



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EFFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LAS DESACETILASAS DE HISTONAS EN LA FIBROSIS
PULMONAR EXPERIMENTAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
TOSCANO MÁRQUEZ MARÍA FERNANDA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

EFFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LAS DESACETILASAS DE HISTONAS EN LA FIBROSIS
PULMONAR EXPERIMENTAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

TOSCANO MÁRQUEZ MARÍA FERNANDA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2018



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 06 de noviembre de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **TOSCANO MÁRQUEZ MARÍA FERNANDA** con número de cuenta **304715888**, con la tesis titulada **"EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LAS DESACETILASAS DE HISTONAS EN LA FIBROSIS PULMONAR EXPERIMENTAL"**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA**:

Presidente: M. EN C. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA
Vocal: DR. VÍCTOR MANUEL RUÍZ LÓPEZ
Secretario: DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS
Suplente: DRA. LORENA AGUILAR ARNAL
Suplente: DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 11 de enero de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme la oportunidad de pertenecer a tan distinguido programa.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

- Por su invaluable apoyo agradezco de manera muy especial a mi tutor:
Dr. José Guadalupe Cisneros Lira

- A mi comité tutor integrado por la Dra. María Sandra Cabrera Benítez y el Dr. Ernesto Soto-Reyes Solís por sus sugerencias y comentarios que permitieron que este proyecto tomara el mejor rumbo para que se concluyera de manera satisfactoria.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

- Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) por la aportación del material biológico.
- Al Laboratorio Nacional de Soluciones para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT) de la Facultad de Ciencias de la UNAM por las facilidades brindadas en el uso de sus instalaciones y equipos, así como su aportación de reactivos.
- A mi tutor el Dr. José Cisneros Lira por apoyarme siempre en todos los sentidos y darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo.
- A los investigadores de los laboratorios del INER-Facultad de ciencias ya que a pesar de sus múltiples ocupaciones siempre tuvieron tiempo para explicarme y enseñarme las técnicas y brindarme su apoyo.
- A todos mis amigos y compañeros de laboratorio por brindarme su apoyo, consejos y ayuda.
- Un agradecimiento especial a mi familia por su apoyo incondicional y por alentarme a seguir adelante.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ANTECEDENTES	7
Fibrosis Pulmonar	7
Modelo experimental de fibrosis pulmonar.....	8
Desacetilasas de histonas (HDACs).....	9
HDAC6.....	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
METODOLOGÍA	17
<i>Modelo murino de fibrosis pulmonar</i>	17
<i>Histología</i>	17
<i>Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia</i>	17
<i>Actividad de la HDAC6</i>	18
<i>Extracción de histonas</i>	19
<i>Extracción de fibroblastos y cultivo de células</i>	19
<i>Western Blot</i>	20
<i>Lavado bronquioalveolar</i>	21
<i>Cuantificación de Interleucina 6 (IL-6)</i>	21
<i>Determinación de colágena</i>	22
<i>PCR</i>	22
<i>Ensayo de proliferación</i>	23
<i>Ensayo de migración</i>	24
<i>Análisis estadístico</i>	24
RESULTADOS.....	25
<i>Modelo en etapa inflamatoria a 7 días</i>	25
➤ Efectos de la TSA y TubA en la actividad de la HDAC6 y en la acetilación de proteínas en la etapa inflamatoria.	25
➤ El tratamiento con TSA o TubA atenúan el proceso inflamatorio en ratones instilados con bleomicina	28
<i>Modelo etapa de fibrotica a 28 días</i>	32

➤ TSA y TubA incrementan la acetilación de proteínas y reducen la actividad de la HDAC6 en la fibrosis	32
➤ El tratamiento con TSA o TubA reduce la fibrosis pulmonar en ratones instilados con bleomicina.....	37
<i>Ensayos funcionales a 21 días</i>	41
➤ TSA y TubA disminuyen el efecto inducido por bleomicina en procesos asociados al desarrollo de fibrosis.	41
➤ TSA y TubA disminuyen la migración celular	44
➤ <i>TSA disminuye la activación de la vía de señalización del TGF-β1</i>	46
➤ <i>TSA y TubA reducen la proliferación y migración en la línea de células epiteliales de ratón MLE12</i>	47
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	55
LITERATURA CITADA	56

ABREVIATURAS

Acetil-CoA:	acetil coenzima A
ACTA2:	alfa actina de musculo liso en ratón
Bleo:	Bleomicina
B+TubA:	Bleomicina con Tubastatina A
B+TSA:	Bleomicina con Tricostatina A
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DNMT:	DNA metiltransferasas
EPID:	Enfermedades pulmonares intersticiales difusas
FPI:	Fibrosis pulmonar idiopática
H2:	Histona 2
H3:	Histona 3
H3K9K14ac:	Acetilación de la lisina 9 y 14 de la histona 3
H4:	Histona 4
H4K16ac:	Acetilación de la lisina 16 de la histona 4
HAT:	Acetiltransferasa de histonas
HDAC:	Desacetilasa de histonas
HDAC6:	Desacetilasa de histona 6
HyP:	Hidroxiprolina
IFN- γ :	Interferón gamma
IL-1:	Interleucina 1
LBA:	Lavado bronquio alveolar
L-LBA:	Líquido de lavado bronquio alveolar
μ l:	Micro litros
μ g:	microgramos
ml:	Mililitros
NF- κ B:	Factor nuclear κ B
NH:	Neumonitis por hipersensibilidad
PBS:	buffer fosfato salino
RNA:	Ácido ribonucleico
SAHA:	Ácido hidroxámico suberoilánilida
TubA	Tubastatina A

TGF- β 1:	Factor de crecimiento transformante beta 1
TNF α :	Factor de necrosis tumoral alfa
TSA	Tricostatina A
VPA	Ácido valproico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo del modelo murino de fibrosis pulmonar.	9
Figura 2. Esquema de la prevalencia de la acetilación de las lisinas (K) en diversos procesos celulares.....	11
Figura 3. Clasificación de las HDACs.....	12
Figura 4. TSA y TubA incrementan la acetilación global de las proteínas	26
Figura 5. Actividad de HDAC6 en el modelo de fibrosis pulmonar experimental a 7 días	27
Figura 6. Western blot para HDAC6.....	28
Figura 7. Micrografías representativas a 7 días del efecto de TSA y TubA en la etapa inflamatoria del modelo de fibrosis inducida con bleomicina.....	29
Figura 8. Efecto del TSA y TubA en la celularidad del lavado bronquioalveolar	30
Figura 9. TSA y TubA reducen la cantidad de la interleucina 6 en el lavado bronquioalveolar.....	31
Figura 10. Efecto de TSA y TubA en la expresión del factor de transcripción NF- κ B2.	32
Figura 11. Efecto de TSA y TubA en la acetilación global y H3K9K14ac en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.....	35
Figura 12. Inmunoblot para proteínas acetiladas en el modelos de fibrosis pulmonar experimental a 28 días.....	35
Figura 13. Actividad de HDAC6 en el modelos de fibrosis pulmonar experimental a 28 días	36
Figura 14. Inmunoblot para HDAC6 en muestras a 28 días.	37
Figura 15. Micrografías representativas a 7 días del efecto de TSA y TubA en la etapa inflamatoria del modelo de fibrosis inducida con bleomicina.....	38
Figura 16. Efecto de TSA y TubA en el depósito de matriz extracelular en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.....	39
Figura 17. Contenido de hidroxiprolina en pulmones instilados con bleomicina y con el tratamiento con los inhibidores de desacetilasas de histonas.	40
Figura 18. Expresión de RNA mensajero de moléculas fibrosantes	41
Figura 19. Inhibidores de desacetilasas disminuyen la proliferación de fibroblastos derivados de ratones control e instilados con bleomicina y tratados con TSA y TubA	43
Figura 20. Tratamiento in vitro con inhibidores de desacetilasas disminuyen la proliferación.....	44

Figura 21. Inhibidores de desacetilasas disminuyen la migración de fibroblastos derivados de ratones control e instilados con bleomicina y tratados con TSA y TubA	45
Figura 22. Tratamiento in vitro con inhibidores de desacetilasas disminuyen la migración	46
Figura 23. . Inmunoblot para Smad2/3 fosforilado en fibroblastos derivados de ratones control, instilados con bleomicina y tratados con TSA o TubA	47
Figura 24. TSA y TubA reducen la proliferación y migración en la línea de celular MLE12	48

RESUMEN

La fibrosis pulmonar inducida con bleomicina se caracteriza por inflamación epitelial seguida por una fibrosis en el intersticio pulmonar. Las enzimas desacetilasas de histonas (HDAC's) participan en diferentes procesos patológicos pero su papel en el desarrollo de esta enfermedad aún no se conoce con precisión. El objetivo de este proyecto fue investigar los efectos de la inhibición de HDAC's en el desarrollo de la fibrosis pulmonar inducida con bleomicina.

Ratones de la cepa C57BL/6 fueron instilados con bleomicina (7 U/Kg) para inducir fibrosis y se trataron con tricostatina A (TSA) o con Tubastatina A (TubA) durante 7, 21 o 28 días. Como controles se utilizaron ratones sin bleomicina y tratados con los inhibidores o con el vehículo. Se determinó el grado y la extensión de las lesiones mediante la tinción H&E, en el lavado bronquio alveolar se cuantificó la concentración de la IL-6 y se hizo un conteo total y diferencial de células. El depósito de colágena se evaluó con un ensayo de hidroxiprolina y la expresión de colágena, TGF-beta y α -Actina de músculo liso se cuantificaron por PCR en tiempo real. Se analizó el efecto de los inhibidores en la migración y proliferación de fibroblastos aislados del pulmón y en una línea comercial de células epiteliales.

Se observó una reducción del grado y extensión de las lesiones inflamatorias y fibroticas en los animales instilados con bleomicina y tratados con TSA o TubA en comparación con los animales que solo recibieron bleomicina. Adicionalmente, se encontró una disminución significativa en el depósito de colágena en el pulmón de los ratones tratados con los inhibidores (83.55 ± 9.9 ug Hyp en el grupo B+TSA; 81.94 ± 5.6 en Bleo+Tub-A vs $170 \pm 19,7$ en Bleo). El tratamiento con TSA o TubA disminuye significativamente la expresión de Col1A1 y del marcador de miofibroblastos α -SMA ($p < 0.01$), así como los niveles de IL-6. Los ensayos funcionales en fibroblastos de pulmón y en células epiteliales muestran que ambos inhibidores disminuyen la proliferación y la migración que se induce con bleomicina. Adicionalmente, se observó un incremento de la acetilación de la histona H3K9K16 en el tejido de los ratones con bleomicina que fueron tratados con TubA.

Los resultados sugieren que la inhibición de las desacetilasas de histonas y en particular de la HDAC-6, tiene un papel protector en el desarrollo de la fibrosis pulmonar inducida con bleomicina, lo cual podría deberse a una reducción de la respuesta inflamatoria. Adicionalmente, los ensayos funcionales en células muestran que la modificación de histonas desempeña un papel clave en la regulación del fenotipo proliferativo característico de la fibrosis.

ABSTRACT

Effects of histone deacetylase inhibitors on the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis.

Lung fibrosis induced with bleomycin is characterized by activation, proliferation and differentiation of fibroblasts, with the subsequent abnormal deposit of extracellular matrix, which leads to the destruction of the pulmonary architecture and ultimately to death. There is sufficient evidence that the histone deacetylases (HDACs) play important roles in different pathological processes. However, the role of HDACs in the development and progression of pulmonary fibrosis remains unclear. We aim to investigate the effect of HDACs inhibitors on collagen deposition in bleomycin-treated mouse lungs and their involvement in fibroblasts proliferation and migration.

We developed an experimental model of pulmonary fibrosis in C57BL/6 mice that were instilled intratracheally with a single dose of 7 U/kg of bleomycin. In the 1st day after instillation, mice were treated with trichostatin A (TSA) or tubastatin A (TubA) administered daily in PBS/0.5% DMSO. Mice were euthanized 7, 21 and 28 days after bleomycin instillation. Lung tissues were used for histological analysis of inflammation and fibrosis and collagen content was determined by hydroxyproline measure. Bronchioalveolar lavage was used to analyze the leukocyte infiltrate and inflammatory cytokines. Additionally, fibroblasts from bleomycin and HDAC inhibitors treated lungs were isolated for proliferation and migration assays.

Results showed that TubA treatment attenuate the inflammatory response induced by bleomycin by decreasing neutrophil infiltrate, IL-6 and NF- κ B expression. Histology results showed a correlation between a higher number of H3K9K16ac positive cells and a lower grade of lung damage and extension of fibrotic areas in those animals treated with HDACs inhibitors compared with bleomycin alone. Additionally, there was a significant reduction of lung collagen content in mice treated with TSA and TubA ($p < 0,01$) compared with bleomycin alone. The proliferative feature of the fibroblasts isolated from lungs of mice treated with bleomycin was significantly decreased after 48 hrs of treatment with TSA or TubA. Similar results were observed in a line of fibroblasts and on mouse epithelial cells. Finally, wound

closure assay showed that in vitro treatment with TSA and TubA on fibroblasts and epithelial cells reduces cell migration.

These results suggest a putative protective role of TSA and TubA as shown in the murine model of pulmonary fibrosis. Our findings in fibroblasts demonstrate a critical role of histone modifications in the characteristic signature of fibro proliferative-migratory feature of pulmonary fibrosis. However, future experiments concerning to fibroblasts transmigration and apoptosis are necessary to confirm this hypothesis.

INTRODUCCIÓN

La fibrosis pulmonar es una patología crónica y degenerativa que representa la fase final de diferentes enfermedades que afectan al pulmón y se caracteriza por una excesiva proliferación de fibroblastos y depósito descontrolado de matriz extracelular¹. Una de las proteínas claves en el desarrollo de esta enfermedad es el TGF- β 1 que estimula la proliferación de fibroblastos, promueve la diferenciación a miofibroblastos induciendo la expresión de alfa actina de musculo liso (α -SMA) y favorece la síntesis y depósito de colágena. Todos estos mecanismos provocan la destrucción de la arquitectura pulmonar y la pérdida de la función del órgano que en muchos de los casos resulta letal^{1,2}.

Mecanismos epigenéticos, como la acetilación y desacetilación de residuos de lisinas en las histonas H3 y H4 pueden regular la expresión génica y diversas funciones celulares. La acetilación es regulada por la acción de enzimas acetilasas de histonas (HAT) y favorece la transcripción. Por su parte, la desacetilación se da por acción de enzimas deacetilasas de histonas (HDAC) y favorece la represión transcripcional. Los inhibidores de desacetilasas de histonas (HDAC) pueden modificar la expresión de genes específicos induciendo un ambiente de acetilación de histonas y también actúan sobre proteínas no histónicas³.

Diferentes estudios han demostrado que las HDAC tienen un papel importante en el desarrollo de la fibrosis en múltiples órganos. Se ha demostrado *in vitro* que inhibidores de HDACs como el SAHA pueden inducir apoptosis en fibroblastos y puede abrogar la síntesis de colágena inducida por TGF- β 1⁴. Otros inhibidores como el TSA y el ácido valpróico (VPA) inducen la hiperacetilación de las histonas H3 y H4, reducen la expresión de genes pro fibroticos y disminuyen la síntesis de proteínas de matriz extracelular^{5,6}.

La HDAC6 es una desacetilasa de Clase II que se localiza principalmente en citoplasma aunque también se encuentra en núcleo. Además de las histonas, uno de los principales sustratos fisiológicos de la HDAC6 es la tubulina- α acetilada, y también tiene efectos sobre la cortactina que son componentes del citoesqueleto y participan en la división celular, el tráfico de proteínas y la motilidad celular. En carcinoma de esófago la reducción en la expresión de la HDAC6, puede inhibir la

proliferación celular, mediante el arresto del ciclo celular en la fase G0 / G1 y un incremento en la expresión de p21 y se ha demostrado que esta desacetilasa participa en la migración e invasión de diferentes tipos celulares^{7,8}.

ANTECEDENTES

Fibrosis Pulmonar

El pulmón es el órgano encargado de realizar el intercambio gaseoso en las partes distales donde se ubican las unidades alveolo-capilares. En el caso de la fibrosis pulmonar, estas unidades funcionales se afectan debido al engrosamiento del intersticio pulmonar y las paredes alveolares por la acumulación de tejido cicatrizante que conducen a una destrucción de la arquitectura pulmonar e insuficiencia respiratoria que finalmente puede concluir en la muerte del individuo.

La fibrosis pulmonar es la consecuencia final de diferentes patologías agrupadas como enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPIDs) y pueden ser de causa conocida o desconocida⁹. Entre las patologías de causa conocida se encuentran la exposición a partículas orgánicas e inorgánicas; por ejemplo, la neumonitis por hipersensibilidad que afecta frecuentemente a personas que tienen contacto con aves, se da por la exposición a proteínas que se encuentran en las plumas y el excremento que inducen una reacción inflamatoria que desencadena fibrosis. La exposición a partículas inorgánicas como carbón, asbesto o silicio también pueden desencadenar procesos fibróticos en el pulmón¹⁰.

Dentro de las EPID de etiología desconocida, la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la más agresiva y letal¹. La FPI es una patología asociada al envejecimiento que ocurre principalmente en individuos adultos entre la 5^o y 6^o década de vida. Se presenta de manera progresiva e irreversible y hasta la fecha no existe una cura o tratamiento eficaz lo que la caracteriza como una enfermedad letal en un periodo de 3-5 años después de que aparecen los primeros síntomas. Diversos factores de riesgos tanto ambientales como genéticos han sido reportados en estos pacientes. Entre los factores ambientales, el hábito de fumar es el principal y se ha asociado con una rápida progresión de la enfermedad,^{11,12} así mismo, diversos estudios han señalado polimorfismos en genes relacionados con el sistema inmune, la adhesión celular y la reparación al ADN. En un estudio de asociación del genoma completo con una gran cantidad de pacientes se encontraron variantes de riesgo en genes involucrados en la integridad del epitelio pulmonar (DSP, DPP9 y CTNNA3) y en la mucina pulmonar (MUC5B).¹³ Los genes para TERC y TERT involucrados en la

extensión de los telómeros se han reportado en casos de FPI familiar ¹⁴. Esencialmente para FPI, la investigación está enfocada en encontrar un tratamiento capaz de revertir la progresión de la enfermedad ¹⁵.

Modelo experimental de fibrosis pulmonar

Los modelos animales juegan un papel importante en la investigación de enfermedades humanas y muchos se han establecido para estudiar la fibrosis pulmonar. Los métodos más comunes incluyen daño por radiación, instilación de bleomicina, sílice o asbesto y animales transgénicos. Hasta la fecha, el método más usado para la inducción de fibrosis pulmonar experimental en animales es la administración de bleomicina^{16,17}.

La bleomicina es un glicopéptido aislado del hongo *Streptomyces*, utilizado como agente quimioterapéutico que ejerce su efecto citotóxico a través de la generación de especies de reactivas de oxígeno y por daño directo al DNA y RNA induciendo la muerte celular. Uno de los principales efectos secundarios del tratamiento con bleomicina en pacientes con cáncer es el desarrollo de fibrosis pulmonar, esto debido a la ausencia de hidrolasa de bleomicina en este órgano¹⁸.

En el modelo murino de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina los efectos de la toxicidad pulmonar son similares a las de humanos. La administración intratraqueal de bleomicina produce daño directo al epitelio alveolar, lo cual induce la liberación de citocinas y factores de crecimiento que participan como quimio atrayentes de células inflamatorias y fibroblastos¹⁷. En la evolución de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina hay dos etapas marcadas (Figura 1), en la etapa inicial la bleomicina causa reacciones inflamatorias en un corto período de tiempo. Después de la instilación hay un incremento inicial de citocinas pro-inflamatorias como la interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y el interferón gamma (INF- γ), alcanzando el pico más alto en el día 7 después de la instilación. La etapa inflamatoria se caracteriza por un infiltrado leucocitario agudo, principalmente linfocitos, los cuales son capaces de secretar moléculas inflamatorias como interleucinas 10, 6 y 2 y factores quimio tácticos de

fibroblastos que influyen en la migración, proliferación y activación de los fibroblastos para dar paso a la etapa fibrótica del modelo^{18,19}.

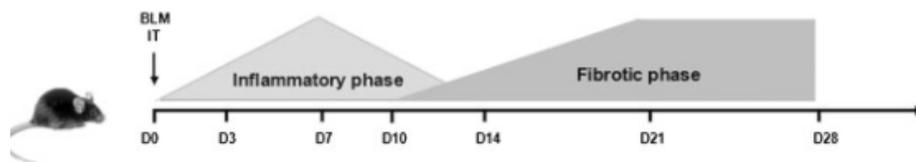


Figura 1 Esquema representativo de las fases del modelo murino de fibrosis pulmonar.

El inicio de la etapa inflamatoria es a partir de la instilación de la bleomicina alcanzando el pico máximo a los 7 días y posteriormente comienza la disminución de citocinas inflamatorias e inicia la expresión de las citocinas factores pro-fibrotica los 10 días. La fase fibrótica alcanza su pico más alto a los 21 días.²⁰

A partir del décimo día se observa una reducción significativa de citocinas pro-inflamatorias y un incremento en la expresión de marcadores pro-fibroticos (Figura 1) como el factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1), fibronectina, colágena, con un pico alrededor del día 21 y se mantiene hasta el día 28 cuando hay un máximo depósito de colágena en el intersticio pulmonar. La desventaja del modelo murino de fibrosis pulmonar es la corta duración del proceso fibrótico, ya que en los ratones comienza a revertirse el proceso fibrótico a partir de los 28 días. A pesar de esto, el modelo de bleomicina ha servido para determinar el papel de diversas moléculas en el proceso inflamatorio y fibrótico en el pulmón^{19,16,21}.

Desacetilasas de histonas (HDACs)

La expresión génica está regulada por diferentes mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA y las modificaciones post traduccionales de las histonas. El establecimiento y mantenimiento de estas marcas induce una conformación activa o inactiva de la cromatina, permitiendo o reprimiendo la transcripción génica²². Una de las modificaciones más estudiadas es la acetilación y desacetilación de las histonas. Éste es un proceso dinámico controlado por dos familias de enzimas: las acetiltransferasas de histonas (HAT) y las desacetilasas

histonas (HDAC). El equilibrio entre las acciones de estas enzimas sirve como un mecanismo regulador para la expresión génica así como de numerosos procesos de desarrollo y en diversas patologías.^{23,24}.

La acetilación de las histonas modula la transcripción de genes de diferentes maneras. Por un lado, la acetilación de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina dentro de las colas de histonas neutraliza la carga positiva de la histona, con lo que la interacción DNA-histona dependiente de cargas se debilita permitiendo la relajación de la estructura de la cromatina y por lo tanto se facilita el acceso de la maquinaria de transcripción, en consecuencia la transcripción del gen puede ocurrir.²⁵ Las histonas acetiladas también funcionan como sitios de unión para proteínas de bromodominio, las cuales funcionan en su mayoría como activadores transcripcionales. Por el contrario las HDAC retiran los grupos acetilo con lo que se induce la compactación de la cromatina y por lo tanto la represión transcripcional.²⁶

En la última década, el conocimiento acerca de la acetilación como una modificación post traduccional de proteínas se ha expandido. Se sabe que esta modificación tiene efecto en otros tipos de proteínas como factores de transcripción, donde puede modificar su capacidad de unirse al DNA regulando la expresión génica de forma positiva o negativa. Interactúan con otras proteínas nucleares, enzimas metabólicas y proteínas de señalización en citoplasma y pueden alterar la función de proteínas del citoesqueleto, (Figura 2).^{27, 23, 28}.

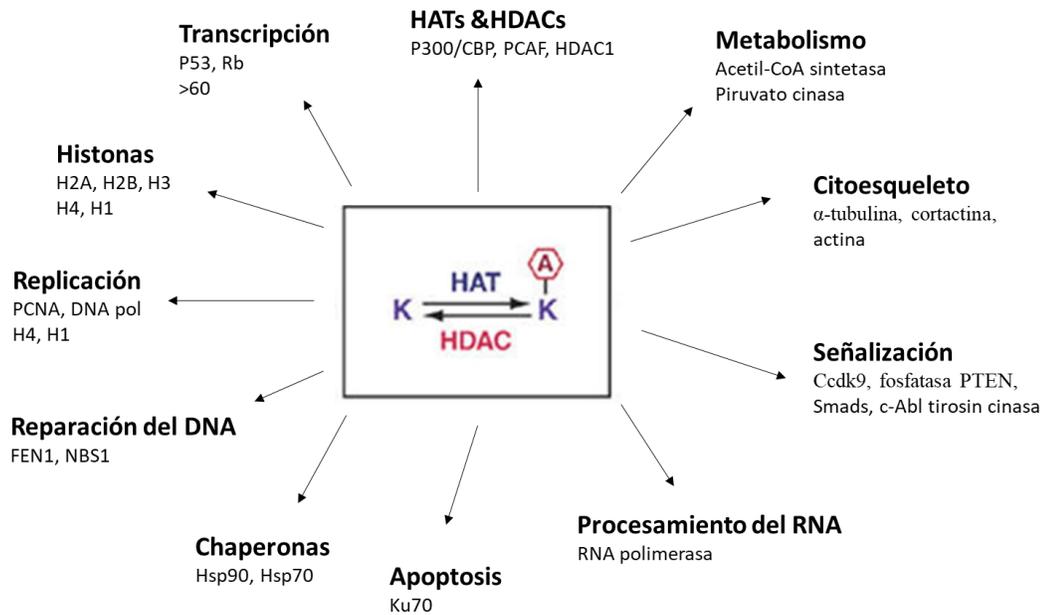


Figura 2 Esquema de la prevalencia de la acetilación de las lisinas (K) en diversos procesos celulares. El esquema ejemplifica algunas de las proteínas que son reguladas por la acetilación en los procesos celulares. Para cada proceso sólo se enumeran las proteínas representativas. Imagen modificada de Strahl, B. D., 2000. ²⁸

Las enzimas HDAC se oponen a los efectos de las HATs por lo cual eliminan el grupo acetilo del aminoácido lisina por una unión N-e acetil lisina con el átomo de zinc en el sitio activo. Tras la activación el grupo N-acetilo es atacado por una molécula de agua, produciendo un lisina libre y ácido acético, lo cual restaura la carga positiva de la lisina y provoca la estabilización de la arquitectura de la cromatina local lo que conlleva a una represión transcripcional.²⁹

Las HDACs también son responsables de la desacetilación de los residuos de lisina de un gran conjunto de proteínas que participan en diferentes funciones como factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto, proteínas implicadas en la señalización celular, apoptosis, reparación del ADN, por lo cual se encuentran involucradas en múltiples funciones celulares entre las que se encuentra la regulación transcripcional, la progresión del ciclo celular y la motilidad celular. ^{30,31}

En humanos, hay 18 enzimas HDAC divididas en cuatro clases: las proteínas

de tipo I Rpd3 (HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8); las proteínas de tipo II Hda1 (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 y HDAC10) y la proteína de clase IV (HDAC11), estas tres clases son dependientes de zinc. Por último, las proteínas tipo Sir2 de Clase III (SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 y SIRT7) cuya actividad requiere NAD⁺. Al igual que los HAT, algunos HDAC poseen especificidad de sustrato y la evidencia sugiere que muchas de las HDACs también actúan sobre proteínas no histónicas, por lo que es importante tener en cuenta este hecho al tratar de determinar la función de una HDAC. Las HDACs muestran diferentes localizaciones subcelulares: las HDAC de clase I se localizan principalmente en el núcleo, mientras que las de clase II HDAC4, HDAC5, HDAC6 y HDAC7 pueden moverse entre el núcleo y el citoplasma (Figura 3).^{29,31}

Clase	Subclase	Nombre	Localización	Co-factor	Expresión	Catalítico dominio
I		HDAC1	Núcleo	Zn ⁺⁺	Ubicuo	
		HDAC2	Núcleo			
		HDAC3	Núcleo			
		HDAC8	Núcleo/citoplasma			
II	A	HDAC4	Núcleo/citoplasma	Zn ⁺⁺	Especifico	
		HDAC5	Núcleo/citoplasma			
		HDAC7	Núcleo/citoplasma			
		HDAC9	Núcleo/citoplasma			
	B	HDAC6	Citoplasma			
		HDAC10	Núcleo			
III		SIRT-1	Núcleo	NAD ⁺	Variable	
		SIRT-2	Citoplasma			
		SIRT-3	Mitocondria			
		SIRT-4	Mitocondria			
		SIRT-5	Mitocondria			
		SIRT-6	Núcleo			
		SIRT-7	Nucléolo			
IV		HDAC11	Núcleo/citoplasma	Zn ⁺⁺	Ubicuo	

Figura 3: Clasificación de las HDACs. Tabla con la clasificación, localización celular y co factor necesario para la activación de las HDACs de humanos. Imagen modificada de Shirakawa *et al.*, Trends Microbiol. 2013. ³²

HDAC6

La desacetilasa de histonas 6 es una enzima que se localiza principalmente en el citoplasma, es un miembro único de las HDACs ya que presenta dos dominios

catalíticos, ambos con función de desacetilasa y un motivo de dedo de zinc (ZnF) en su región C-terminal. HDAC6 es una proteína formada por 1,216 aminoácidos, se encuentra principalmente en el citoplasma debido a los dominios NES y SE14, aunque también se encuentra en la región perinuclear y en bordes principales de regiones subcelulares. En citoplasma, la HDAC6 actúa principalmente sobre la α -tubulina, la proteína de choque térmico 90 (Hsp90) y la cortactina. Estudios in vitro, han demostrado que la HDAC6 también es capaz de desacetilar las histonas ^{7,33}.

A diferencia de las HDAC nucleares que están principalmente implicadas en la regulación transcripcional mediando la acetilación de las histonas, la HDAC6 tiene una amplia gama de sustratos no histónicos. Está sobre expresada en muchos tipos de cáncer y se sabe que el uso de inhibidores específicos de la HDAC6 ha mostrado efectos benéficos en los modelos de cáncer que comparten varias características con la fibrosis. Es importante destacar que dentro de los efectos anticancerígenos que se han reportado la actividad de la HDAC6 influye directamente en el estado de acetilación de varias proteínas no histónicas clave en la regulación de procesos asociados al cáncer. La HDAC6 afecta la migración celular, la proliferación y la supervivencia, todas las cuales son características importantes en la fibrosis pulmonar. ³⁴

Papel de las HDACs en la fibrosis pulmonar

La función de HDACs ha sido ampliamente caracterizada desde diversos enfoques que incluyen la química y la estructura de las proteínas, biología molecular y celular. Se ha demostrado que las HDACs regulan procesos celulares como: proliferación, diferenciación, migración, apoptosis y metabolismo celular, y que alteraciones en su expresión están involucradas en diversos trastornos humanos³⁵. Así mismo, existen estudios que demuestran que las HDACs están implicadas en el desarrollo y progresión de procesos fibroticos en múltiples órganos incluidos riñón, hígado, piel corazón y pulmón, por este motivo se han convertido en potenciales blancos terapéuticos³⁶.

Una forma de evaluar el efecto que tienen las HDAC en la fibrosis es mediante el uso de inhibidores farmacológicos. Estos inhibidores se sintetizaron a partir de la identificación y estudio de las moléculas reguladoras endógenas. A lo largo de la última década se han desarrollado diferentes tipos de inhibidores de desacetilasas de histonas, los inhibidores generales o pan inhibidores que tienen la capacidad de inhibir la actividad de la mayoría de las HDAC e inhibidores específicos para cada una de las HDAC. De éstos últimos, Tubastatina A (TubA) es un inhibidor específico de la HDAC6 ³⁵.

Existen reportes de que la inhibición de las HDAC mediante el uso de pan-inhibidores tiene efectos sobre la fibrosis pulmonar; por ejemplo, la inhibición de las HDAC con la tricostatina A (TSA) en fibroblastos pulmonares inhibe la vía de señalización del TGF- β 1 y reduce la expresión de la α -SMA y colágena tipo 1³⁷. También se ha reportado que la TSA puede reducir la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratas mediante la reducción de la expresión de HDAC2³⁸. Por otro lado se sabe que el tratamiento con TSA reduce la transición epitelio-mesenquima, uno de los procesos implicados en la patogénesis de la fibrosis, mediante la inhibición de la HDAC2 y HDAC4.³⁹.

Los estudios enfocados a investigar los efectos de la inhibición selectiva de HDACs son más escasos y en el caso de la HDAC6 se ha reportado que en fibrosis cardíaca HDAC6 está sobre expresada en fibroblastos y la inhibición de esta desacetilasa disminuye la expresión de la α -SMA y reduce la proliferación celular inducida por TGF- β 1⁴⁰. Así mismo, se ha demostrado que la inhibición de la HDAC6 disminuye la inflamación y reduce la expresión de colágena tipo I y III, fibronectina y citocinas pro-fibroticas y pro-inflamatorias en fibrosis renal.⁴¹. La Tubastatina A reprime la expresión de colágena inducida por TGF- β 1, al disminuir la fosforilación de Akt y al regular la expresión de moléculas como HIF-1 α , VEGF y mecanismos como la autofagia.⁴²

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fibrosis pulmonar es una entidad patológica que puede resultar letal y a pesar de múltiples estudios tanto en humanos como en modelos animales, los mecanismos celulares y moleculares implicados en el desarrollo y progresión de la enfermedad no se conocen con precisión. La acetilación y desacetilación de histonas constituyen un mecanismo dinámico que regula la expresión de genes implicados en diferentes enfermedades y se ha sugerido que la inhibición de HDACs puede desempeñar un papel importante para el tratamiento de padecimientos como el cáncer.

En este contexto, es importante incrementar el conocimiento sobre el papel de las HDAC's en el desarrollo y progresión de la fibrosis pulmonar. Aunque existen estudios donde se investigó el efecto de inhibidores no selectivos de HDACs, así como de inhibidores de HDAC de clase I sobre la fibrosis pulmonar, los trabajos en donde se investigan los efectos de la inhibición selectiva de HDAC6 en la fibrosis pulmonar son escasos. En este estudio se analiza cuál es el impacto del uso de inhibidores generales de HDAC como el TSA y un inhibidor específico de la HDAC6, sobre la respuesta fibrosante pulmonar inducida con bleomicina. El estudio de mecanismos epigenéticos, como modificaciones de histonas, que regulan la expresión génica y diversas funciones celulares, pueden ayudar a encontrar blancos terapéuticos para la enfermedad.

HIPÓTESIS

El tratamiento con TSA y TubA tendrá un efecto protector en el desarrollo y progresión de la fibrosis pulmonar inducida con bleomicina, así como en procesos celulares asociados a la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de inhibición de las desacetilasas de histonas y en particular de la HDAC6 en el desarrollo de la fibrosis pulmonar inducida con bleomicina en ratones y sus efectos en la proliferación y migración de fibroblastos pulmonares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el modelo experimental de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina en ratones de la cepa C57/bl6 a 7, 21 y 28 días.
- Determinar el efecto de la administración de los inhibidores farmacológicos de desacetilasas de histonas sobre daño pulmonar inducido por la bleomicina en la etapa inflamatoria y fibrotica del modelo.
- Analizar el efecto en los procesos celulares asociados al desarrollo de fibrosis (proliferación y migración) en fibroblastos de pulmón de ratones instilados con bleomicina y tratados con los inhibidores.

METODOLOGÍA

Modelo murino de fibrosis pulmonar

Se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6 de 9-12 semanas de edad que fueron obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y se dividieron en 6 grupos de 6 animales cada uno. Para inducir fibrosis pulmonar, los ratones se anestesiaron con Avertin (0.2 mg/g) y se instilaron por vía intratraqueal con una dosis única de bleomicina (Cayman chemicals) a 7U/kg en un volumen final de 40µl (Grupo Bleo). Los ratones recibieron un tratamiento con el pan-inhibidor TSA (2mg/kg⁴³; Grupo B+TSA) o el inhibidor específico de la HDAC6 TubA (10 mg/kg⁴¹; Grupo B+TubA) mediante inyección intraperitoneal diaria. Los inhibidores fueron administrados a partir del primer día de la instilación y hasta el día 7, 21 o 28 donde fueron sacrificados. Para los grupos controles se utilizaron animales instilados con solución salina y que fueron inyectados con DMSO 1% en PBS (Grupo Ctrl); con TSA (Grupo TSA) o con TubA (Grupo Tub). Este protocolo fue aprobado por el comité de bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”

Histología

Para obtener los cortes histológicos, los pulmones se lavaron con PBS a través de la arteria pulmonar hasta retirar toda la sangre. El pulmón derecho se fijó perfundiendo formol al 10% a su máxima capacidad. Los pulmones se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de secciones longitudinales de 3µm de espesor que fueron depositados en portaobjetos cargados. Para la evaluación morfológica del daño pulmonar, los cortes de pulmón se tiñeron con hematoxilina-eosina y adicionalmente, también se tiñeron con la tinción tricrómica de Masson para observar los componentes de la matriz extracelular.

Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Para la identificación de diferentes proteínas, los cortes histológicos fueron desparafinados con xilol y alcoholes graduales y posteriormente se hidrataron. Para eliminar la peroxidasa endógena las muestras se incubaron 30 minutos con peróxido

de hidrógeno a temperatura ambiente. La recuperación de antígeno se llevó a cabo en un buffer de citratos pH 6 en olla exprés y posteriormente se bloqueó con suero de burro por 20 min. Las muestras fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario contra H3K9K16ac (1:50; Diagenode) y con el anticuerpo anti-Lys acetilada (1:100; Cellsignaling). Para la detección por inmunohistoquímica las laminillas se incubaron 20 min con el anticuerpo secundario conjugado a biotina y 20 min con streptavidina-peroxidasa. La marca se reveló colocando una gota del cromógeno diaminobencidina (DAB) y se determinó el tiempo de monitoreando la tinción en el microscopio. Para los tejidos en donde se usó H3K9K16ac se hizo una contra tinción con eosina y en el caso de Pan acetilación con hematoxilina. Finalmente, las muestras se cubrieron con resina y fueron observadas y fotografiadas en un microscopio Nikon.

Para la detección por inmunofluorescencia las laminillas se incubaron una hora a temperatura ambiente y en la obscuridad con anticuerpos secundarios acoplados a un fluoróforo (Alexa Fluor 488 y 549, Invitrogene). Después de lavar 4 veces con TBS-Tween 20 0.05%, los tejidos se incubaron 5 min con DAPI (300 nM) para teñir el núcleo y fueron montadas con medio de montaje para fluorescencia (ProLong Diamond, Invitrogen) y se observaron y fotografiaron en un microscopio invertido de epifluorescencia Olympus IX80.

Actividad de la HDAC6

Se determinó la actividad de la HDAC6 con el kit HDAC6 Activity Assay (BioVision). Brevemente, se realizó el homogeneizado de las muestras de pulmón a partir de 9 mg de tejido con buffer de lisis. En un placa de 96 pozos oscura con fondo claro se colocó 1µl de muestra en cada pozo, se agregó el sustrato y se incubó 30 min a 37°C. Posteriormente se agregó el reactivo para desarrollar la fluorescencia y se incubó por 10 min a 37°C. Las muestras se cuantificaron a 380/490nm (ex/em) en el Lector Multi-Modal Synergy HT (BioTek). Las muestras se ajustaron por medio de una cuantificación de proteína y se reportan como unidades relativas de fluorescencia (URF) por µg de proteína.

Extracción de histonas

La extracción de histonas se realizó a partir de 100mg de tejido pulmonar utilizando el kit EpiQuik Total Histone Extraction (Epigentek) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para obtener los lisados de tejido se utilizó el homogeneizador FastPrep® (MP-Biomedicals) colocando las muestras de tejido y buffer de lisis en tubos con esferas de cerámica (Lysing Matrix D, MP-Biomedicals) utilizando el programa recomendado por el fabricante para tejido pulmonar. Las muestras se cuantificaron con el reactivo Protein Assay (BioRad).

Extracción de fibroblastos y cultivo de células

Para establecer los cultivos primarios de fibroblastos, los pulmones se lavaron con PBS estéril hasta retirar toda la sangre y se extrajo el bloque pulmonar. Los pulmones se maceraron con ayuda de unas tijeras en una solución de medio DMEM sin suero con tripsina en una proporción 2:1 y se incubaron a 37°C en agitación constante por 20 min. Para detener la reacción se añadió medio DMEM con suero fetal bovino al 10%. Las muestras se filtraron en coladeras de 40µm para separar los restos del tejido (explantes) y la fracción celular que queda en suspensión. Los explantes y las células fueron depositados en cajas de cultivo de 6 pozos con medio DMEM y suero fetal bovino al 10% y con una mezcla de antibiótico/antimicótico (Gibco, Invitrogen). Los explantes y las células se mantuvieron en cultivo con medio DMEM+10% de SFB en una incubadora a 37°C en una atmósfera de 95% aire y 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada tercer día y las células se expandieron hasta los pasajes 5-6 para realizar los estudios de migración y proliferación.

En algunos experimentos los fibroblastos se crecieron en placas de 6 pozos y fueron estimulados con TGF-β1 por dos horas a una concentración de 10nM. Adicionalmente, también se trabajó con la línea comercial de células epiteliales pulmonares del ratón (MLE-12, ATCC) que se crecieron en medio HITES con 2% de suero fetal bovino.

Western Blot

Se obtuvieron extractos de proteína a partir de 80mg de tejido pulmonar con buffer RIPA con una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Pierce, ThermoScientific) homogenizando las muestras en el equipo FastPrep como se describió anteriormente. En el caso de las células, éstas se cosecharon con tripsina, se centrifugaron 10 min a 4°C y el pellet se liso en frío con buffer RIPA más los inhibidores con ayuda de un ultrasonicador (Diagenode). La concentración de proteínas se determinó con el kit Pierce BCA (ThermoScientific).

Para tejido, 30 µg de proteínas totales fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% o 15%. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) en una cámara semiseca. Las membranas se bloquearon durante una hora con el reactivo Odyssey® Blocking Buffer (TBS) y posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios contra Lys-acetiladas (Acetylated-Lysine CellSignaling; cat # 9441), NF-κB2 (Abcam; cat# ab175192), H4K16ac (Diagenode; C15200219) y HDAC6 (Epigentek; A-4006-050). Como control de carga para lisados totales se utilizó β-actina (Sigma; A5316) y H3 total (Genetex; GTX 122148) para extractos de histonas. Para su detección, se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a HRP (Amersham GE) o anticuerpos acoplados a un fluoróforo (Li-Cor) que se incubaron 1 hora a temperatura ambiente.

Para las células, se utilizaron 25 µg de proteína total que se separaron en geles SDS-PAGE al 10% para detectar la proteína smad2/3 fosforilada con el anticuerpo anti-Phospho Smad2/3 (Cellsignaling) como un marcador de activación de la vía del TGF-β1, como control de carga se utilizó β-actina. Para su detección, se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a HRP.

Las membranas se visualizaron utilizando el sistema de detección para quimioluminiscencia en un foto documentador (ChemiDoc, BioRad) o el sistema de detección por fluorescencia (Odyssey, Li-Cor). Finalmente, las imágenes se guardaron en formato TIF y en ellas se realizó la cuantificación de las bandas utilizando el programa Image J (NIH). En las gráficas de densitometría los resultados

se muestran como promedio \pm desviación estándar, de al menos dos experimentos independientes con duplicados biológicos.

Lavado bronquio alveolar

Para obtener el lavado bronquio alveolar, los ratones se anestesiaron con Pentobarbital sódico (Pisabental) y se hizo una traqueotomía para insertar una cánula flexible de polipropileno. Con ayuda de una jeringa de insulina se instilaron 0.8 ml de solución salina estéril y el líquido se recuperó por aspiración suave. Este proceso se repitió dos veces para tener un volumen final aproximado de 1.2 ml. La fracción celular del LBA se separó centrifugando las muestras 10 minutos a 1200 g a 4°C. El sobrenadante de LBA se guardó a -80°C y la fracción celular se resuspendió en 100ul de Carbowax para fijar las células. Las células se utilizaron para hacer un conteo total y diferencial con la tinción de Wright y el sobrenadante del lavado bronquioalveolar (LBA) se utilizó para la determinación de IL-6.

Cuantificación de Interleucina 6 (IL-6)

Se determinó la concentración de IL-6 en el sobrenadante de lavado bronquioalveolar (LBA) mediante la técnica de ELISA para la cual se utilizó el kit LEGEND MAX™ Mouse IL-6 (Biolegend). Brevemente, a cada pozo de la placa pre-cargada con el anticuerpo de captura se le añadieron 200 μ l de LBA y se incubó toda la noche a 4°C en agitación. Después de lavar cada pozo 4 veces con el buffer correspondiente, se incubó con el anticuerpo de detección por una hora a temperatura ambiente en agitación. Después de lavar 4 veces, se añadió un conjugado de avidina-HRP durante 1 hora a temperatura ambiente y finalmente las muestras se incubaron con el sustrato de reacción por espacio de 2 minutos. Se midió la absorbancia de la placa a 450nm en el Lector Multi-Modal Synergy HT (BioTek). Los resultados se muestran como el promedio \pm desviación estándar de duplicados de cuatro animales por grupo.

Determinación de colágena

El pulmón izquierdo se utilizó para evaluar el contenido de colágena mediante la determinación colorimétrica de hidroxiprolina descrita por Woessner.⁴⁴ Para ello, los tejidos se colocaron en tubos de vidrio y se deshidrataron durante 7 días en un horno a 100°C. Los pulmones se hidrolizaron con 1ml de HCL 6N a una temperatura de 110°C durante 24 horas. Posteriormente las muestras se filtraron con papel filtro Whatman #1 y el ácido se eliminó en un evaporador (Labconco) calentando los tubos a 90°C y aplicando vacío. Al terminar la evaporación, las muestras se resuspendieron en 1ml de agua y se ajustó el pH a 7 agregando NaOH. Finalmente las muestras se llevaron a un volumen final de 2ml con agua.

Para la cuantificación, se tomaron 50µl de muestra y se llevaron a un volumen total de 2ml con agua. Se preparó una curva estándar de hidroxiprolina de 0 a 10µg/ml. A cada muestra se le añadió 1ml de Cloramina T [62 mM] (Sigma) bajo agitación y se incubaron por espacio de 20 minutos a temperatura ambiente. Después se adicionó 1ml de ácido perclórico 3.15M y las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, se añadió 1 ml de reactivo de Erlich preparado en fresco (p-dimetlaminobenzaldehido) y se incubó 20 minutos a 60°C. La absorbancia de las muestras y la curva de HyP y se leyeron en un espectrofotómetro (Beckman) a una longitud de onda de 557nm. Se realizaron dos ensayos independientes por duplicado y los datos se expresan como promedio \pm desviación estándar de HyP/pulmón izquierdo.

PCR

Se realizó la extracción de RNA utilizando el reactivo TRIzol (Thermo Fisher) a partir de 100mg de pulmón. Brevemente, el tejido se disgregó en un homogenizador (FastPrep, MP-Biomedicals) en tubos con esferas de cerámica como ya se mencionó en párrafos anteriores. El homogenizado se transfirió a otro tubo de 1.5 ml y entonces se adicionaron 200µl de cloroformo. Después de agitar, las muestras se centrifugaron a 7500g y se recuperó la fase acuosa. El RNA se precipitó con isopropanol y se lavó 2 veces con etanol al 75%. El RNA obtenido se

resuspendió en 100µl de agua libre de RNasas y DNasas y se cuantificó con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260/280 nm. El DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir de 1µg de RNA total de cada una de las muestras con el kit Maxima Firts Strand cDNA Synthesis for RT-qPCR (Thermo Scientific) de acuerdo a las indicaciones del fabricante ajustando a un volumen final de 100 µl con agua libre de RNasas y DNasa.

La expresión de colágena tipo I, alfa actina de musculo liso y el factor de crecimiento transformante beta-1 se evaluaron por PCR en tiempo real (qPCR). Para la reacción se utilizaron sondas de hidrólisis (Taqman Gene Expression Assay) contra Col1A1, ACTA2 y TGF-β1, Master Mix (Maxima Probe qPCR; Thermo Scientific) y 2 µl de cDNA como templado en un volumen final de 25 ul. Los ensayos se hicieron en placas de 96 pozos en un termociclador LightCycler® 480 (Roche). Para estos experimentos se utilizaron tres animales de cada grupo escogidos al azar y se hicieron dos veces por triplicado. Como control de referencia se utilizó β-actina y los datos se analizaron con el software Qgene. Los datos se expresan como promedio ± desviación estándar.

Ensayo de proliferación

Los fibroblastos (7×10^3) se sembraron en placas de 96 pozos en un volumen final de 100 µl con medio DMEM con suero al 10% y la proliferación a 24, 48 y 72 horas fue evaluada con el kit de proliferación celular CyQuant (ThermoScientific), el cual se basa en el uso de un colorante verde fluorescente que se activa y emite fluorescencia al unirse con ácidos nucleicos. Después de los tiempos indicados, los pozos fueron lavados con 200µl de PBS y se congelaron a -80° C. Cuando todos los tiempos se completaron, se agregaron 200µl del reactivo CyQuant y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz en agitación constante. Los 200µl de solución fueron transferidos a una microplaca para fluorescencia de 96 pozos de fondo claro. La medición de fluorescencia se llevó a cabo en un lector de ELISA (Synergy HT, Biotek) a 480/520nm. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

Ensayo de migración

Para determinar la migración de fibroblastos se utilizó un ensayo de cierre de herida para lo cual las células se sembraron a confluencia total con medio DMEM y suero al 10% en cajas de cultivo de 24 pozos a los cuales se les colocó un inserto de 1.5 cm de diámetro. 12 horas después, se retiró el inserto para generar la herida y las células se mantuvieron en medio DMEM con suero al 2%. La migración de las células para cerrar la herida fue monitoreada cada 12 horas mediante la captura de imágenes en un microscopio invertido Evos XL (Thermo Scientific) con un objetivo de 4X. Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ, mediante el cálculo del área de la herida en los diferentes tiempos y finalmente se calculó el porcentaje de cierre de la herida en el tiempo final. Los experimentos se hicieron 2 veces por duplicado.

Análisis estadístico

A cada conjunto de datos de resultados obtenidos se les aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk; si los datos se distribuyeron normalmente se compararon con una T de student y si no pasaban la prueba de normalidad se analizaron con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Para comparaciones múltiples se utilizó una ANOVA de dos vías usando la prueba de Holm-Sidak. Se consideraron diferencias significativas los valores de $p < 0.05$. Este análisis se realizó en el programa Graph Pad Prism V.6.

RESULTADOS

Modelo en etapa inflamatoria a 7 días

- **Efectos de la TSA y TubA en la actividad de la HDAC6 y en la acetilación de proteínas en la etapa inflamatoria.**

Para analizar si los cambios observados en el modelo animal en la etapa inflamatoria son debido a los inhibidores de las HDAC's, se evaluó el efecto TSA y TubA en la acetilación global de proteínas de extractos pulmonares por WB con un anticuerpo que reconoce las lisinas acetiladas y en extractos de histonas, la acetilación de la Lys 16 en la histona H4 (H4K16ac). En la Figura 4 (panel superior) se muestra la imagen de un WB que ejemplifica los resultados encontrados en dos experimentos independientes. Se observó que a diferencia del grupo Ctrl, el grupo TSA muestra un ligero incremento en el patrón de proteínas acetiladas mientras que en el grupo TubA no se observaron diferencias. De manera interesante, en el grupo de animales que fueron instilados con bleomicina (Bleo) observamos una reducción en presencia de proteínas acetiladas en comparación con el resto de los grupos. Los resultados muestran que la administración de TSA a ratones que fueron instilados con bleomicina induce un ligero incremento de proteínas acetiladas mientras que, en el caso del tratamiento con TubA, el incremento es significativo y de hecho B+TubA es el grupo con mayor cantidad de proteínas acetiladas.

En extractos de histonas (Figura 4 panel inferior), y en comparación con el grupo Ctrl, se observó que el grupo de TSA muestra un incremento de la histona H4 acetilada en la Lys16 (H4K16ac) mientras que en el grupo TubA hay una ligera disminución. Por otra parte, al igual que en extractos de pulmón, el grupo de animales instilados con bleomicina mostró una disminución de la marca de H4K16ac; sin embargo, en este caso no se observaron diferencias con el grupo B+TSA o el grupo B+TubA.

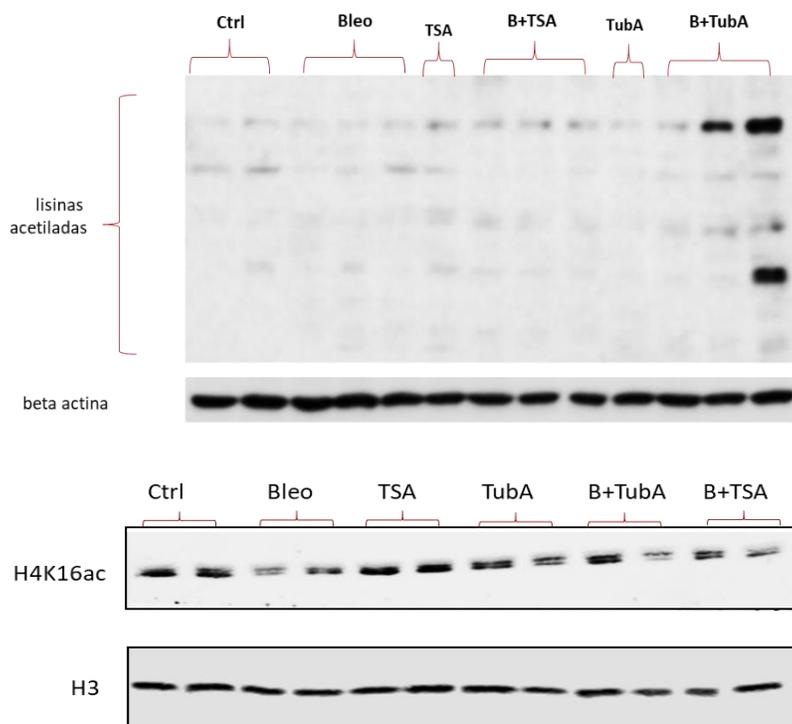


Figura 4. Imágenes representativas de western blot de proteínas acetiladas de extractos de pulmón de ratones a 7 días (panel superior) y de H4K16ac en extractos de histonas. Como controles de carga se utilizaron β -actina y H3 total, respectivamente.

Para establecer si TSA y TubA tienen efecto sobre la HDAC6, se determinó la actividad de esta enzima con un ensayo comercial que se basa en la detección de fluorescencia emitida cuando la enzima remueve el grupo acetilo de un péptido sintético. En la Figura 5 se muestran los valores de actividad de los grupos ajustados al valor del grupo Ctrl que fue considerado como basal. Se encontró una disminución en la actividad de HDAC6 en los grupos TSA y TubA. De manera interesante, observamos que los animales instilados con bleomicina tienen un incremento significativo en la actividad de esta enzima de aproximadamente 2 veces respecto al grupo Ctrl ($p < 0.01$) y que el tratamiento con los inhibidores revierte este incremento, siendo más evidente en el grupo de B+TubA, donde se alcanzaron niveles similares al grupo Control (Figura 2. 18 ± 0.5 en Bleo vs 0.6 ± 0.3 en B+TSA y 0.1 ± 0.05 en B+TubA; $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente).

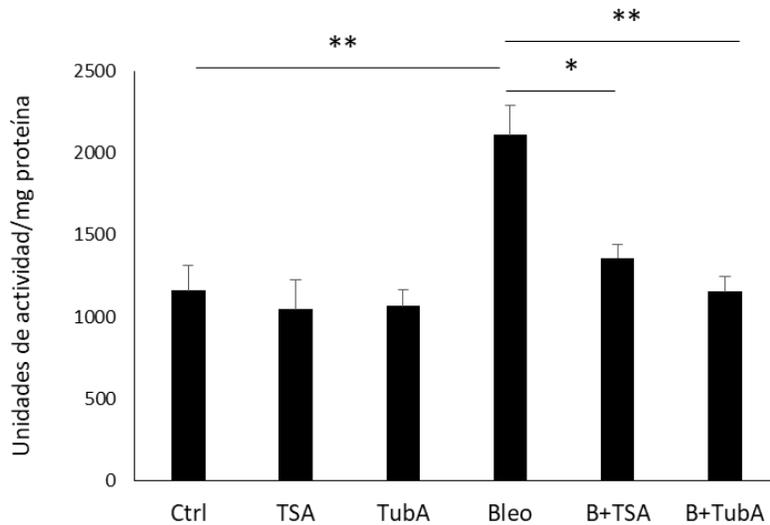


Figura 5. Gráfica de la actividad de HDAC6 en lisados pulmonares de ratones a 7 días. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de 4 muestras por grupo. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$ respecto al grupo de bleo.

Al evaluar la expresión de la HDAC6 por WB observamos que en comparación con el grupo Ctrl, no hay diferencias significativas en la expresión de la proteína en los ratones del grupo TSA y TubA, pero la instilación con bleomicina induce un incremento significativo de HDAC6 ($p < 0.05$; Figura 6A). Cuando a los animales con bleomicina se les administraron los inhibidores no observamos diferencias entre el grupo Bleo vs B+TSA; sin embargo, los resultados indican que la administración de TubA inhibe significativamente la expresión de HDAC6 inducida por bleomicina (Figura 6B. B+TubA= 0.64 ± 0.2 vs Bleo= 1.1 ± 0.5 , $p < 0.05$).

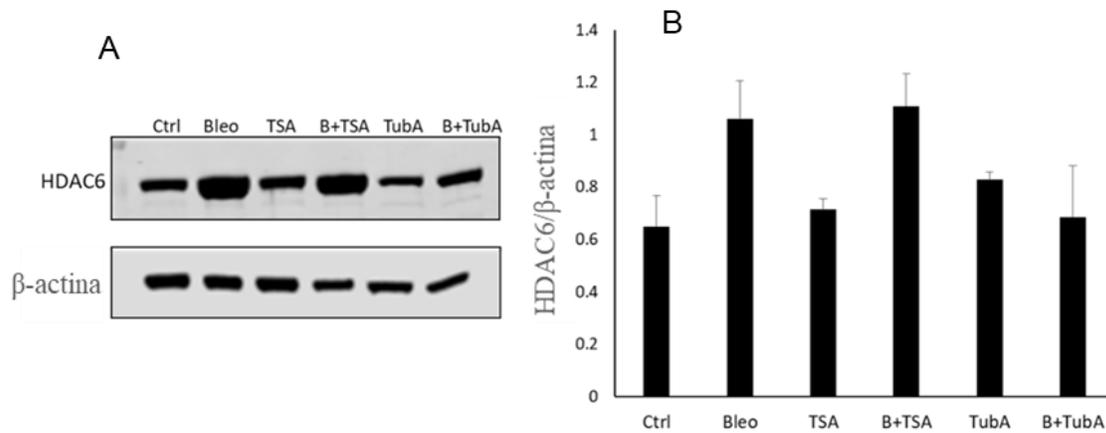


Figura 6. Detección de la HDAC6 por inmunoblot en extracto total de proteína de pulmones de ratones a 7 días. **A.** Imagen representativa de WB de la HDAC6 (70kD) y β -actina que fue usado como control de carga. **B.** Gráfica del análisis por densitometría n=4.

➤ **El tratamiento con TSA o TubA atenúan el proceso inflamatorio en ratones instilados con bleomicina**

El daño a los 7 días después de la instilación con bleomicina que corresponde a la etapa de mayor inflamación se evaluó por medio de histología, por la determinación de células inflamatorias y la cuantificación de IL-6 en el lavado bronquioalveolar.

La Figura 7 muestra imágenes representativas que ilustran el daño provocado por la instilación con bleomicina a 7 días y el efecto de los inhibidores. Como se puede observar, la instilación con bleomicina induce una respuesta inflamatoria considerable que se caracterizó principalmente por infiltración de células mononucleares inflamatorias y de células polimorfonucleares en los espacios intersticiales, con engrosamiento de paredes alveolares e inflamación peribronquiolar. De manera importante, se encontró que el tratamiento con los inhibidores reduce considerablemente el grado y la extensión del daño inflamatorio inducido por bleomicina, siendo más evidente en el grupo B+TubA. No se observaron cambios ni alteraciones evidentes en el pulmón de ratones de los grupos TSA y TubA respecto al grupo control.

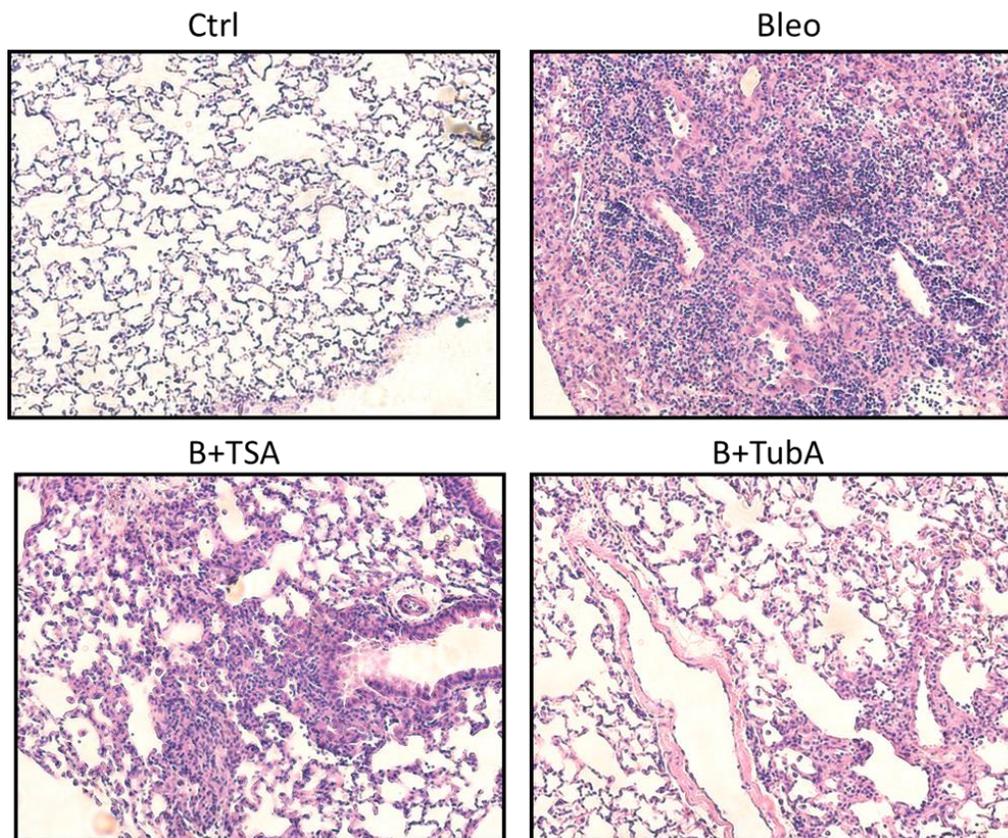


Figura 7. Micrografías representativas de pulmón de ratones a 7 días teñidas con hematoxilina & eosina a 10X.

A los 7 días, la lesión pulmonar inducida con bleomicina se caracteriza por la presencia de células inflamatorias. Observamos que la celularidad total en el LBA de los animales del grupo Bleo fue aproximadamente 4 veces superior a la del grupo control (3.79×10^5 células/ml \pm 1.095 vs 0.975×10^5 células/ml \pm 0.22 $p \leq 0.01$), mientras que en los animales instilados con bleomicina y que recibieron el tratamiento con los inhibidores, hay una reducción en el número total de células (B+TSA 2.16×10^5 células/ml \pm 0.46; B+TubA 1.65×10^5 células/ml \pm 0.62, $p \leq 0.05$) (Figura 8A).

El conteo diferencial (Figura 8B) mostró que en el grupo Bleo aumentan significativamente los linfocitos ($1.433 \times 10^5 \pm 0.643$ células/ml) y neutrófilos ($0.55 \times 10^5 \pm 0.33$ células/ml) respecto al grupo Control ($p \leq 0.01$). Interesantemente, el incremento de linfocitos inducido por bleomicina se disminuye al administrar los inhibidores (TSA: $0.79 \times 10^5 \pm 0.28$ células/ml y TubA: $0.58 \times 10^5 \pm 0.33$ células/ml;

$p \leq 0.05$ contra el grupo Bleo), mientras que en el caso de los neutrófilos, sólo el inhibidor TubA disminuye el número de neutrófilos ($0.16 \times 10^5 \pm 0.12$ células/ml en B+TubA vs $0.55 \times 10^5 \pm 0.33$ células/ml en Bleo; $p < 0.05$).

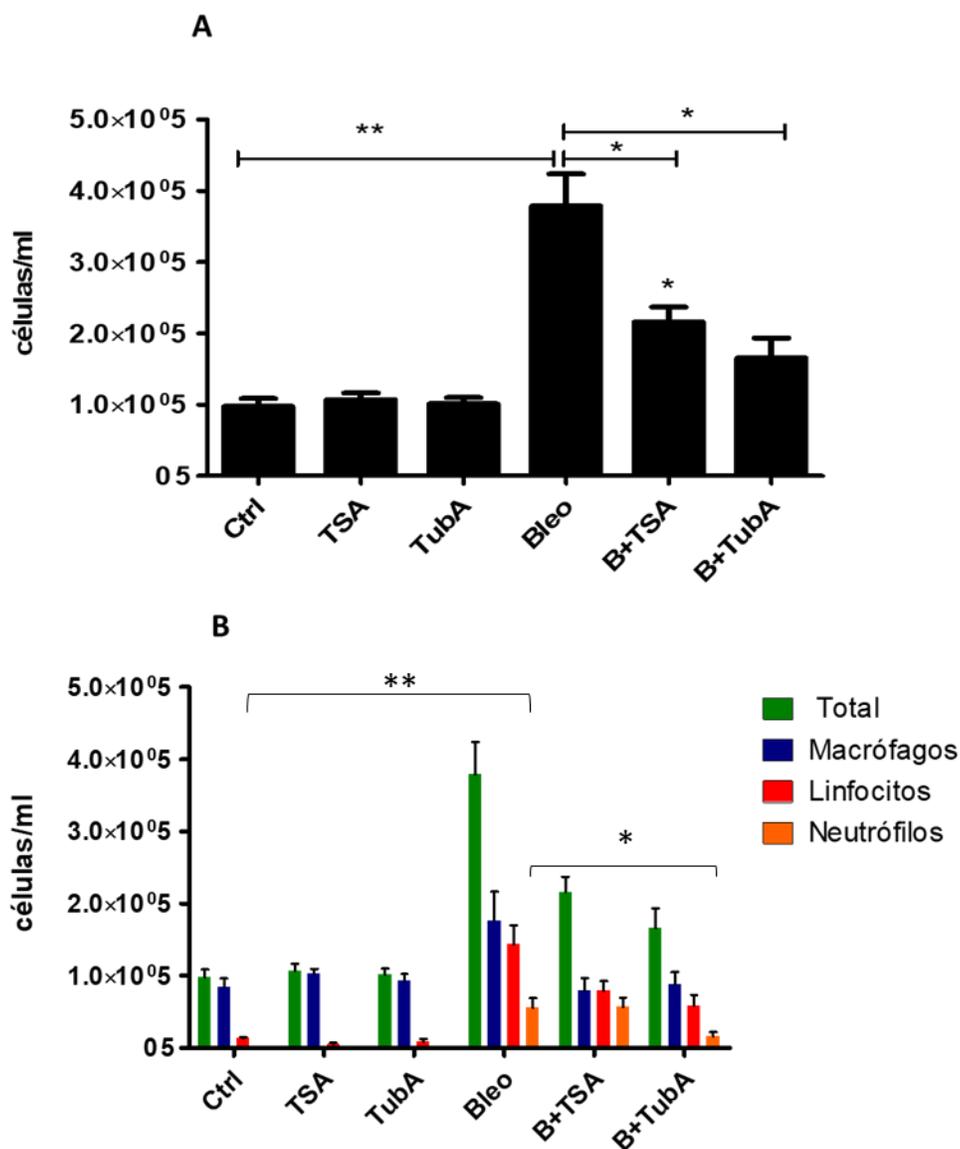


Figura 8. Gráficas del conteo total (A) y diferencial (B) de células recuperadas de LBA de pulmón de ratones a 7 días. ** $p \leq 0.001$; * $p \leq 0.05$.

La respuesta inflamatoria se caracteriza por la secreción de moléculas como las citocinas por lo que se realizó la cuantificación algunas de estas proteínas en el LBA. De las citocinas evaluadas, encontramos que sólo la IL-6 mostró un aumento

significativo en LBA de ratones tratados con bleomicina respecto al grupo control (34.9 ± 23.2 pg/ml en Bleo vs 4.27 ± 0.6 pg/ml en Ctrl, $p \leq 0.001$). Los ratones instilados con bleomicina y que recibieron el tratamiento con TSA o TubA mostraron una disminución en la concentración de IL-6; sin embargo, TubA es el único que tuvo diferencias significativas (15.48 ± 6.2 pg/ml en B+TubA vs 34.9 ± 23.2 pg/ml en Bleo; $p \leq 0.01$) (Figura 9).

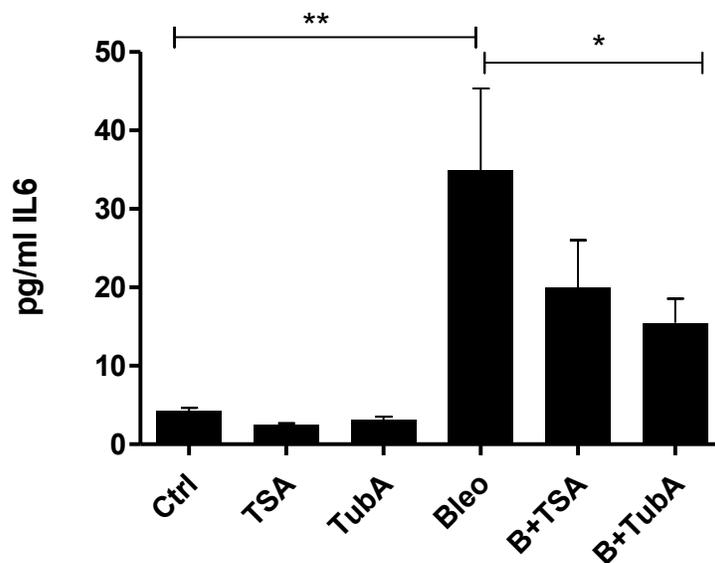


Figura 9. Expresión de IL-6 en LBA. Análisis por ELISA de la concentración de IL-6 en LBA de ratones a 7 días. ** $p \leq 0.001$; * $p \leq 0.01$.

La expresión de las citocinas está regulada por factores de transcripción como el NF- κ B2. Este factor de transcripción se ha asociado a procesos inflamatorios ya que regula la expresión de diversos genes, entre ellos la IL-6. En este contexto analizamos la expresión de NF- κ B2 de lisados pulmonares de los ratones por WB. No se encontraron diferencias entre el Ctrl y TSA o TubA mientras que la instilación con bleomicina induce un aumento de NF- κ B2; Interesantemente, observamos que en los ratones con bleomicina que fueron tratados con TubA, NF- κ B2 disminuye de manera significativa (Figura 10).

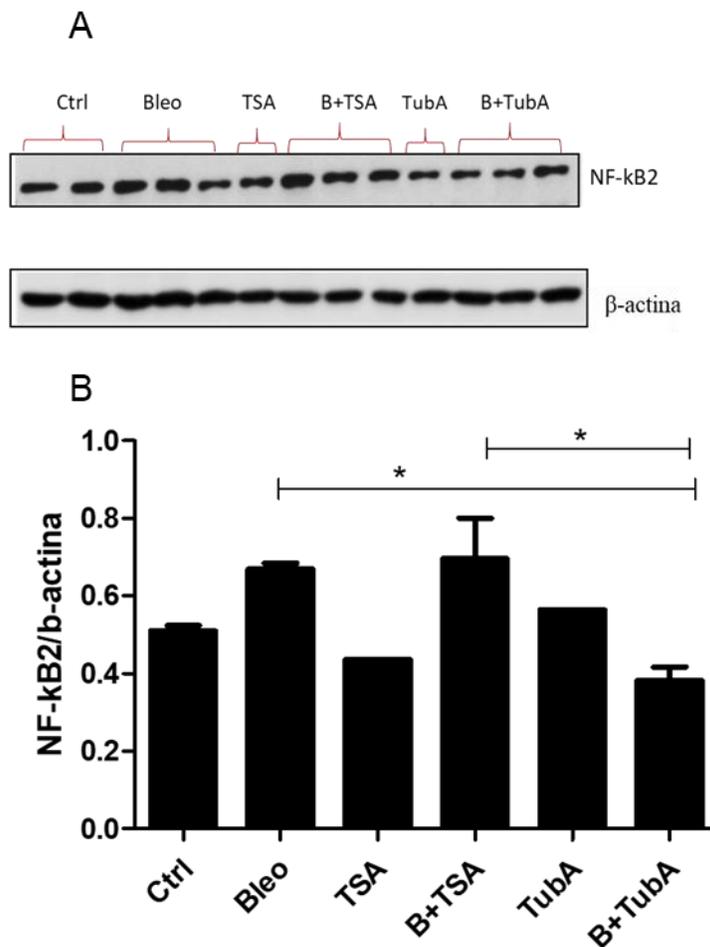


Figura 10. Expresión del factor de transcripción NF-κB2 en extracto total de proteína de pulmones de ratones a 7 días. **A.** Imagen representativa de un WB donde se detectó la presencia del factor de transcripción NF-κB2 y β-actina como control de carga. **B.** Grafica del análisis por densitometria de dos experimentos independientes; * $p \leq 0.01$.

Modelo etapa de fibrotica a 28 días

- **TSA y TubA incrementan la acetilación de proteínas y reducen la actividad de la HDAC6 en la fibrosis**

Para evaluar si los cambios observados en el modelo animal en la etapa fibrotica son debido a los inhibidores de las HDAC's se evaluó el efecto TSA y TubA la acetilación global de proteínas, en histonas, así como la actividad y expresión de la HDAC6 de pulmón de ratones con los diferentes tratamientos.

La acetilación global y la marca en histonas (H3K9K14ac) se evaluaron mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y WB. Se evaluó la acetilación global de las proteínas por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo que reconoce los residuos de lisina acetilados. La Figura 11A muestra la inmunohistoquímica en tejidos de pulmón. Debido a que no se observó daño en el pulmón de ratones de los grupos TSA, TubA y Ctrl, en estas muestras se fotografiaron zonas similares de parénquima pulmonar, mientras que en los otros grupos se tomaron fotos en zonas de fibrosis. Se observa que la marca de color marrón (que es indicativo de marca positiva) incrementan en TSA y TubA respecto al Ctrl (Figura 11A). En los animales que fueron instilados con bleomicina se observó marca positiva de acetilación en zonas fibroticas; sin embargo, el incremento de esta marca es considerablemente mayor en pulmón de los grupos B+TSA y B+TubA.

Para comprobar si los fármacos tenían efecto sobre histonas, realizamos una inmunodetección con fluorescencia de la marca H3K9K14ac. En la Figura 11B podemos observar que los animales que fueron instilados con bleomicina y que recibieron tratamiento con TSA o TubA tienen una mayor acetilación de esta histona en zonas de fibrosis respecto a los ratones que solo fueron instilados con bleomicina. No se observaron diferencias entre el grupo Ctrl y los grupos TSA y TubA, esto probablemente se deba a que la dosis usada no es suficiente para generar una modificación en las condiciones basales pero sí bajo el estímulo de bleomicina. (Dato no mostrado).

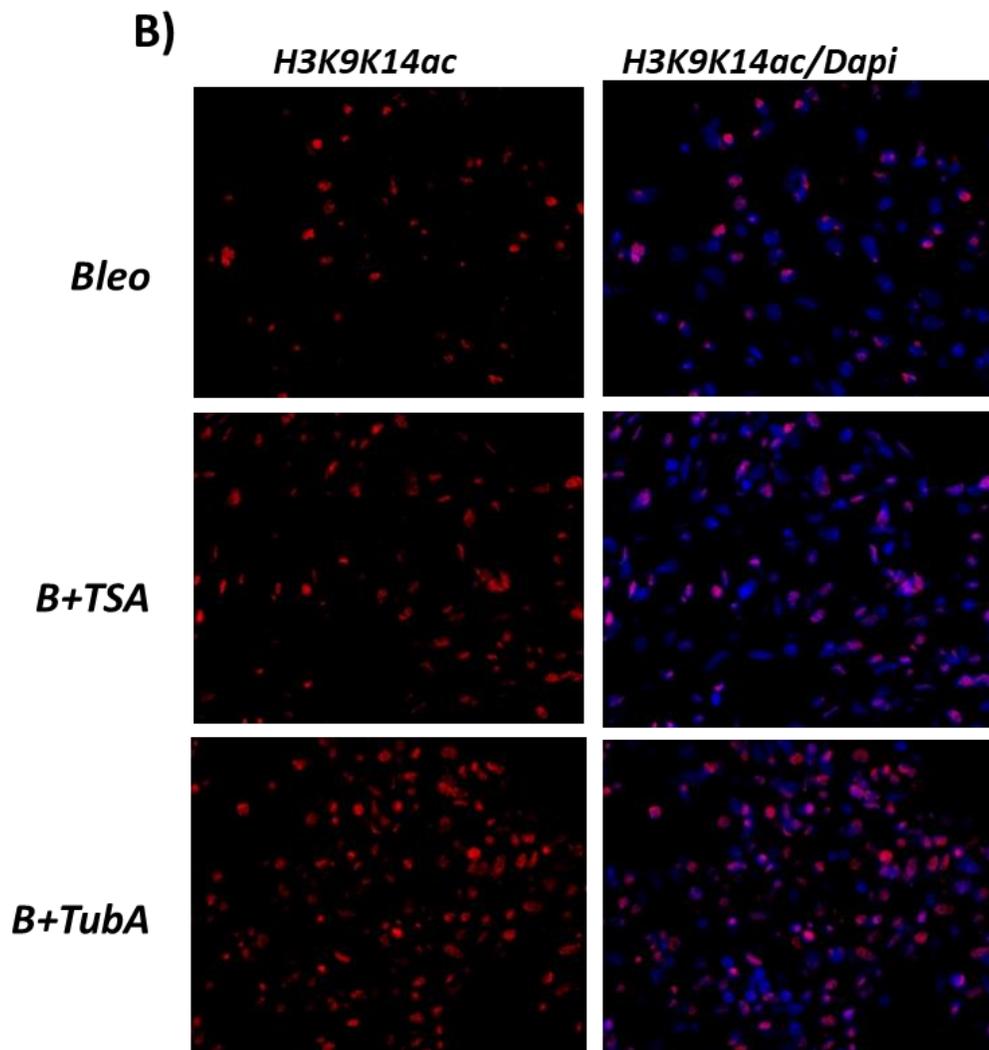
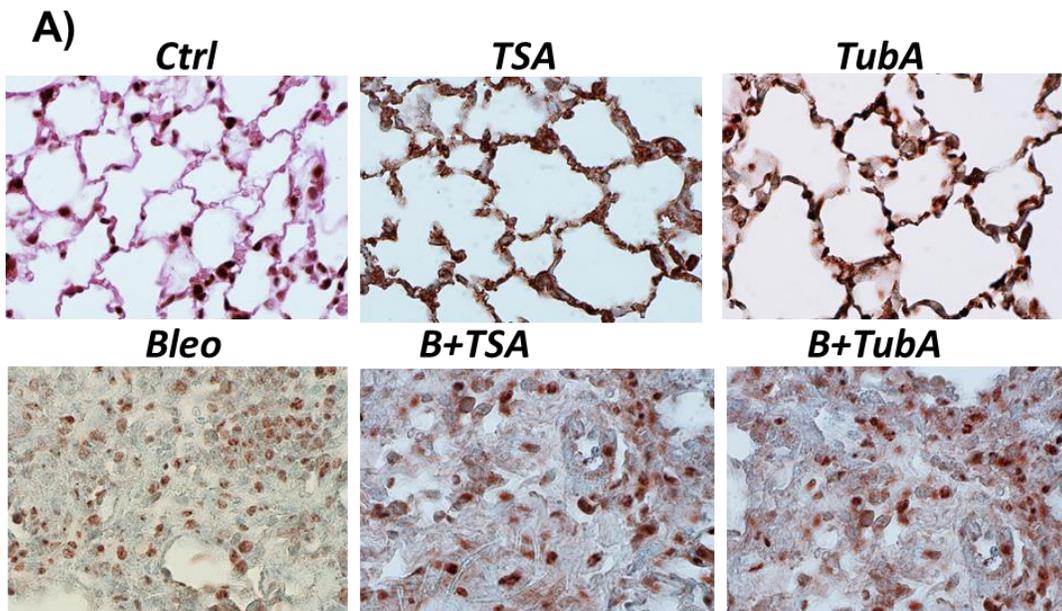


Figura 11. Efecto de TSA y TubA en la acetilación de proteínas en pulmón de ratones a 28 días. Micrografías representativas de sección de pulmones analizados por inmunohistoquímica (A) en donde se detectó la presencia de proteínas acetiladas o inmunofluorescencia (B) para la marca H3K9K14ac. En A, la marca marrón indica señal positiva y se fotografiaron con un objetivo 40X. En B, se muestra la marca para H3K9K14ac en rojo y en el panel izquierdo la misma foto pero acoplada al canal donde se detectó la presencia de núcleos en color azul (DAPI) con un objetivo de 10X.

Adicionalmente, también se analizó la acetilación de proteínas por WB y pudimos observar que el patrón de acetilación de proteínas no histonas entre el grupo control y los grupos TSA, Bleo y B+TSA es similar mientras que el grupo TubA mostró un aumento significativo de proteínas acetiladas que también se ve reflejado en los animales del grupo B+TubA (Figura12).

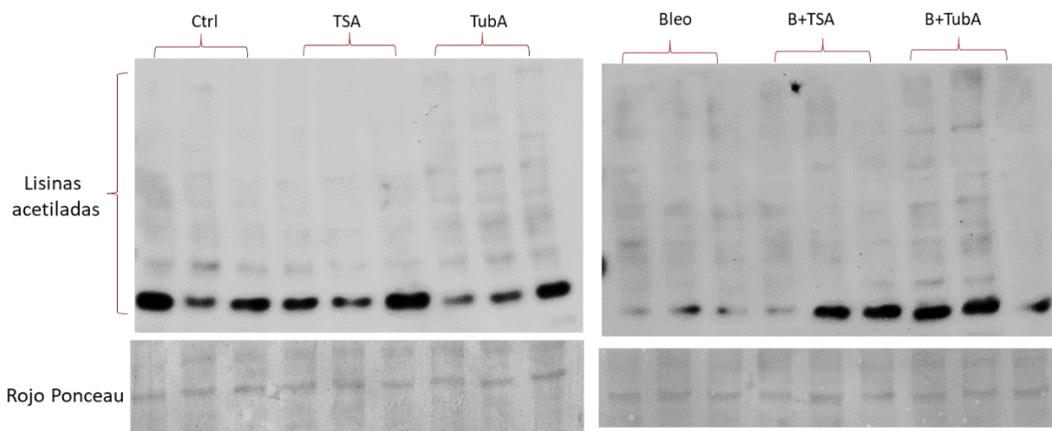


Figura 12. Inmunoblot representativo para proteínas acetiladas en pulmón de ratones a 28 días. La imagen inferior representa una fracción de la membrana teñida con rojo Ponceau.

La actividad de la HDAC6 también se cuantifico en pulmón de ratones instilados con bleomicina y aquellos que recibieron bleomicina y fueron tratados con los inhibidores a 28 días. En este ensayo observamos que el grupo de ratones que fue instilado con bleomicina muestra un incremento en la actividad de la HDAC6 de aproximadamente 1.5 veces respecto al grupo control ($p < 0.05$) y que la administración de TubA inhibe significativamente este incremento ($p < 0.01$) (Figura13).

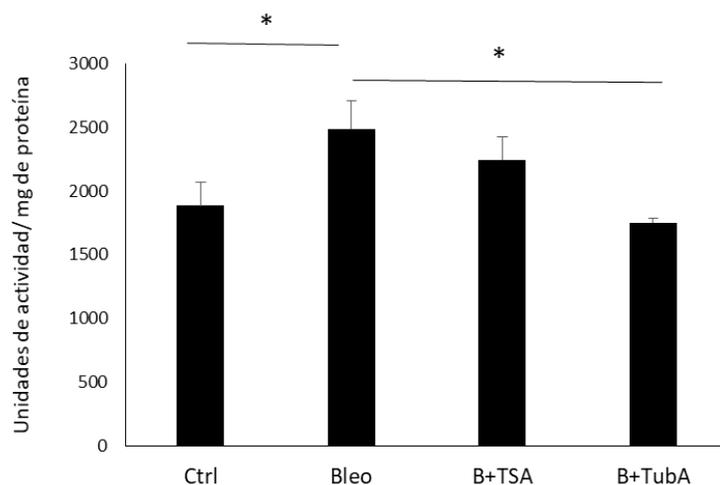


Figura 13. Gráfica de la actividad de HDAC6 en lisados pulmonares de ratones a 28 días. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de 4 muestras por grupo. * $p < 0.05$ Ctrl vs Bleo.

Al evaluar la expresión de la HDAC6 por WB observamos que no hay diferencias significativas en la expresión de la proteína en ratones de los grupos Ctrl, TSA y TubA. Sin embargo, encontramos que HDAC6 aumenta cuando los animales son instilados con bleomicina y en estos últimos, el tratamiento con TSA induce un ligero incremento de la enzima (B+TSA) mientras que TubA la disminuye (B+TubA), pero en ninguno de los casos las diferencias son significativas. (Figura 14).

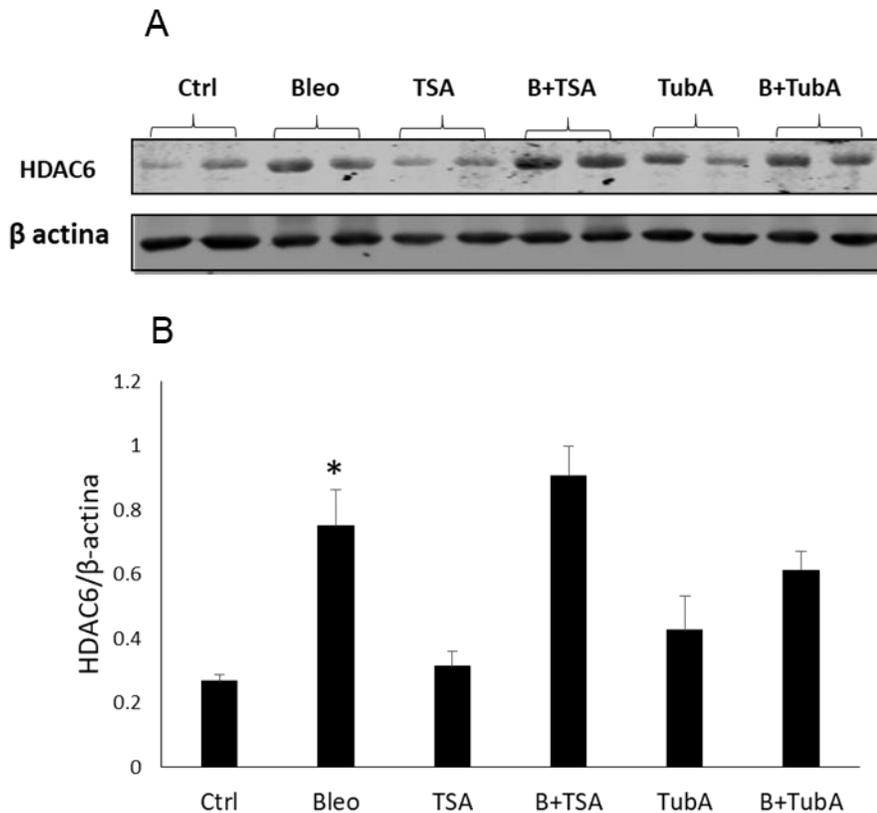


Figura 14. Detección de la HDAC6 por inmunoblot en extracto total de proteína de pulmones de ratones a 7 días. **A.** Imagen representativa de WB de la HDAC6 (70kD) y β -actina que fue usado como control de carga. **B.** Gráfica del análisis por densitometría n=4. *p<0.05 Bleo vs Ctrl.

➤ **El tratamiento con TSA o TubA reduce la fibrosis pulmonar en ratones instilados con bleomicina.**

El daño a los 28 días de tratamiento que corresponde a una etapa de fibrosis, se evaluó en cortes histológicos por medio de la tinción de H&E y Masson, por la cuantificación de hidroxiprolina y la cuantificación de RNA mensajero en pulmón.

La evaluación de los cortes histológicos mostró que los animales instilados con bleomicina presentan zonas de daño pulmonar con extensiones que van del 40 al 60% y con lesiones fibroticas que van de moderadas a severas. Estas lesiones están representadas por engrosamiento de paredes alveolares, hiperplasia de epitelios, acúmulo de células inflamatorias (Figura 15) y por un acúmulo importante

de fibras que fue evidenciado por la tinción tricrómica de Masson (Figura 16). Encontramos que la extensión y el grado de fibrosis de las lesiones provocadas por la bleomicina disminuyen considerablemente con el uso de los inhibidores; sin embargo, la disminución fue más evidente con el uso de TubA en donde se registraron lesiones con extensiones de 10 al 30% con fibrosis leve. No se observaron diferencias morfológicas entre los ratones del grupo Ctrl y TSA o TubA.

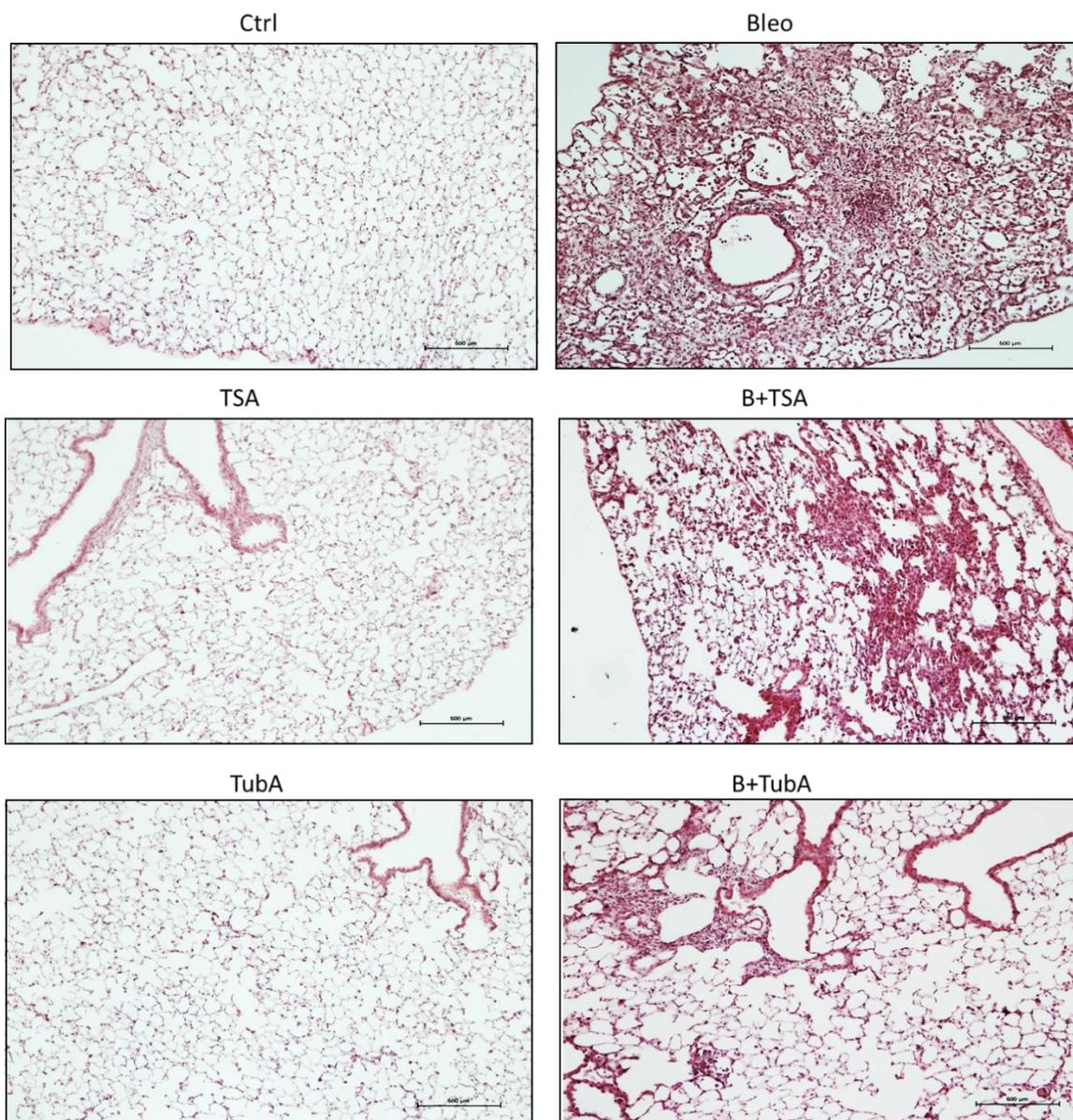


Figura 15. Micrografías representativas de pulmón de ratones a 28 días teñidas con hematoxilina & eosina. Las barras de escala indican 500 µM. (Magnificación 10X).

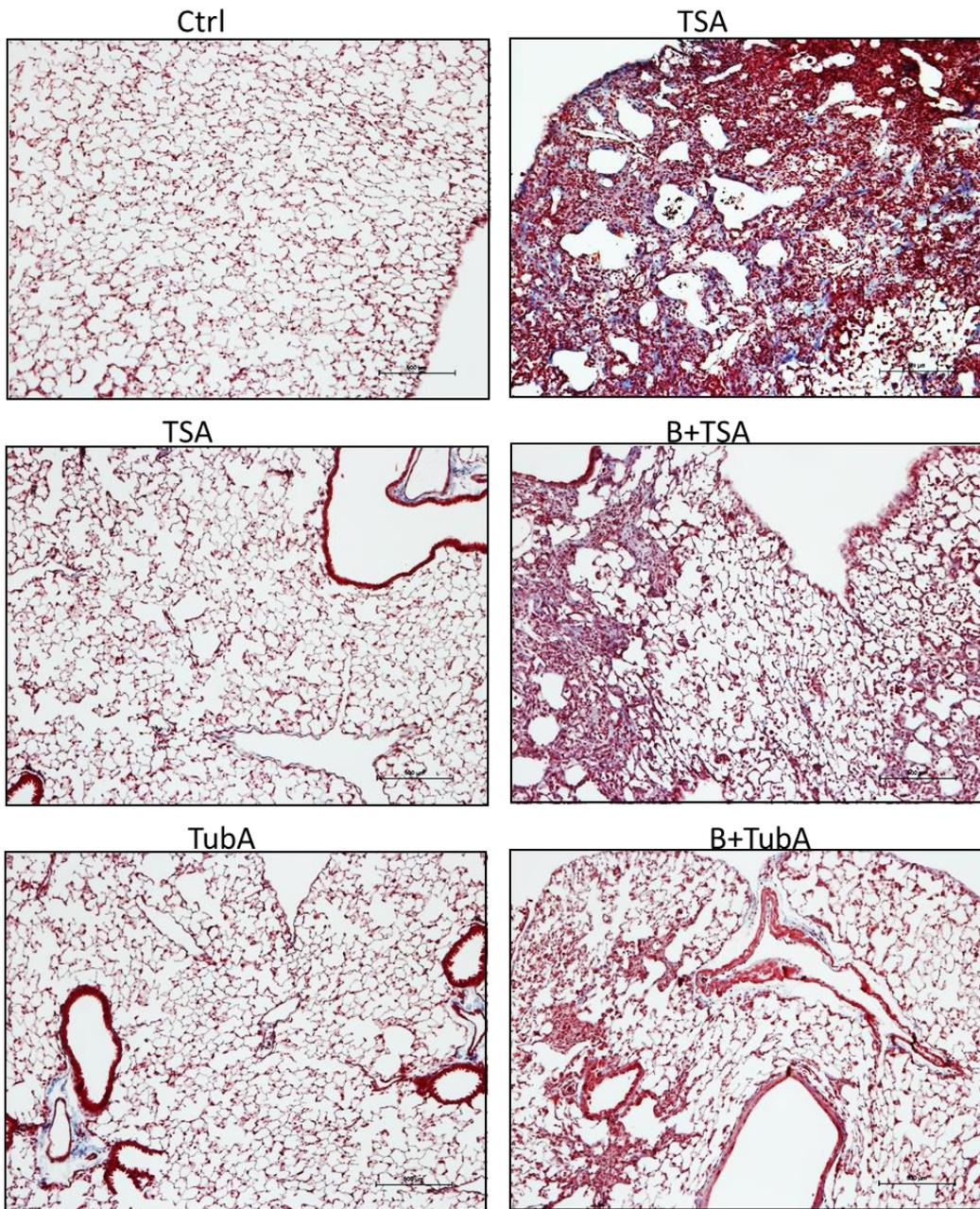


Figura 16. Micrografías representativas de pulmón de ratones a 28 días teñidas con la técnica Tricrómica de Masson. Las barras de escala indican 500 μ M. (Magnificación 10X).

Debido a que la evaluación histológica es subjetiva, se cuantifico la concentración de hidroxiprolina (HyP) como un marcador de colágena que es indicativo del daño fibrotico. En la figura 17 podemos observar que no existen diferencias en la concentración de HyP en pulmón de ratones control y ratones que

sólo recibieron el tratamiento con TSA o TubA (Ctrl =82.53 ± 13.41; TSA= 83.55 ± 9.9; TubA= 81.94 ± 5.56 µg HyP/pulmón) pero en los ratones instilados con bleomicina, la concentración de HyP se incrementa significativamente (Bleo =179 ± 25 µg HyP/pulmón; p=0.0001). De manera importante, encontramos que el incremento de HyP en los animales del grupo Bleo se reduce significativamente cuando estos son tratados con TSA o con TubA (B+TSA=123 ± 14 y B+TubA= 104 ± 19.7, contra Bleo=179 ± 25 µg HyP/pulmón; p=0.001).

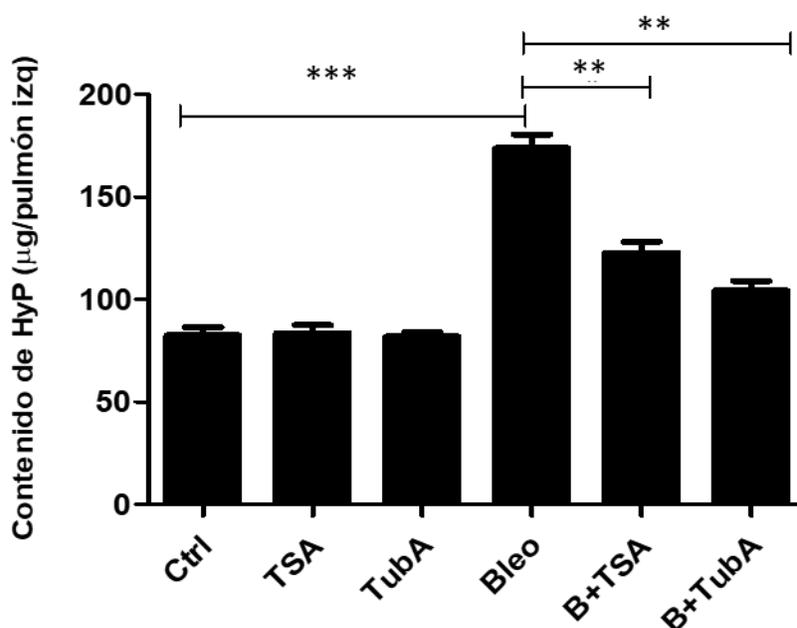


Figura 17. Contenido de hidroxiprolina en pulmón de ratones instilados con bleomicina y tratados con TSA o TubA por 28 días. Cada barra representa el valor promedio y desviación estándar de dos experimentos independientes N=6. Los resultados se expresan como microgramos de HyP por pulmón izquierdo. ** p≤ 0.01; ***p<0.001.

Para corroborar el daño pulmonar, también se cuantificó la expresión del mRNA de moléculas que se sabe incrementan cuando existe un proceso fibrotico: Col1A1, TGF-β1 y ACTA2 por PCR en tiempo real (Figura 18). Al igual que lo observado con HyP, encontramos que la instilación con bleomicina induce un incremento significativo en la expresión de Col1A1 (0.41±0.1 en Ctrl vs 2.79±0.6 en Bleo; p<0.001) y que este incremento se ve atenuado con el tratamiento de los

inhibidores TSA y TubA (2.79 ± 0.6 en Bleo vs 1.15 ± 0.52 en B+TSA y 0.42 ± 0.1 en B+Tub; $p < 0.001$. Figura 18A). Este mismo comportamiento se observó en la expresión de TGF- β (Figura 18B) y ACTA (Figura 18C), en donde el grupo Bleo muestra un incremento significativo en la expresión de las moléculas (Bleo vs Ctrl; $p < 0.05$ en TGF- β y $p < 0.01$ en ACTA) y el uso de inhibidores previene el incremento provocado por la instilación con bleomicina ($p < 0.05$ para B+TSA y B+TubA en TGF- β y $p < 0.01$ para B+TSA y B+TubA en ACTA; ambos comparando contra el grupo Bleo).

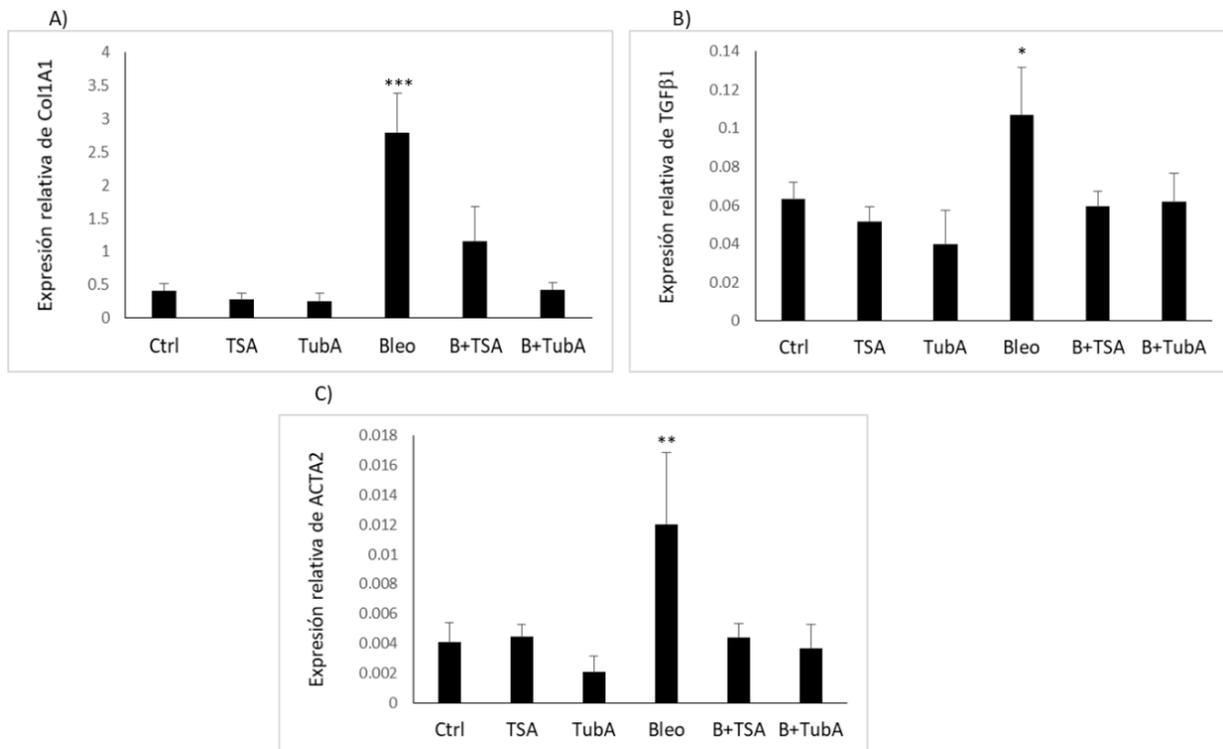


Figura 18. Expresión de RNA mensajero por PCR en tiempo real de Col1A1 (A), TGF- β 1 (B) y ACTA2 (C) en pulmón de ratones a 28 días. Las barras representan el promedio y desviación estándar de los datos ajustados contra β -actina.

Ensayos funcionales a 21 días

- **TSA y TubA disminuyen el efecto inducido por bleomicina en procesos asociados al desarrollo de fibrosis.**

El día 21 del modelo corresponde al punto de mayor actividad de los fibroblastos, en esta etapa se analizaron procesos celulares asociados al desarrollo de la fibrosis.

Se determinó la proliferación celular mediante un agente de intercalación al DNA y la migración celular por medio del ensayo de herida. Los ensayos se realizaron en fibroblastos de pulmón aislados de los diferentes grupos que recibieron los tratamientos a partir del primer día después de la instilación y hasta el día 21 que fueron sacrificados.

Para determinar los efectos de TSA y TubA en fibroblastos que ya presentan un “fenotipo fibrotico”, en experimentos en paralelo se realizaron los mismos ensayos funcionales pero fibroblastos que fueron aislados de ratones instilados con bleomicina a los cuales se les administró *in vitro* TSA [100nM]⁴⁵ o TubA [50µM].

➤ ***TSA y TubA disminuyen la proliferación celular in vivo e in vitro***

En la figura 19 se muestran los resultados del ensayo de proliferación de fibroblastos que fueron extraídos de ratones tratados a 21 días. No se observaron diferencias a las 24 y 48 horas de estudio en ninguno de los grupos; sin embargo, a las 72 horas, observamos que TSA induce una disminución de la proliferación mientras que en el caso del grupo Bleo hay un incremento significativo (1.69 ± 0.38 en TSA y 3.8 ± 0.33 en Bleo contra 2.68 ± 0.08 en Ctrl; $p < 0.05$). En este ensayo no se encontraron diferencias entre el grupo de animales instilados con bleomicina y los grupos B+TSA y B+TubA.

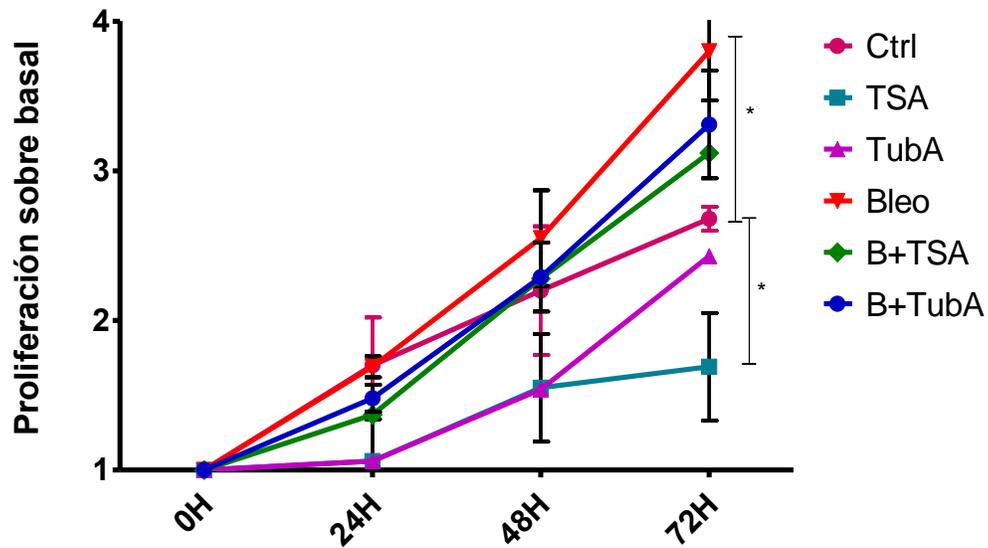


Figura 19. Gráfica de proliferacion de fibroblastos de pulmón de ratones a 21 días. La gráfica representa en cada punto el promedio de 3 diferentes líneas evaluadas por triplicado. * $p < 0.05$

En paralelo se evaluó la proliferación de fibroblastos extraídos de ratones instilados con bleomicina y que fueron tratados *in vitro* con los inhibidores. En este ensayo y solo como referencia, se incluyeron fibroblastos de ratones sin tratamiento (Ctrl). En la Figura 20 podemos observar que a diferencia del grupo Bleo, los fibroblastos que fueron tratados con TSA y TubA tienen una disminución significativa de la proliferación a 48 y 72 horas (Bleo= 3 ± 0.09 vs 2.08 ± 0.1 en TubA y 1.6 ± 0.09 en TSA; $p < 0.001$ en ambos casos).

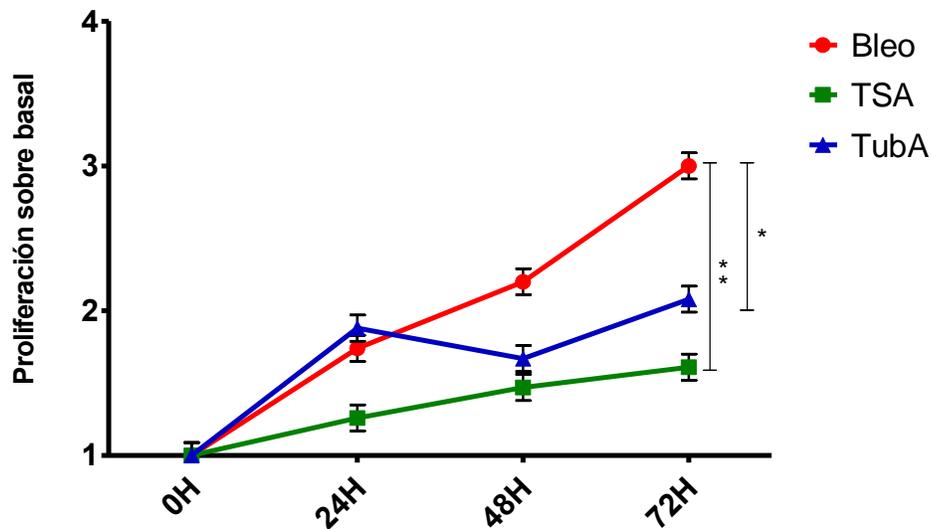


Figura 20. Gráfica de proliferación de fibroblastos aislados de pulmón de ratones instilados con bleomicina (Bleo) que se trataron *in vitro* durante 72 horas con TSA (100nM) o TubA (50uM). La gráfica representa en cada punto el promedio de 3 diferentes líneas evaluadas por triplicado. ** $p < 0.001$ Bleo vs Bleo+TSA y Bleo vs Bleo+TubA. * $p < 0.01$.

➤ **TSA y TubA disminuyen la migración celular**

Con el fin de examinar el efecto de los inhibidores en la capacidad migratoria de los fibroblastos se realizó un ensayo de cierre de herida a 48 horas. En la figura 21 se muestra el ensayo de cierre de herida de fibroblastos aislados de ratones que fueron tratados por 21 días. No se observaron diferencias en el porcentaje de cierre de heridas entre los fibroblastos del grupo Ctrl en comparación con el grupo TSA y TubA (24 ± 2 % en Ctrl; 30 ± 16 % en TSA; 33 ± 16 % en TubA porcentaje de herida sin cerrar). En el caso de fibroblastos del grupo Bleo, se encontró un incremento significativo en la tasa de migración en comparación con el grupo Ctrl (24 ± 2 % en Ctrl vs 0 ± 0 % en Bleo porcentaje de herida sin cerrar). De manera interesante, el tratamiento con TubA disminuye la capacidad de migración de estas células (52 ± 12 % en B+TubA y 35 ± 71 % en B+TSA vs 0 ± 0 % en Bleo; $p < 0.05$). No se observaron diferencias significativas entre el grupo B+TubA y B+TSA.

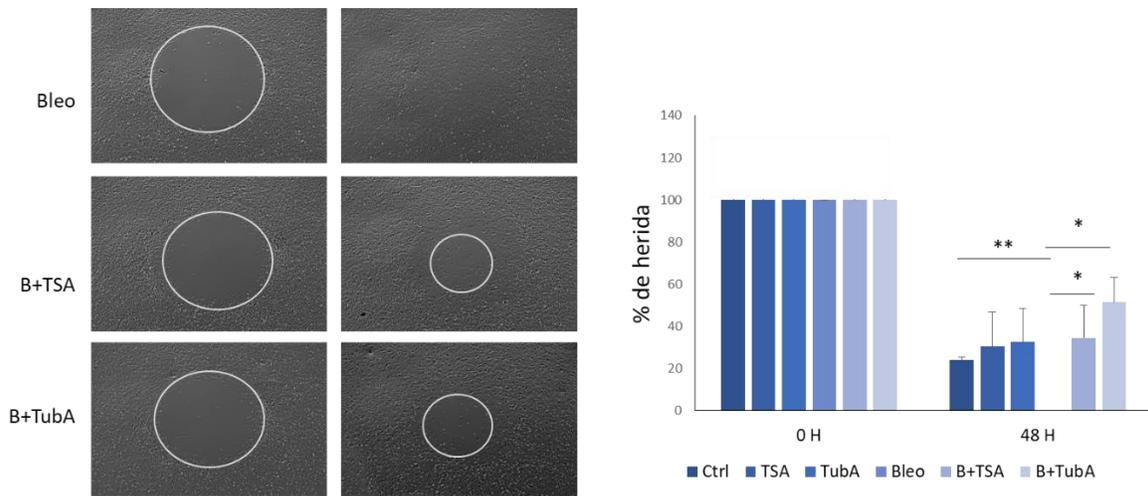


Figura 21. Ensayo de cierre de herida en fibroblastos de pulmón de ratones tratados a 21 días. A: Fotos representativas a 4X de cultivos con herida al tiempo 0 y después de 48 horas. B: Gráfica del análisis de cierre de herida. Las barras representan el promedio y desviación estándar de dos experimentos independientes por duplicado. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Adicionalmente fibroblastos aislados de ratones instilados con bleomicina fueron tratados in vitro con TSA o TubA durante el ensayo de cierre de herida. La figura 22 muestra que fibroblastos provenientes de ratones instilados con bleomicina presentan un aumento en la capacidad de cierre de herida en comparación con fibroblastos obtenidos del grupo control ($p < 0.05$) e interesantemente, al tratar los fibroblastos del grupo de Bleo con los inhibidores farmacológicos observamos que se reduce significativamente la migración celular ($23 \pm 1\%$ en Ctrl vs 0 ± 0 en Bleo; $20 \pm 2\%$ en B+TSA y $24 \pm 4\%$ en B+TubA vs Bleo; se muestra el porcentaje de herida que no cerró. * $p < 0.05$).

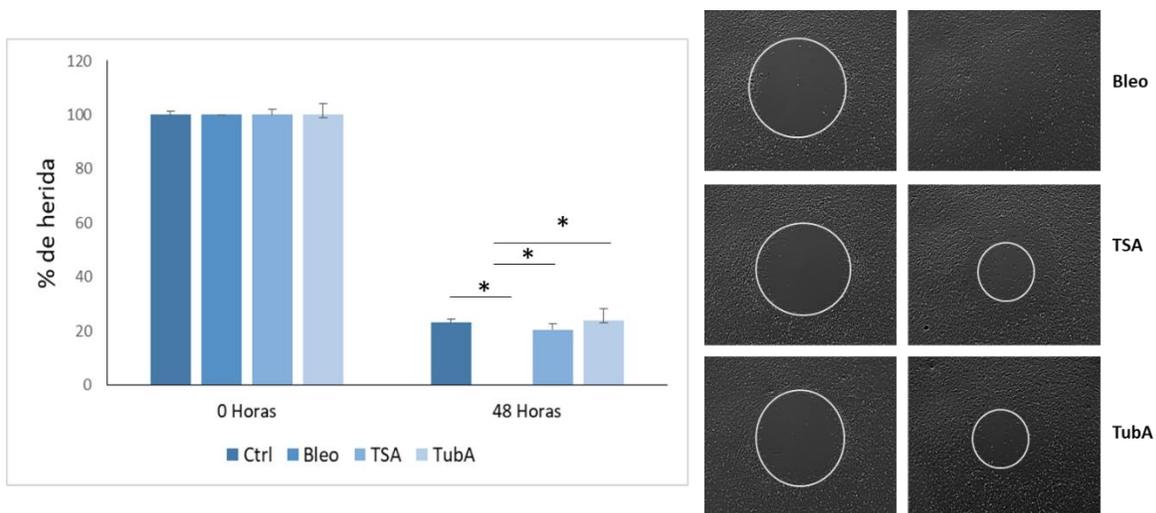


Figura 22. Ensayo de cierre de herida en fibroblastos de pulmón de ratones tratados con bleomicina durante 21 (Bleo) que se trataron *in vitro* durante 8 horas con TSA (100nM) o TubA (50uM). A: Fotos representativas a 4X de cultivos con herida al tiempo 0 y después de 48 horas. B: Gráfica del análisis de cierre de herida. Las barras representan el promedio y desviación estándar de dos experimentos independientes por duplicado. † $p < 0.05$ Bleo vs Ctrl; * $p < 0.05$ Bleo vs Bleo+TSA y Bleo+TubA.

➤ **TSA disminuye la activación de la vía de señalización del TGF- β 1**

Un componente importante en la patología de la fibrosis pulmonar es el TGF- β 1 por lo que se evaluó el posible efecto de los inhibidores en la activación o represión de la vía canónica del TGF- β 1. Fibroblastos aislados de ratones que recibieron el tratamiento con los inhibidores por 21 días fueron estimulados *in vitro* con TGF- β 1 y posteriormente por medio de WB se detectó el complejo Smad2/3 fosforilado como un indicador de activación de la vía (Figura 23). Encontramos que los fibroblastos del grupo de bleomicina responden al estímulo con una mayor expresión del complejo Smad2/3 fosforilado respecto a fibroblastos del grupo control ($p < 0.05$). Al estimular con TGF- β 1 a los fibroblastos de ratones del grupo Bleo que recibieron el tratamiento con los inhibidores encontramos dos respuestas diferentes. Por un lado, observamos que los fibroblastos del grupo B+TSA tienen una disminución en la presencia del complejo Smad2/3 fosforilado mientras que en el

caso del grupo B+TubA no se observaron diferencias en comparación con el grupo Bleo.

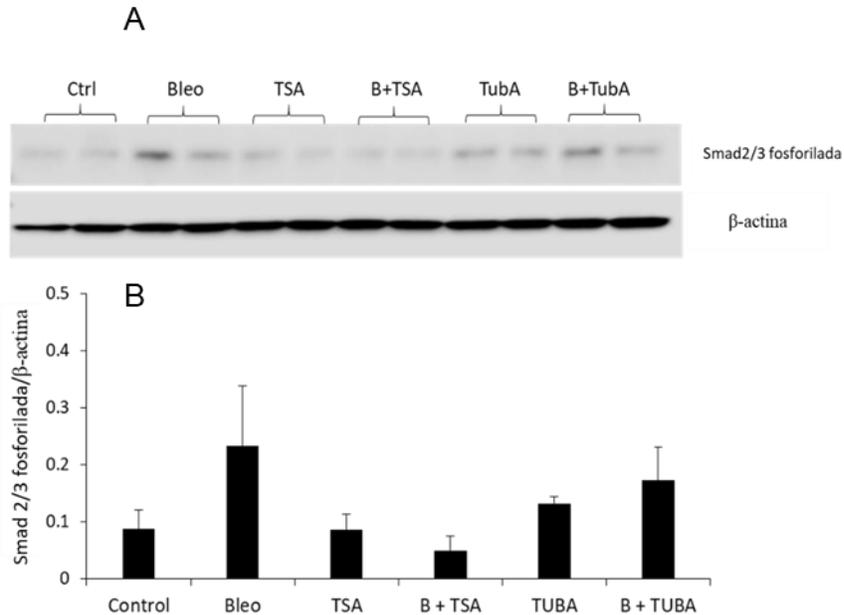


Figura 23. Detección de la Smad 2/3 fosforilada por inmunoblot en extracto total de proteína de pulmones de ratones a 21 días. **A.** Imagen representativa de WB de la Smad 2/3 fosforilada y β-actina que fue usado como control de carga. **B.** Gráfica del análisis por densitometría n=4

➤ ***TSA y TubA reducen la proliferación y migración en la línea de células epiteliales de ratón MLE12***

Debido a que las células del epitelio alveolar pueden contribuir al desarrollo de la fibrosis pulmonar nos preguntamos si TSA y TubA tienen algún efecto en la proliferación y migración de células epiteliales de ratón de la línea MLE-12. El ensayo de proliferación (Figura 24A) muestra que el tratamiento con los inhibidores TSA o TubA reduce de manera significativa la proliferación celular en todos los tiempos de estudio en comparación con las células que no recibieron ningún tratamiento (Ctrl), siendo que en el grupo TSA la proliferación prácticamente se mantuvo igual desde las 24 y hasta las 72 horas. Por su parte, el ensayo de

reparación de herida (Figura 24B) muestra que los dos inhibidores reducen la migración celular pero en este caso, TubA tuvo un efecto más contundente.

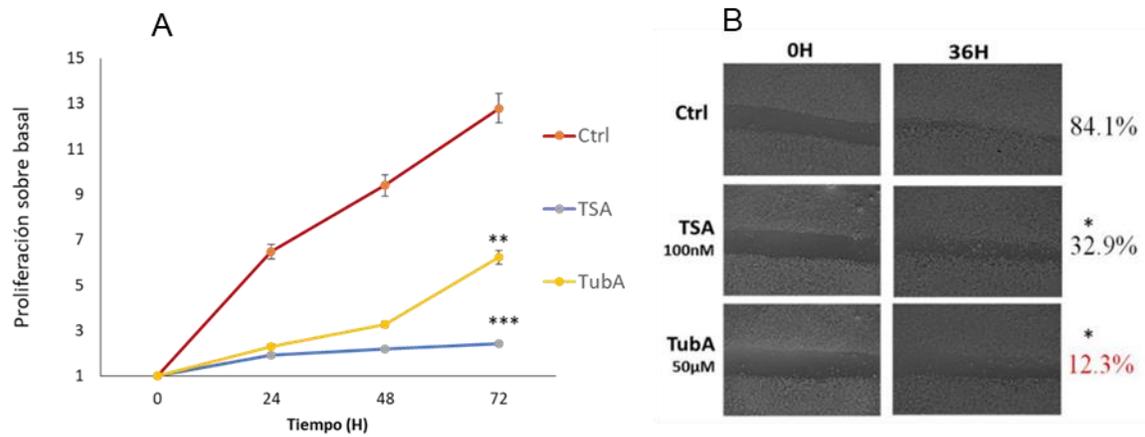


Figura 21. Gráfica del ensayo de proliferación (A) y ensayo de cierre de herida (B) de células epiteliales de pulmón (MLE12) tratadas in vitro con TSA (100nM) o TubA (50uM).

DISCUSIÓN

La fibrosis pulmonar es la condición final de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID), se caracteriza por la proliferación y activación de fibroblastos y depósito exagerado de matriz extracelular que conduce a una devastadora destrucción del parénquima pulmonar y pérdida de su función. La administración de inhibidores no específicos de desacetilasas de histonas (HDACs) ha demostrado reducir el daño fibrotico en modelos de fibrosis renal, hepática, cardíaca y pulmonar.⁴⁶ En este proyecto se evaluó el efecto de la inhibición de HDACs y en particular de la HDAC6 mediante el uso de TSA y TubA respectivamente. Se evaluó el efecto de los inhibidores a 7 días, que representa el punto más alto de la etapa inflamatoria y a 21 y 28 días, que representan puntos de la etapa fibrotica.

Las diversas funciones de HDAC6 sugieren que es un posible blanco terapéutico para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades entre ellas la fibrosis pulmonar. Además de la identificación de sustratos no histonicos regulados por la HDAC6, se han identificado varias proteínas que interactúan con HDAC6; estos incluyen la ATPasa p97, el componente p150 del complejo motor de dineinas, la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1 (PP1), la sirtuina 2 (Sirt2) Así como con los factores de transcripción NF- κ B y Runx2, y con el co-regulador transcripcional con actividad de acetiltransferasa de lisinas p300.⁴⁰

En el modelo experimental de fibrosis pulmonar observó que al instilar los ratones con bleomicina hay un incremento en la expresión de la HDAC6 y que la inhibición de esta molécula tiene un efecto protector de la fibrosis pulmonar. Se sabe que en la fibrosis pulmonar idiopática la mayoría de las desacetilasas se encuentran sobre expresadas en pulmón, principalmente en los focos de fibroblastos y miofibroblastos y que esto favorece la expresión de moléculas pro-fibrosantes. Korfei y colaboradores observaron que al tratar fibroblastos provenientes de pacientes con FPI hay una disminución significativa en la expresión

de genes asociados con la síntesis de moléculas de matriz extracelular así como en la proliferación celular. Cabe destacar que a diferencia del resto de las HDACs, la HDAC6 se encontró sobre expresada en las células epiteliales tipo II, una de las principales células efectoras en el proceso fibrosante.⁴⁷

En la etapa inflamatoria encontramos que la instilación con bleomicina promueve un ambiente desacetilado en el pulmón, además de que incrementa la actividad y expresión de la HDAC6. Los resultados muestran que la inhibición de HDAC6 con TubA disminuye los efectos de la bleomicina ya que en el grupo B+TubA encontramos un aumento significativo en la presencia de proteínas acetiladas, así como una disminución significativa de su expresión y actividad específica. Estos resultados sugieren que en la etapa inflamatoria del modelo con bleomicina se genera un ambiente desacetilado en el pulmón que puede favorecer la represión transcripcional y que la inhibición de HDACs, y en particular de la HDAC6, revierten este proceso.

El balance entre la acetilación y desacetilación de proteínas es un proceso fundamental que regula la expresión de una gran variedad de genes. Trabajos previos han demostrado que en la etapa inflamatoria de la fibrosis inducida con bleomicina, existe una disminución en la acetilación de proteínas que pueden provocar un cambio que podría favorecer la producción de proteínas pro-inflamatorias y la perpetuación de procesos fibrocitos a través de la acción de HDAC2.⁴⁸ Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con ambos inhibidores farmacológicos tiene un efecto protector ya que reducen la inflamación inducida con bleomicina. A pesar de que el TSA reduce la inflamación en nuestro modelo, el inhibidor específico de la HDAC6, Tubastatina A, tiene efectos más contundentes. Recientemente, Saito y colaboradores reportaron que la fibrosis pulmonar inducida con bleomicina disminuye en ratones deficientes de HDAC6, sin embargo, en este trabajo no se aborda el efecto que tiene en la etapa inflamatoria.⁴²

El análisis de células y citocinas pro-inflamatorias en esta etapa del modelo, muestra una reducción significativa del infiltrado leucocitario inducido por bleomicina en los animales tratados con ambos inhibidores, pero solo en el caso del grupo B+TubA, se encontró una reducción significativa de neutrófilos. De acuerdo a

algunos estudios el aumento de los neutrófilos y sus productos de secreción están asociados con el desarrollo de la fibrosis pulmonar tanto en animales como en humanos ⁴⁹. Por ejemplo, en un modelo de neumonitis por hipersensibilidad se ha sugerido que un aumento de neutrófilos que pueden amplificar la respuesta fibrotica debido a la secreción de citocinas proinflamatorias.⁵⁰ Además, estas células pueden liberar una amplia gama de especies reactivas de oxígeno, factores de crecimiento y proteasas que a su vez pueden desencadenar una respuesta fibrotica ⁵¹. Sin embargo no hay estudios que relacionen directamente la HDAC6 con los neutrófilos, se sabe que el uso de TubA tiene efecto regulatorio en células asociadas a procesos inflamatorios^{52,53}, por lo que sería interesante evaluar si la HDAC6 está inhibiendo el reclutamiento de neutrófilos a las zonas de lesión.

La expresión de citocinas está regulada por factores de transcripción como el NF- κ B2. Este factor de transcripción se ha asociado a procesos inflamatorios ya que regula la expresión de diversos genes, entre ellos la IL-6. La IL-6 mostró una reducción significativa cuando los animales instilados con bleomicina recibieron el tratamiento con TubA. En este contexto analizamos la expresión de NF- κ B2 y observamos que en los animales instilados con bleomicina se incrementa su expresión y que únicamente el tratamiento con tubastatina A la reduce.

Estudios recientes han demostrado que la familia de factores de transcripción NF- κ B son susceptibles a ser acetilados y que la subunidad p65 del complejo tiene la capacidad de interactuar con algunas HDAC como la 1 y 2 para regular de forma negativa la expresión de sus genes blanco.⁵⁴ Esto podría explicar lo observado en los resultados cuando los ratones instilados con bleomicina reciben el tratamiento con TubA ya que observamos una disminución en la concentración de IL-6, sin embargo, es importante realizar un estudio directo donde se pueda evaluar si efectivamente en esta estirpe celular y en esta patología la HDAC6 está regulando la expresión de citosinas a través de la interacción con el factor de transcripción Nf- κ B. Sin embargo, experimentos adicionales son necesarios para determinar con claridad esta relación

Nuestro trabajo es el primero en mostrar que la inhibición de HDAC6 con TubA incrementa la acetilación de proteínas y disminuye la inflamación provocada

por la instilación con bleomicina y de manera importante, expone que la inhibición de HDAC6 por medio de TubA reduce significativamente la presencia de neutrófilos y de IL-6; sin embargo, falta dilucidar qué mecanismos participan en este proceso.

En otros modelos se ha reportado que TubA puede modular respuestas inflamatorias a través de la regulación de IL-6.⁵⁵ Incluso se sabe que la sobreexpresión de HDAC6 incrementa la expresión de citoquinas pro inflamatorias, tales como TNF- α , IL-1 β e IL-6, así como un aumento en las vías de señalización de NF- κ B y AP1 en macrófagos.⁵⁶ Datos en la literatura indican que TubA reduce la fosforilación de NF- κ B y la expresión de citoquinas proinflamatorias.⁵³

Por otro lado se analizó el efecto de la inhibición de HDAC6 en la etapa fibrotica del modelo, 28 días después de la instilación con bleomicina. Estudios en modelos de fibrosis pulmonar han demostrado que el uso de inhibidores generales de HDACs como SAHA, TSA y, VPA reducen el grado y extensión de las lesiones en pulmón, así como el depósito de colágena intersticial al suprimir la expresión y el efecto del TGF- β 1.^{57,58}

Se evaluó la fibrosis por la histología y por la cantidad de colágena (cuantificación de hidroxiprolina) y encontramos que ambos inhibidores disminuyen la fibrosis pulmonar significativamente. Además, el tratamiento con los inhibidores reduce la expresión del RNA mensajero de marcadores distintivos de la fibrosis (TGF- β 1, Col1A1, ACTA2). Estos resultados en conjunto corroboran el posible uso terapéutico de los inhibidores de HDACs en la fibrosis pulmonar y en particular la Tubastatina A la cual mostró efectos más contundentes que el TSA. Anteriormente se mencionó que la HDAC6 está sobre expresada de manera significativa en los animales a los cuales se les indujo fibrosis con bleomicina y que ésta proteína es capaz de interactuar con algunos factores de transcripción modificando su capacidad para inducir la expresión de genes blanco. Uno de los factores de transcripción que potencialmente son regulados por la HDAC6 es el Runx2. Runx2 es un regulador del desarrollo óseo el cual se ha visto implicado en algunos procesos fibroticos. El grupo de Melanie Königshoff recientemente publicó un estudio en el cual muestran que en la fibrosis pulmonar idiopática Runx2 está sobre

expresado en células del epitelio alveolar tipo II y que contribuye a que las células tengan un fenotipo fibrotico, por lo que sería interesante evaluar si en nuestro modelo animal está incrementado y si la HDAC6 está regulando su actividad.⁵⁹

En la etapa fibrotica, también analizamos si la administración de TubA y TSA modificaban el perfil de acetilación por WB y nuestros resultados muestran que ambos inhibidores incrementan la acetilación de proteínas, incluyendo una marca de activación transcripcional (H3K9K14ac); sin embargo, al igual que en la etapa inflamatoria, TubA tiene efectos más contundentes. H3K9K14ac es una marca presente en zonas activas de transcripción y su papel en el desarrollo de la fibrosis no se conoce con precisión y puede ser sujeto de otros estudios para determinar su papel.

En nuestro trabajo demostramos que los inhibidores TSA y TubA reducen la proliferación en los fibroblastos pulmonares de ratón, sin embargo, queda por estudiar cuál es el mecanismo específico. Los inhibidores de desacetilasas de histonas son capaces de regular la proliferación en una amplia gama de líneas celulares. Por ejemplo, en líneas celulares derivadas de linfoma se ha demostrado que el SAHA induce el arresto del ciclo celular en G1 o G2-M, disminuye la expresión de las ciclinas D1 y D2, e incrementa p53, p21 y p27.⁶⁰ Por otro lado, en células musculares el TSA induce la expresión de p21 y en consecuencia el arresto del ciclo celular.^{61,62} De manera similar, un estudio en carcinoma de esófago han demostrado que bajos niveles de HDAC6 pueden inhibir la proliferación celular, mediante el arresto del ciclo celular en la fase G0 / G1 y un incremento en la expresión de p21.⁸

Una de las principales moléculas incrementadas en la fibrosis pulmonar es el TGF- β 1 ya que estimula la proliferación de fibroblastos, promueve la transformación a miofibroblastos, acumulación de matriz extracelular mediante la síntesis de proteínas como fibronectina y diferentes tipos de colágena y evita la degradación de la matriz extracelular mediante la producción de inhibidores de proteasas.⁶³ En este trabajo se observó que TSA inhibe la vía canónica de señalización de TGF- β 1 (Smads) con lo que se reduce la expresión de las moléculas fibrosantes y la acumulación de matriz extracelular por parte de los fibroblastos. Por otro lado, se sabe que al inhibir las HDACs hay disminución en la transición epitelio mesénquima,

un mecanismo importante en la progresión de la fibrosis pulmonar.⁶⁴ Con TubA, el inhibidor específico de la HDAC6, se observa una reducción significativa en la expresión del RNA mensajero del TGF- β 1 y de las moléculas pro fibrosantes, a pesar de que sólo se muestra una inhibición parcial en la vía canónica de señalización del TGF- β 1, por lo que sería interesante determinar cuál si la TubA está disminuyendo la expresión del RNA mensajero y de la proteína por una vía de señalización diferente a la canónica.

Los datos obtenidos concuerdan con estudios realizados por Shan y colaboradores quienes demuestran que la HDAC6 es capaz interrumpir la vía de señalización del TGF- β 1, sin embargo sus estudios se enfocan en la capacidad de la HDAC6 de modular la EMT inducida por TGF- β 1 a través de la acetilación de la α -tubulina. Mostraron que la inhibición de la HDAC6 reduce la expresión de marcadores de EMT y la activación de la smad3. Proponen a la HDAC6 como un importante regulador de la EMT ya que puede interrumpir la vía de señalización del TGF- β 1.⁶⁵

Los inhibidores de desacetilasas de histonas han sido ampliamente estudiados en cáncer, demostrando que estas enzimas regulan diferentes procesos celulares involucrados. Algunos de estos procesos se comparten entre las diferentes enfermedades y nos plantean poder explorar los efectos terapéuticos de estos inhibidores en otras enfermedades, entre ellas los trastornos fibroticos. La mayoría de los estudios que se han realizado entorno a la fibrosis pulmonar es con el uso de inhibidores generales de desacetilasas de histonas, sin embargo en este estudio se observó que el tratamiento con TubA tiene un efecto protector de la fibrosis pulmonar con resultados más contundentes que los observados con el TSA. Por lo tanto, la HDAC6 tiene un papel central en la regulación de la migración, la proliferación y la inflamación. Con base en los resultados obtenidos en el modelo y los publicados por otros grupos, se plantea que la inhibición de la actividad de HDAC6 puede llevar a nuevas estrategias terapéuticas en estas enfermedades.

CONCLUSIONES

El tratamiento con TubA en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina incrementa la acetilación global de proteínas así como la acetilación de las histonas. Reduce la actividad de desacetilasa de la HDAC6 en las dos etapas evaluadas del modelo.

TubA tiene un efecto protector en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina inhibiendo el proceso inflamatorio. Disminuye el grado y extensión de las lesiones inducidas por bleomicina, reduce el número de células leucocitarias infiltradas al pulmón especialmente los neutrófilos. Disminuyen la expresión de IL-6 y NF- κ B.

En la etapa fibrotica reduce la expresión de RNA mensajero de moléculas pro fibrosantes y disminuye el depósito de colágena en el pulmón.

El inhibidor específico, TubA, disminuye el efecto inducido por bleomicina en procesos asociados al desarrollo de fibrosis; reduce la migración y proliferación celular inducida por bleomicina.

En este trabajo se observó que la TubA tiene efectos en las diferentes etapas de modelo de fibrosis pulmonar experimental por lo que sería importante evaluar las vías por las cuales está actuando.

LITERATURA CITADA

1. King, T. E., Pardo, A. & Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* **378**, (2011).
2. Fernandez, I. E. & Eickelberg, O. The Impact of TGF- β on Lung Fibrosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **9**, 111–116 (2012).
3. Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **128**, 693–705 (2007).
4. Hagood, J. S. & Sanders, Y. Y. The Effects Of Histone Deacetylase Inhibitors On Fibrotic Lung Fibroblasts Survival And Apoptosis.
5. Rombouts, K. *et al.* Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses collagen synthesis and prevents TGF-beta(1)-induced fibrogenesis in skin fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **278**, 184–197 (2002).
6. Mannaerts, I. *et al.* Chronic administration of valproic acid inhibits activation of mouse hepatic stellate cells in vitro and in vivo. *Hepatology* **51**, 603–14 (2010).
7. Hubbert, C. *et al.* HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455–458 (2002).
8. Li, N. *et al.* Effects of Down-regulation of HDAC6 Expression on Proliferation, Cell Cycling and Migration of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells and Related Molecular Mechanisms. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **14**, 685–9 (2013).
9. Xaubet, A. *et al.* Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas ('03). *Arch Bronconeumol* **39**, 580–600 (2003).
10. Ancochea, J. Enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID). *Neumosur* **18**, 7–19 (2007).
11. Selman, M. *et al.* Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behavior and gene expression pattern. *PLoS One* **2**, e482 (2007).
12. Taskar, V. S. & Coultas, D. B. Is Idiopathic Pulmonary Fibrosis an Environmental Disease? *Proc. Am. Thorac. Soc.* **3**, 293–298 (2006).
13. Fingerlin, T. E. *et al.* Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nat. Genet.* **45**, 613–620 (2013).
14. Armanios, M. *et al.* Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1317–26 (2007).
15. Raghu, G. *et al.* An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **192**, e3–e19 (2015).
16. Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J. & Kolb, M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis?
17. Tashiro, J. *et al.* Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front. Med.* **4**, 118 (2017).

18. Cabrera, S. *et al.* Gene expression profiles reveal molecular mechanisms involved in the. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2013). doi:10.1152/ajplung.00320.2012
19. Izbicki, G. *et al.* Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int. J. Exp. Path* **83**, 111–119 (2002).
20. Liu, W. *et al.* Antiflammin-1 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Respir. Res.* **14**, 101 (2013).
21. Della Latta, V., Cecchetti, A., Del Ry, S. & Morales, M. A. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. *Pharmacol. Res.* **97**, 122–130 (2015).
22. Zentner, G. E. & Henikoff, S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 259–266 (2013).
23. Haberland, M., Montgomery, R. L. & Olson, E. N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 32–42 (2009).
24. Tessarz, P. & Kouzarides, T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 703–708 (2014).
25. Shahbazian, M. D. & Grunstein, M. Functions of Site-Specific Histone Acetylation and Deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 75–100 (2007).
26. Ruthenburg, A. J., Li, H., Patel, D. J. & Allis, C. D. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 983–994 (2007).
27. Pang, M. & Zhuang, S. Histone Deacetylase: A Potential Therapeutic Target for Fibrotic Disorders. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **335**, 266–272 (2010).
28. Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–45 (2000).
29. M De Ruijter, A. J., Van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. & Van Kuilenburg, B. P. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J* **370**, 737–749 (2003).
30. Roche, J. & Bertrand, P. Inside HDACs with more selective HDAC inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* **121**, 451–483 (2016).
31. Seto, E. & Yoshida, M. Erasers of histone acetylation: The histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, (2014).
32. Shirakawa, K., Chavez, L., Hakre, S., Calvanese, V. & Verdin, E. Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. *Trends in Microbiology* **21**, 277–285 (2013).
33. Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Grozinger, C. M. & Schreiber, S. L. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4389–4394 (2003).
34. Boucherat, O. *et al.* HDAC6: A Novel Histone Deacetylase Implicated in Pulmonary Arterial Hypertension. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
35. YOSHIDA, M., KUDO, N., KOSONO, S. & ITO, A. Chemical and structural biology of protein lysine deacetylases. *Proc. Japan Acad. Ser. B* **93**, 297–321 (2017).

36. Pang, M. & Zhuang, S. Histone Deacetylase: A Potential Therapeutic Target for Fibrotic Disorders. doi:10.1124/jpet.110.168385
37. Guo, W., Shan, B., Klingsberg, R. C., Qin, X. & Lasky, J. A. Abrogation of TGF-beta1-induced fibroblast-myofibroblast differentiation by histone deacetylase inhibition. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **297**, L864-70 (2009).
38. Ye, Q. *et al.* Prevention of pulmonary fibrosis via trichostatin A (TSA) in bleomycin induced rats. *Sarcoidosis Vasc. Diffus. Lung Dis.* **31**, 219–226 (2014).
39. Park, I.-H., Kang, J.-H., Shin, J.-M. & Lee, H.-M. Trichostatin A Inhibits Epithelial Mesenchymal Transition Induced by TGF-β1 in Airway Epithelium. *PLoS One* **11**, e0162058 (2016).
40. Tao, H., Yang, J. J., Hu, W., Shi, K. H. & Li, J. HDAC6 Promotes Cardiac Fibrosis Progression through Suppressing RASSF1A Expression. *Cardiology* **133**, 18–26 (2016).
41. Choi, S. Y. *et al.* Tubastatin A suppresses renal fibrosis via regulation of epigenetic histone modification and Smad3-dependent fibrotic genes. *Vascul. Pharmacol.* **72**, 130–140 (2015).
42. Saito, S. *et al.* Tubastatin ameliorates pulmonary fibrosis by targeting the TGFβ-PI3K-Akt pathway. *PLoS One* **12**, e0186615 (2017).
43. Ye, Q. *et al.* Prevention of Pulmonary Fibrosis via Trichostatin A (TSA) in Bleomycin Induced Rats. *Sarcoidosis, Vasc. Diffus. lung Dis. Off. J. WASOG* **31**, 219–26 (2014).
44. Woessner, J. F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 440–447 (1961).
45. Sanders, Y. Y., Tollefsbol, T. O., Varisco, B. M. & Hagood, J. S. Epigenetic regulation of Thy-1 by histone deacetylase inhibitor in rat lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **45**, 16–23 (2011).
46. Yang, I. V. & Schwartz, D. A. Epigenetics of idiopathic pulmonary fibrosis. *Translational Research* **165**, 48–60 (2015).
47. Korfei, M. *et al.* Aberrant expression and activity of histone deacetylases in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* **70**, 1022–32 (2015).
48. Li, M., Zheng, Y., Yuan, H., Liu, Y. & Wen, X. Effects of dynamic changes in histone acetylation and deacetylase activity on pulmonary fibrosis. *Int. Immunopharmacol.* **52**, 272–280 (2017).
49. Chua, F. *et al.* Mice lacking neutrophil elastase are resistant to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* (2007). doi:10.2353/ajpath.2007.060352
50. Hasan, S. A. *et al.* Role of IL-17A and neutrophils in fibrosis in experimental hypersensitivity pneumonitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 1663–1673.e5 (2013).
51. Obayashi, Y. *et al.* The role of neutrophils in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* (1997). doi:10.1089/ars.2007.1897
52. Vishwakarma, S. *et al.* Tubastatin, a selective histone deacetylase 6 inhibitor shows anti-inflammatory and anti-rheumatic effects. *Int. Immunopharmacol.* **16**, 72–78 (2013).

53. Shi, Y. *et al.* Inhibition of HDAC6 protects against rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **312**, F502–F515 (2017).
54. Ashburner, B. P., Westerheide, S. D. & Baldwin, A. S. The p65 (RelA) Subunit of NF- κ B Interacts with the Histone Deacetylase (HDAC) Corepressors HDAC1 and HDAC2 To Negatively Regulate Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7065–7077 (2001).
55. Lee, J. *et al.* A novel histone deacetylase 6-selective inhibitor suppresses synovial inflammation and joint destruction in a collagen antibody-induced arthritis mouse model. *Int. J. Rheum. Dis.* **18**, 514–523 (2015).
56. Youn, G. S., Lee, K. W., Choi, S. Y. & Park, J. Overexpression of HDAC6 induces pro-inflammatory responses by regulating ROS-MAPK-NF- κ B/AP-1 signaling pathways in macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* **97**, 14–23 (2016).
57. Kabel, A. M., Omar, M. S. & Elmaaboud, M. A. A. Amelioration of bleomycin-induced lung fibrosis in rats by valproic acid and butyrate: Role of nuclear factor kappa-B, proinflammatory cytokines and oxidative stress. *Int. Immunopharmacol.* **39**, (2016).
58. Wang, Z. *et al.* Suberoylanilide hydroxamic acid: a potential epigenetic therapeutic agent for lung fibrosis? *Eur. Respir. J.* **34**, 145–55 (2009).
59. Mümmeler, C. *et al.* Cell-specific expression of runt-related transcription factor 2 contributes to pulmonary fibrosis. *FASEB J.* fj.201700482R (2017). doi:10.1096/fj.201700482R
60. Sakajiri, S. *et al.* Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoid cancer cell lines. *Exp Hematol* **33**, 53–61 (2005).
61. Okamoto, H. *et al.* Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylase, inhibits smooth muscle cell proliferation via induction of p21(WAF1). *J. Atheroscler. Thromb.* **13**, 183–191 (2006).
62. Santini, V., Gozzini, a & Ferrari, G. Histone deacetylase inhibitors: molecular and biological activity as a premise to clinical application. *Curr Drug Metab* **8**, 383–93 (2007).
63. Sureshbabu, A., Tonner, E., Allan, G. J. & Flint, D. J. Relative Roles of TGF- β and IGFBP-5 in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Pulm. Med.* **2011**, 1–6 (2011).
64. Yoshikawa, M., Hishikawa, K., Marumo, T. & Fujita, T. Inhibition of histone deacetylase activity suppresses epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF-beta1 in human renal epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 58–65 (2007).
65. Shan, B. *et al.* Requirement of HDAC6 for transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* **283**, 21065–73 (2008).