R, D'Angelo W, Fries J, et al. "Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma)" *Arthritis Rheumatology* (1980), Vol. 23: 581-590.
- [23] Le Roy EC, Medsger TA Jr. "Criteria for the Classification of Early Systemic Sclerosis. *J Rheumatol* (2001), Vol. 28: 1573
- [24] Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M. "Autoantigenic epitopes on DNA topoisomerase I: Clinical and immunogenetic associations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatology* (1993), Vol. 36: 1406
- [25] Sogol A., Paul M., Daniel E. F., Philip J. C., Weeng K. W., Arnold E. P., Puja P. K., Dinesh K. "Course of modified Rodnan Skin Thickness Score in Systemic Sclerosis Clinical Trials". *Arthritis & Rheumatism* (2009), Vol. 60 (8): 2490-2498.
- [26] Medsger T.A. Jr. "Systemic Sclerosis (scleroderma): clinical aspects. En: Koopman W. J., ed. *Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology*, 14^o Ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins (2001): 1590
- [27] Saavedra-Salinas MA, Carrillo- Vázquez SM. "Fenómeno de Raynaud". *Rheumatology Clinical* (2006), Vol. 2 (sup 3): S10.
- [28] Rose S, Young MA, Reynolds JC. "Gastrointestinal manifestations of scleroderma". *Gastroenterol Clinical North A.* (1998), Vol. 27: 563.
- [29] Vera-Lastra O. "Esclerosis sistémica y tracto gastrointestinal: Abordaje diagnóstico y terapéutico", *Rheumatology Clinical* (2006), Vol. 2 (sup 3): S24
- [30] Navarro C. "Afección pulmonar en la esclerosis sistémica. Alveolitis, fibrosis, hipertensión arterial pulmonar". *Rheumatology Clinical* (2006), Vol. 2 (sup 3): S16
- [31] Silveira-Torre LH. "Afección cardíaca en la esclerosis sistémica" *Rheumatology Clinical* (2006), Vol. 2 (sup 3): S31
- [32] Jara L., Barrera A. "Afección renal en la esclerosis sistémica" *Rheumatology Clinical* (2006), Vol. 2 (sup 3): S20
- [33] Moeller A., Ask K., Warburton D., Gaudie J., Kolb M. "The bleomycin animal model: A useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis?" *International J. of Biochem. & Cell Bio.* (2008), Vol. 40 (3): 363-382
- [34] Adamson, I. Y. "Pulmonary toxicity of bleomycin". *Environ. Health Perspect.* (1976), Vol. 16: 119-125

- [35] Chaudhary, N. I., Schnapp, A., Park, J. E. "Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model". *AM. J. Respir. Crit. Care Med.* (2006), Vol. 173 (7): 769-776
- [36] Uduki, K. F. Y., "Evolution of three patterns of intra-alveolar fibrosis produce by bleomycin in rats"
- [37] Izbicki, G., Segel, M. J., Christensen, T. G., Conner, M. W., Breuer, R. "Time course of bleomycin-induced lung fibrosis". *Int. J. Exp. Pathol* (2002), Vol. 83 (3): 111-119
- [38] Phan, S. H., Kunkel, S. I. "Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis" *Exp. Lung Res.* (1992), Vol. 18 (1): 29-32
- [39] Walters D. M., Kleeberger S. R., "Mouse models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis" *Current Prot. Pharma.* (2008), Chapter 5: Unit 5.46 (40): 1-17
- [40] Espira L., Lamoureux L., Jone. S. C., Gerard R. D., Dixon I. M.C., Czubryt M. P. "The basic helix-loop-helix transcription factor scleraxis regulates fibroblast collagen synthesis". *J Mol Cell Cardiol* (2009), Vol. 47: 188-195.
- [41] Ramirez F., Tanaka S., Bou-Gharios G. "Transcriptional regulation of the human $\alpha 2$ (I) collagen (COL1A2), an informative model system to study fibrotic diseases". *Matrix Biology* (2006), Vol. 25: 365-372.
- [42] Asish K. "Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis" Department of medicine, University of Illinois, Chicago, Illinois (2002): 301-314.
- [43] Li Y., Ramcharan M., Zhou Z., Leong D., Akinbiyi T-. Majeska R., Sun H. "The role of scleraxis in fate determination of mesenchymal stem cells for tenocyte differentiation" *Scientific Reports* (2015) (5:13149) www.nature.com/scientificreports/
- [44] Cserjesi P., Brown D., Ligon L. K., Lyons G. E., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Olson E. N. "Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that figure s skeletal formation during mouse embryogenesis" *Development* (1995), Vol. 121: 1099-1120
- [45] Murchison N.D., Price B .A., Conner D.A., Keene D .R., Olson E.N., Tabin C.J., Schweitzer R., "Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons" *Development* (2007), Vol. 134 (14): 2697-2708.
- [46] Rushita A. B., Michael P. C. "Synergistic roles of scleraxis and Smads in the regulation of collagen 1 $\alpha 2$ gene expression" (*BBA*)-*Molecular Cell Research* (2012), Vol. 1823 (10): 1936-1944
- [47] Swynghedauw B. "Molecular mechanisms of myocardial remodeling" *Physiol Rev* (1999), Vol. 79 (62): 215.
- [48] Adamson I. Y. R., "Pulmonary Toxicity of Bleomycin" *Enviro. Health Perspectives* (1976), Vol. 16: 119-126
- [49] DuPage M., Dooley A., Jacks T. "Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of Cre recombinase" *Nature Protocols* (2009), Vol 4 (8): 1064
- [50] "Guidelines for Collection of Blood from Laboratory Animals" Thiel College Institutional Animal Care and Utilization Committee.
- [51] Borg B., M., Thompson B., R., O'Hehir R., E. "Interpreting Lung Function Test, A step by step guide". Ed. Wiley Blackwell (2014): 13-36.

[52] Satoh., Vázquez-Del Mercado M., Chan E. K. L. "Clinical interpretation of antinuclear test in systemic rheumatic diseases" *Mod. Rheumatol. Author manuscript* (2009), Vol. 19 (3): 219-228.

[53] Dull T. A., Henneman P. H. "Urinary hidroxiprolina as an index of collagen turnover in bone". *The New England Journal of Medicine* (1963), Vol. 268 (3): 132-134.

[54] World Health Organization "A global brief on hypertension", WHO Press (2013), Document number: WHO/DCO/WHO/2013.2 (www.who.int)

[55] World Health Organization "Obesidad y Sobrepeso" Notas descriptivas (2016), N°311 (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/)

[56] King. T., E. Jr "Role of bronchoalveolar lavage in diagnosis of interstitial lung disease" *Curr Opin Pulm Med* (2005) Vol. 11: 417-421