



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**PAPEL DEL TGF- β 1 EN EL PERFIL DE EXPRESIÓN Y METILACIÓN DEL ADN
DE FIBROBLASTOS DE PULMÓN HUMANO NORMAL Y DE PULMONES CON
FPI**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
MIGUEL ANGEL NEGREROS AMAYA

DIRECTORA DE TESIS
DRA. ANNIE PARDO CEMO
FACULTAD DE CIENCIAS

COMITÉ TUTOR
DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
DRA. ESTHER LÓPEZ -BAYGHEN PATIÑO
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA, CINVESTAV

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, MARZO DE 2020



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.

“Try to love the questions themselves as if they were locked rooms or books written in a very foreign language. Don’t search for the answers, which could not be given to you now, because you would not be able to live them. And the point is to live everything. Live the questions now. Perhaps then, someday far in the future, you will gradually, without even noticing it, live your way into the answer.”

Rainer Maria Rilke

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en particular a la Facultad de Ciencias, y a la Facultad de Medicina.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por todos los apoyos, principalmente por la beca número 239706 y los apoyos que me permitieron realizar la estancia de investigación.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por los apoyos recibidos para poder asistir a congresos.

A la fundación Alberto y Dolores Andrade (ADA), por todo el apoyo recibido desde el inicio de mi formación académica.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER) por brindarme todas las facilidades e infraestructura para la realización de mis experimentos.

A la Universidad de California con sede en San Diego (UCSD) por permitirme realizar los experimentos pertinentes durante mi estancia.

Al M. en C. Miguel Ramírez Aragón del IFC, al apoyo técnico otorgado durante el inicio del proyecto.

Al comité tutor conformado por la Dra. Annie Pardo, la Dra. Marcia Hiriart y la Dra. Esther Lopez-Bayghen, por su tiempo y disposición en cada tutorial y durante todo el proceso en general.

A los miembros del Jurado de Examen de Grado: Dra. Victoria Eugenia Chagoya y Hazas, Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dra. Paula Licon Limón y Dr. Joaquín Alejandro Zúñiga Ramos

La conclusión de esta etapa, llena de tropiezos y aprendizajes ha sido verdaderamente el resultado del apoyo esfuerzo y cariño, de mucha gente a la que quisiera agradecer.

Quisiera comenzar con mi familia a quien dedico particularmente este trabajo, a mis padres Socorro y Refugio, que con su ejemplo me han mostrado el camino y me han dado las herramientas sin las cuáles me hubiera sido imposible llegar hasta aquí y a mis hermanos, Teresa y Gonzalo, por escucharme, entenderme y animarme cuando fue necesario.

Me gustaría dar un agradecimiento especial a mi tutora, la Dra. Annie Pardo Cemo, quien contribuyó significativamente en mi crecimiento como investigador al darme la confianza de proponer un proyecto alejado del enfoque principal del laboratorio y apoyarme en la realización del mismo hasta hacerlo verdaderamente mío. Todo mi aprecio y admiración.

Al Dr. Moisés Selman, que con su experiencia me permitió ser (un poco) menos rebuscado al escribir resúmenes y contestar a los revisores, gracias por su atención y paciencia.

A todos los miembros actuales y pasados del grupo de investigación en Fibrosis Pulmonar (INER/Facultad de Ciencias) a Carlos Ramos y a Martha Montaña, por permitirme estar en el laboratorio de Biología Celular, a Ana Lilia Torres por los consejos mañaneros, a Víctor Ruiz por siempre estar dispuesto a ayudar, a Erika Rubí por su incansable alegría, a Carina Becerril por todas las consultas otorgadas (técnicas y personales), a Ana Mayela por las tardes-noches de trabajo que se hicieron más ligeras con su compañía, a Ivette Buendía: porque siempre te diste el tiempo para mí aunque no lo tuvieras, muchas gracias Doctora; a Fernanda Toscano por esas platicas repartidas que nos permitíamos a pesar de nuestras agendas, a Iliana Herrera por su cálido abrazo acompañado de cafeína que energizaban mis mañanas, a José Cisneros por su juicio crudo y severo (pero siempre bien intencionado) de la vida, a Juan Manuel y Andrea por esos ratos de aprendizaje bidireccional en el laboratorio, a Gabriela Díaz Piña, a Yair Romero, a Luis Plácido, a Jorge García, a Remedios Ramírez y a mi estimada Paty Zurita.

A las Licenciadas Leticia Ordaz García y Nidia Mimila Martínez por todos estos años de apoyo y acompañamiento.

Al Dr. James S. Hagood por preocuparse, tanto por el avance en el proyecto como por hacerme sentir menos ajeno en un país que no era el mío (y por intentar enseñarme a surfear, prometo intentarlo de nuevo algún día). A todos los miembros del Hagood's Lab, por su amabilidad, atenciones, tiempo y conocimiento, en especial a Celia Espinoza.

A mi jefe el Dr. Flores Suárez, por la paciencia y el tiempo prestado para la publicación del artículo y los trámites de la obtención de grado.

A Adrián Munguía, al Sr Ramírez, a Gael Huitrón y Fernando Hernández (Dr. Pollo), por no dejarme vencer, por sus buenos consejos, por su visión relajada de la vida y por mantenerme preparado ante todos los escenarios posibles (e imposibles). Por todos esos jueves que me mantuvieron cuerdo, cuando era fácil no estarlo.

A Yalbi Balderas que sin darme cuenta se convirtió en un apoyo constante y que, con su empático consejo, me permitió ponerme de pie en más de una ocasión.

A Criselda Mendoza, por toda la ayuda otorgada, por escucharme cuando necesitaba hablar, por darme la mano cuando no tenía donde apoyarme, y en general por mantenerme aquí, gracias Cris.

A Mariel Maldonado, mi Marielita querida, por su incansable interés y por otorgarme ese impulso persistente y sistemático que me ayudaban a dar el paso.

A Patricia Jácome, por ayudarme a buscar el balance para mantenerme en movimiento. Gracias por tus reflexiones, consejos y cariño.

A mi muy querida Itzue. Gracias por todos estos años que, ya fuera estando a mi lado en aquel nuestro sillón rojo o en otro continente subiendo montañas, siempre has logrado entenderme, cuidarme, aconsejarme e inspirarme de formas insospechadas e increíbles. Gracias por ayudarme a ser más amable conmigo mismo y por recordarme lo bueno de esta decisión de vida, te quiero. A la Señora Maribel, gracias por estar al pendiente de mí todos estos años. Por el cariño y las palabras de aliento.

Me gustaría también agradecer a todos los que se mantuvieron cercanos de una u otra manera a pesar del poco tiempo disponible, y que de vez en cuando me ayudaron a soltar las micropipetas para tomarlas con más fuerza al día siguiente. A Eduardo Hernández, Raúl Yescas, Fernanda P. Miranda, a Den, a mis amigos de la Prepa (Noelia, Lola, Groov, los Sergios, Arthur y Luis) a todos ustedes, gracias.

Y finalmente a Ezequiel Córdoba, que en este corto tiempo me apoyaste con tus cuidados paciencia y cariño a ser cada día mejor.

Índice General

Resumen	1
Abstract.....	2
Abreviaturas.....	3
Introducción.....	5
Objetivos	17
Material y Métodos	18
Resultados.....	21
Discusión	30
Referencias	35
Anexos.....	42

Resumen

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad compleja de etiología desconocida. Los factores ambientales pueden afectar la susceptibilidad a la enfermedad a través de efectos epigenéticos. Algunos estudios han explorado la metilación global del ADN en fibroblastos de pulmón, pero ninguno se ha centrado en transformar el factor de crecimiento beta-1 (TGF- β 1) como un posible modificador del metiloma del ADN. Aquí analizamos los cambios en la metilación y la transcripción génica en fibroblastos normales e FPI post-tratamiento con TGF- β 1.

En este trabajo analizamos los efectos de TGF- β 1 en fibroblastos primarios derivados de pulmones normales o de FPI tratados durante 24 horas y 5 días usando la plataforma de análisis de metilación humana Illumina 450k y la matriz de análisis de expresión génica humana Prime View. Encontramos que TGF- β 1 indujo un mayor número de cambios en la expresión génica después del tratamiento a corto plazo en fibroblastos normales, mientras que se observaron mayores cambios en la metilación después de la estimulación a largo plazo, principalmente en fibroblastos de FPI. La metiltransferasa 3 alfa de ADN (DNMT3a) y la metilcitosina dioxigenasa 3 de tet (TET3) aumentaron su expresión con 5 días de tratamiento con TGF- β 1 en ambos tipos de células, mientras que el DNMT3a aumentó después de 24 h solo en fibroblastos FPI.

Nuestros hallazgos demuestran que TGF- β 1 indujo la regulación positiva de la expresión de DNMT3a y TET3 y cambios profundos en el patrón de metilación del ADN de los fibroblastos, principalmente en los derivados de los pulmones de FPI.

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis is a complex disease of unknown etiology. Environmental factors can affect disease susceptibility via epigenetic effects. Few studies explore global DNA methylation in lung fibroblasts, but none have focused on transforming growth factor beta-1 (TGF- β) as a potential modifier of the DNA methylome. Here we analyzed changes in methylation and gene transcription in normal and FPI fibroblasts following TGF- β 1 treatment.

We analyzed the effects of TGF- β 1 on primary fibroblasts derived from normal or FPI lungs treated for 24 hours and 5 days using the Illumina 450k Human Methylation array and the Prime View Human Gene Expression Array. TGF- β 1 induced an increased number of gene expression changes after short term treatment in normal fibroblasts, whereas greater methylation changes were observed following long term stimulation mainly in FPI fibroblasts. DNA methyltransferase 3 alpha (DNMT3a) and tet methylcytosine dioxygenase 3 (TET3) were upregulated after the 5-days TGF- β 1 treatment in both cell types, whereas DNMT3a was upregulated after 24h only in FPI fibroblasts.

Our findings demonstrate that TGF- β 1 induced the upregulation of DNMT3a and TET3 expression and profound changes in the DNA methylation pattern of fibroblasts, mainly in those derived from FPI lungs.

Abreviaturas

ACTA2	Actina alfa 2, músculo liso
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácidos ribonucléico
COL1A1	Colágena 1 alfa 1
COL1A2	Colágena 1 alfa 2
CpG	Citosina-Guanina
CHARM	Análisis integrado de perfiles de metiloma
DML	Loci diferencialmente metilado
DNMT	Metiltransferasa de ADN
EPID	Enfermedades pulmonares intersticiales difusas
FnEDA	Variante de splicing de Fibronectina-EDA
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
GO	Ontología Genética
GOBP	Ontología Genética Proceso Biológico
HPRT1	Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa1
Kb	Kilobase
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
NHLF	Fibroblastos pulmonares humanos normales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
POLR2A	Subunidad A de ARN polimerasa II
qRT-PCR	Transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa
SMYD3	Proteína que contiene el dominio SET y MYND 3
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
SREBP	Señalización de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides
TET3	Tet metilcitosina dioxigenasa 3
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante Beta 1
THY1	Antígeno de superficie celular Thy-1
TSS	Sitio de inicio de la Transcripción

UCSC	Universidad de California, Santa Cruz
UTR	Región no traducida
24h	24 horas
5d	5 días
5hmC	5-hidroximetilcitosina

Introducción

Aparato Respiratorio

Las células requieren oxígeno (O^2) para sus reacciones metabólicas y liberan CO^2 que en grandes cantidades puede cambiar el pH del entorno, resultando tóxico. El aparato respiratorio cumple un papel primordial en la homeostasis del organismo al abastecer de oxígeno proveniente del aire atmosférico, a la sangre y a las células de los tejidos e intercambiarlo por CO^2 que será exhalado al ambiente. Para cumplir con esta función, en los humanos existen dos pulmones, los cuales se encuentran en la cavidad torácica donde comparten localización con el corazón el esófago y otras estructuras. Los pulmones se encuentran recubiertos por la pleura visceral, mientras que la pleura parietal hace lo propio con la cavidad torácica en su parte interna. Ambas convergen en el hilum de cada pulmón. El pulmón derecho está formado por tres lóbulos mientras que el izquierdo solo por dos, esto correlaciona con el tamaño (350 y 250g) mientras que el volumen individual varía entre 3.5 y 8 L según el individuo.[1]

Las vías aéreas comienzan en la tráquea, que se divide en dos bronquios principales. Las siguientes bifurcaciones dan origen a los bronquiolos (primero membranosos y luego respiratorios), posteriormente a los conductos y sacos, hasta llegar a los alveolos. Las paredes de los alvéolos tienen dos tipos de células epiteliales, las más numerosas son las células alveolares tipo I y las células alveolares tipo II. Las primeras, un epitelio plano simple, constituyen el sitio principal de intercambio gaseoso mientras que las segundas, células epiteliales cúbicas, tienen como función mantener húmeda la superficie y evitar el colapso de los alveolos mediante la producción de líquido alveolar. Las células alveolares I y II junto con los macrófagos alveolares forman la pared alveolar. La pared alveolar, el endotelio capilar, así como sus respectivas membranas basales forman la membrana respiratoria, estructura muy delgada, de alrededor de 0.5 micras donde se da el intercambio gaseoso entre el plasma y el espacio alveolar. [1, 2]

Enfermedades Pulmonares

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) comprenden un amplio número de enfermedades pulmonares que consisten en una combinación de inflamación y fibrosis del parénquima. Existe diversas causas de EPID, que usualmente resultan de una gran variedad de exposiciones ambientales, vocacionales, ocupacionales o relacionadas con medicamentos o alternativamente de enfermedades autoinmunes o enfermedades del tejido conectivo. Aunque también existen las de causa desconocida, de donde se desprende la FPI [3].

Fibrosis pulmonar Idiopática

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la forma más común de las EPID (aproximadamente 55%), y es una enfermedad fibrosante pulmonar crónica que lleva a la muerte del paciente usualmente dentro de 3 a 5 años después del diagnóstico, aunque solo un 20% llegará a los 5 años. Posee una prevalencia en los EU de alrededor de 1:120,000, aunque esta ha ido en aumento. Afecta predominantemente a pacientes entre la cuarta y quinta década de su vida. Ante la falta de datos epidemiológicos en México, datos recabados en centros de referencia o extrapolaciones a partir de otros estudios resultan útiles para tener un panorama de lo que ocurre en el territorio nacional.

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), la FPI es una de las tres causas más comunes de morbilidad y mortalidad de EPI y aunque los datos de prevalencia se desconocen en México y toda Latinoamérica a partir de los datos obtenidos de la población española, se calcula que el número de afectados en nuestro país debe de ser de alrededor de unas 10,000 personas. [4]

Como ya se mencionó la FPI es una enfermedad de causa no conocida, sin embargo, se han identificado varios factores de riesgo asociados al desarrollo de la misma, como son: pertenecer al género masculino, exposición ocupacional a humos, químicos y gases, tabaquismo, reflujo gastroesofágico y antecedente familiar de fibrosis pulmonar.[5]

Característicamente, las lesiones se encuentran en los lóbulos inferiores con predominancia en regiones subpleurales y el involucro de ambos lóbulos es frecuentemente simétrico. [2]

A nivel histológico, la FPI cuenta con algunos sellos distintivos uno de ellos es la presencia de focos de fibroblastos. El aumento de estos focos está asociado con la progresión de la enfermedad y un peor pronóstico [6] Aunque inicialmente se pensaba que los focos eran eventos aislados en el tejido, resultado de la forma de evaluación del mismo, recientemente se ha propuesto que los focos de fibroblastos funcionan como un red continua, interconectada y compleja, dentro del pulmón, probablemente originada de la proliferación de fibroblastos policlonales [7].

Fibroblastos y Miofibroblastos

Los fibroblastos son las células cruciales para mantener la integridad del alveolo mediante la proliferación y reparación de las áreas dañadas. Estos pueden diferenciarse a células con una mayor contractilidad resultado de las fibras de alfa actina de músculo liso, presentes en su citoplasma, y una mayor capacidad de síntesis de moléculas de matriz, dichas células se conocen como miofibroblastos [8]. Se cree que la activación de fibroblastos y la diferenciación a miofibroblastos son una de las principales causas del desarrollo de fibrosis. Diversas moléculas se han estudiado como activadores de fibroblastos y miofibroblastos, sin embargo, la citocina profibrótica más ampliamente analizada es el factor de crecimiento transformante beta o TGF- β [9-11]

TGF- β

El TGF- β le da nombre a la superfamilia de factores de crecimiento y de diferenciación, con secuencias peptídicas similares que se unen a los mismos receptores y que tienen funciones biológicas relacionadas. La superfamilia del TGF-

β comprende adicionalmente, proteínas como las BMPs o proteínas morfogenéticas óseas, inhibinas, activinas y la hormona antimulleriana [12].

En mamíferos se han identificado tres isoformas TGF- β 1, -2 y -3, sin embargo, TGF- β 1 es la isoforma mas relacionada a el desarrollo de FPI [13].

El TGF- β 1 es una proteína de aproximadamente 25-kDa, producida por una gran variedad de tipos celulares en el pulmón cómo son los macrófagos, neutrófilos, células epiteliales alveolares activadas, células endoteliales, fibroblastos y miofibroblastos. Cuando el TGF- β 1 se encuentra activo, actúa como un factor pleiotrópico con propiedades quimiotácticas y proliferativas. TGF- β 1 induce el reclutamiento de macrófagos y fibroblastos, así como la proliferación de estos últimos a través de la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas [14].

El TGF- β 1 es secretado en su forma latente, el cual se activa a través de distintos mecanismos, los cuales pueden involucrar proteasas, pH, especies reactivas de oxígeno, sólo por mencionar algunos. Una vez activado, se une a los receptores tipo I y tipo II de TGF- β , lo cual induce la formación de tetrámeros formados por dos receptores de cada tipo. Esto a su vez permite que el receptor II pueda fosforilar una región rica en serinas en el receptor I y la posterior señalización a través de la vía de las Smads. La región recién fosforilada genera un sitio de anclaje para las Smads 2/3 o R-Smads que permite su fosforilación en el extremo carboxilo terminal, esto induce la disociación del recetor y permite la unión con la Smad 4 o Co-Smad y su posterior translocación a núcleo. [15]

Ya en el núcleo, las Smads pueden ejercer su actividad reguladora mediante la unión directa de su dominio MH1 en cooperación con distintas proteínas, algunas de ellas son factores de transcripción, lo que otorga especificidad a la respuesta transcripcional, mientras que otras más pueden ser proteínas reguladoras como coactivadores o correpresores, que también tendrán un efecto. La última de las Smads, la Smad 7, es un blanco transcripcional de las R-Smads y participan en un asa de retroalimentación negativa ya que se une a los receptores de TGF- β y puede inhibir la señalización al impedir la unión de las R-Smads o al promover la ubiquitinación y posterior degradación de los receptores de TGF- β . Cabe mencionar

que esta no es la única forma de retroalimentación negativa, también se han descrito vías en las que participan proteínas como SnoN/Ski o el receptor TMEPAI. [16, 17]

La regulación a través de las Smads es la vía principal por la cual el TGF- β 1 afecta la diferenciación celular, el ciclo celular y la apoptosis. Sin embargo, dicha señalización no se restringe a la participación de las Smads, hoy se sabe que la diversidad de respuestas a TGF- β 1 es determinado por la combinación entre la vía canónica, principal o de las Smads, con otras vías de señalización y por la habilidad de los receptores de TGF- β de activar otros módulos de señalización para reforzar y moderar las señales celulares rio abajo. En la vía no canónica, TGF- β 1 puede activar vías independientes a las Smads, como PI3K/AKT, vías de MAPK (ERK, JNK, y p38 MAPK) así como NF- κ B, Rho/Rac1, Cdc42, FAK, Src, Abl. [18]

Así mismo, el TGF- β 1 incrementa directamente la activación transcripcional de genes de colágena, en particular de la colágena 1A1, -A2, y -A3, colágena 5 y colágena 6. Además de promover un microambiente de depósito excesivo de moléculas de matriz extracelular [13, 19-21] .

En el contexto de la FPI se ha asociado al TGF- β 1 con la modificación en la expresión génica global [22, 23], y a los cambios en los fenotipos celulares, todos ellos probablemente asociados también con mecanismos epigenéticos [24, 25].

Epigenética

Las modificaciones epigenéticas son fundamentales durante diversos procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario y la reprogramación de los fenotipos celulares. Ante los estímulos medioambientales, dichas modificaciones se pueden alterar de manera aberrante y participar en procesos relacionados con el desarrollo de algunas enfermedades. La epigenética se define como cualquier modificación de la expresión génica que no es resultado de la alteración nucleotídica del genoma y pueden ser transmisibles a las células hijas. Existen tres modificaciones

epigenéticas principales, metilación del ADN, modificación postraduccional de histonas y ARNs no codificantes. [26]

La metilación del ADN es por mucho la modificación más ampliamente estudiada en mamíferos y se define como la adición de un grupo metilo en el carbono 5 de la citosina, principalmente en el contexto genético CpG y participa como un regulador maestro de la función y estructura de la cromatina. La presencia del dinucleótido CpG en el genoma humano es bajo, pero en los promotores se pueden encontrar extensiones con una densidad mucho mayor conocidos como "Islas CpG". Dichas estructuras tienen una longitud de aproximadamente 1000 pares de bases, un contenido mayor al 55% y una relación de CG de más de 0.6 [27].

El ADN en el núcleo se organiza principalmente en histonas, lo que permite en buena medida su compactación. Las modificaciones postraduccionales covalentes en el extremo amino-terminal de las histonas mediante la adición de grupos acetilo, metilo, fosfato, o ubiquitina, afectan significativamente dicha compactación y accesibilidad y por lo tanto la actividad transcripcional. La cromatina abierta o transcripcionalmente activa generalmente posee histonas hiperacetiladas e hipometiladas, mientras que la cromatina inactiva tiende a estar hipoacetilada e hipermetilada [28].

Algunas modificaciones pueden ser agregadas en forma sencilla, dobles o triples, como en el caso de la metilación de las lisinas. Algunas de estas marcas se han estudiado más profundamente, por ejemplo, la trimetilación de la histona 3 en la lisina 4 (H3K4me3), está generalmente asociada a sitios de inicio de la transcripción, mientras que la H3K36me3 está asociada al cuerpo de los genes que se transcriben. Por otra parte, H3K9me3 se asocia a con la región promotora de genes reprimidos, pero cuando se encuentra en el cuerpo del gen está asociada con expresión activa. Como ya se mencionó, estos cambios contribuyen con la función regulatoria de la expresión génica a través de un efecto sobre la estructura y accesibilidad de la

cromatina aunque también participan en la atracción o repulsión de proteínas que tienen la capacidad de leer, escribir, o borrar estas y otras marcas epigenéticas [29].

De manera más reciente y posterior a la secuenciación del ADN de organismos eucariontes, se descubrió que gran parte de dicha secuencia genómica correspondía a ARNs no codificantes y posteriormente se estudió su papel en la regulación génica. Aunque los ARNs no codificantes ya se conocían, solo incluían a los ARN de transferencia y a el ARN ribosomal, esta lista se expandió con nuevos ARNs no codificantes pequeños como los ARNs pequeños nucleolares, microARNs, ARNs de interferencia, entre otros. Algunas de estas moléculas pueden regular a su vez la modificación de la cromatina, metilación del ADN y silenciamiento transcripcional [30].

Metilación del ADN, regulación génica y paisajes de metilación.

Las islas CpG tienden a estar sin metilar en los genes constitutivos, mientras que en genes cuya expresión se encuentra restringida las citosinas se encuentran generalmente metiladas. Se ha descrito que la forma en la que estas citosinas participan en la regulación génica es por medio de proteínas que, dependiendo del estado de metilación, pueden unirse diferencialmente al DNA y modificar el estado de la cromatina. Aunque el estudio del papel regulatorio de la metilación se ha restringido primordialmente a las antes mencionadas islas, trabajos recientes con acceso a tecnologías de análisis global de metilación han añadido complejidad a este escenario por medio de conceptos como los de playa, plataforma, mar abierto, entre otros; generando todo un “paisaje de metilación”(Tabla 1) [31].

Las estructuras aledañas a las islas CpG se conocen como playas, estas se encuentran dentro de una distancia de 2 Kb en relación a las islas. Trabajos recientes han encontrado una asociación mayor de la ganancia/perdida de metilación en estas playas con la expresión génica en comparación a las islas. Delimitando a las playas y hasta 2 Kb se encuentran las plataformas, otras estructuras a las cuales también se ha descrito una asociación con la regulación

génica [32].

Islas CpG	Áreas ricas en CpG definidas como extensiones de ADN de > 0.5 kb con un contenido de G + C \geq 55%, y una frecuencia observada: esperada de al menos 0.6
Playas CpG	Regiones con menor densidad de CpG que se encuentran dentro de los 2 kb hacia arriba y hacia abajo de una isla de CpG
Plataformas CpG	Se definen como los 2 kb fuera de la playa
Cañones CpG	Regiones de baja metilación a más de 3.5 kb de distancia de islas y playas, que frecuentemente contienen factores de transcripción
Océano CpG	Regiones con baja metilación y no caracterizadas en ninguno de los anteriores
Desierto CpG	Regiones con muy pocos genes, si los hay, en una región de 500 kb.

Tabla 1. Conceptos que conforman el paisaje de metilación.

Además de la densidad del dinucleótidos CpG, la interpretación de la metilación puede modificarse debido a la región génica en la cual se encuentre. Aunque inicialmente se enfocó el estudio de la metilación a la región promotora, estudios globales de metilación han permitido que otras regiones, cómo el sitio de inicio de la transcripción y el cuerpo del gen, ganen importancia en la asociación entre metilación del ADN y expresión génica (Figura 1).

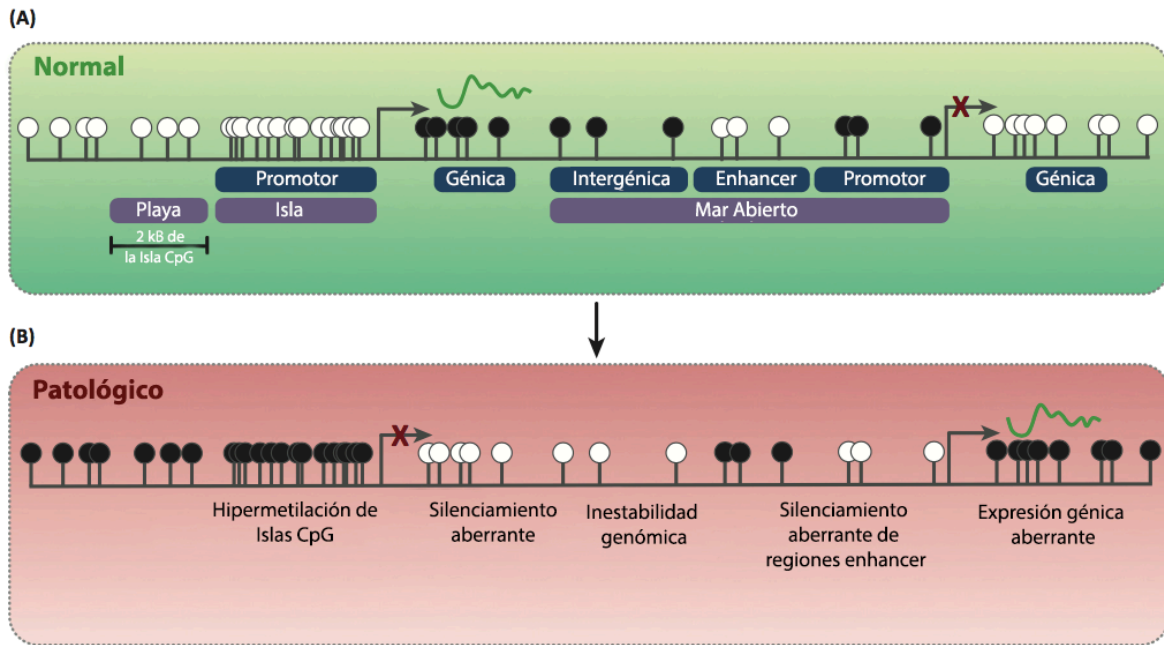


Fig. 1 Representación esquemática de la metilación del DNA y la regulación en el genoma. La metilación génica participa activamente en la regulación de la transcripción de los genes involucrados en el correcto desarrollo de los programas celulares, al mantener los promotores génicos sin metilar y las regiones intergénicas hipermetiladas, en el caso de los genes encendidos, y a la inversa en los genes que se requieren reprimidos (A). En el desarrollo de algunas patologías, esto sucede a la inversa y el resultado de la metilación aberrante ocasiona que los genes que deberían estar transcripcionalmente activos/reprimidos cambien, generando silenciamiento/activación aberrante además de inestabilidad genómica (B) Círculos blancos: CpG no metiladas, Círculos negros: CpG metiladas. Modificado de *Stirzaker et. al*, 2014.

En el trabajo de Brenet *et al.* se encontró que los cambios de metilación en el cuerpo del gen también podían afectar la expresión génica, pero en regiones con baja densidad de CpG, y que la metilación rioabajo del sitio de inicio de la transcripción, de manera particular en el primer exón posee una asociación más fuerte a represión génica que las regiones rio arriba del sitio de inicio de la transcripción, es decir en la región promotora. Los hallazgos generados en este estudio aunado a las nuevas metodologías globales, han permitido generar nuevo conocimiento del efecto de la metilación en la regulación génica [33].

Maquinaria de metilación: DNMTs y TETs

La metilación es mediada por las metiltransferasas de ADN o DNMTs, las cuales utilizan la S-adenosil-metionina como donador del grupo metilo. Es importante mencionar que la metilación se encuentra tanto en la hebra sentido como en la antisentido y en cada división, como resultado de la síntesis de nuevo material genético, el ADN termina hemimetilado. Para evitar que esto se traduzca en la pérdida pasiva de metilación la DNMT1 es la encargada de complementar la metilación de la cadena recién sintetizada, ya que tiene predilección por el ADN hemimetilado, lo cual le da la categoría de DNMT de mantenimiento. Las DNMT3a y 3b, en contraste, se les conoce como enzimas *de novo*. Se expresan principalmente durante el desarrollo embrionario y generan patrones de metilación independientemente de la replicación. Aunque esta división entre las DNMTs (*de novo* y de mantenimiento) parecía ser muy clara, experimentos en donde se suprime la expresión de las DNMTs *de novo* generó la pérdida de metilación durante la replicación, por lo cual se ha concluido que la cooperatividad entre las tres enzimas es necesaria para mantener los patrones adecuados de metilación. [34]

Hasta hace relativamente poco se creía que la metilación del ADN era una modificación estable e irreversible, y se aceptaba la pérdida de dicha modificación sucedía solo de forma pasiva durante la división celular y al no haber una enzima que removiera directamente el grupo metilo, se descartó el proceso activo de desmetilación. Sin embargo, a partir de estudios hechos en modelos murinos, en donde se observaba la rápida pérdida de metilación post fertilización, lo cual no podía ser explicado por desmetilación pasiva, sentó los precedentes para proponer y entender los mecanismos activos de remoción del grupo metilo de las citosinas. Años después de este descubrimiento, dos hallazgos más ayudaron a completar el panorama antes descrito, una nueva modificación de la citosina: la hidroximetilcitosina y enzimas capaces de oxidar la metilcitosina: TETs. [35]

La familia de enzimas TET, compuesta por tres miembros, son capaces de oxidar a la 5mC, y generar variantes como la 5- hidroximetilcitosina, 5- carboximetilcitosina y la 5- formilcitosina, siendo estas susceptibles a escisión por la Timina-ADN glicosilasa (TDG) y que seguido del proceso de escisión de base (BER) resulta en la pérdida de la metilación. [36]

Las DNMTs y las TET, regulan los niveles de metilación del ADN a través de un equilibrio dinámico de ganancia y pérdida de metilación específica para cada uno de los sitios permitiendo el correcto desarrollo de los programas celulares y cuya pérdida está asociada al inicio y desarrollo de patologías (Figura 2).

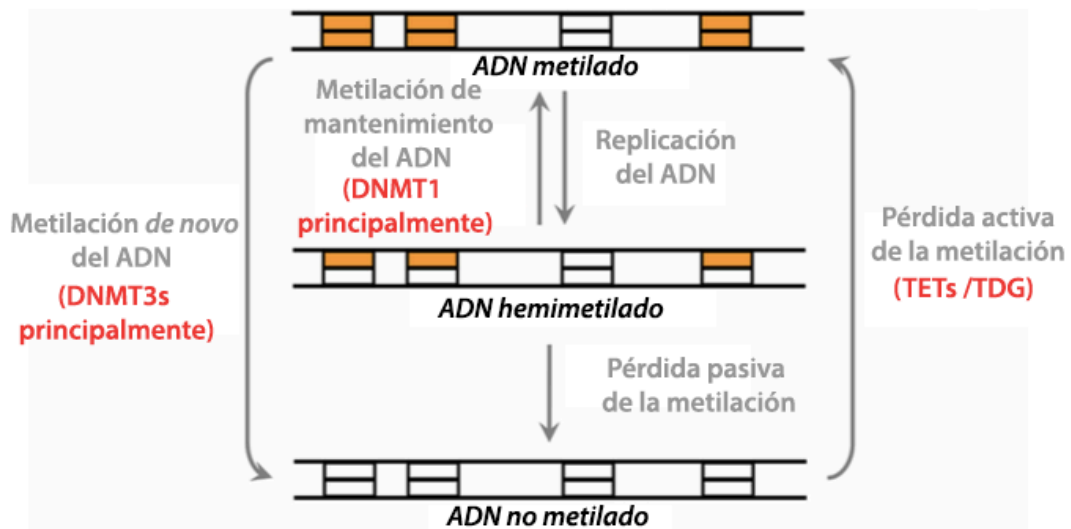


Fig.2 Representación esquemática de la ganancia y pérdida de metilación en vertebrados. Abreviaturas: DNMT: Metiltransferasa de ADN, TET: Tet metilcitosina dioxigenasa, TDG: timina ADN glicosilasa. Rectángulos amarillos: ADN metilado, rectángulos vacíos: ADN no metilado. Adaptado de Jeltsch et al. 2014

Metilación del DNA y FPI

Estudios anteriores han analizado las diferencias de metilación del ADN en la FPI y en pulmones humanos normales, pero los estudios sobre fibroblastos aislados y aquellos que evalúan principalmente el papel del TGF- β 1 son escasos [37, 38]. Un estudio dirigido considera el TGF- β 1 como un modulador de metilación del ADN; sin embargo, carece de análisis del panorama global de metilación[39].

En nuestro estudio, utilizamos la tecnología Illumina 450k para evaluar la metilación de 485,512 sitios CpG, en fibroblastos normales y derivados de FPI bajo estimulación de TGF- β 1 a corto (24h) y más largo plazo (5d). Además, examinamos

la metilación en relación con la ubicación del gen y la relación con los cambios en la expresión génica.

Objetivos

Objetivo General

Estudiar el efecto del TGF- β 1 en la metilación del DNA y su maquinaria de adición/remoción en fibroblastos pulmonares derivados de pacientes de FPI e individuos sanos.

Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de los estímulos a corto y largo plazo de TGF- β 1 en la expresión génica global.
2. Analizar el efecto del TGF- β 1 en la expresión de la maquinaria de metilación
3. Estudiar los cambios de metilación global asociados al estímulo de TGF- β 1 a corto y largo plazo
5. Estudiar los genes que cambian su expresión y metilación y la posible correlación entre estos cambios, posterior a los distintos estímulos de TGF- β 1

Material y Métodos

Cultivo celular

Los fibroblastos primarios de pulmón humano se obtuvieron de pulmones normales y con FPI dentro de protocolos aprobados por el comité de ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) donde los participantes dieron su consentimiento informado por escrito. Los fibroblastos de FPI se obtuvieron de cinco pacientes mediante biopsia pulmonar abierta para fines de diagnóstico. La FPI fue diagnosticada por medio de tomografía computarizada de alta resolución y de los patrones de neumonía intersticial usual. [40] Se excluyeron las enfermedades pulmonares intersticiales asociadas con trastornos del tejido conectivo o con exposiciones ambientales y ocupacionales. Ninguno de los pacientes había sido tratado con corticoesteroides o fármacos inmunosupresores en el momento de la biopsia. [41]

Los fibroblastos control se derivaron de pulmones de pacientes de la misma edad sometidos a lobectomía para extirpar un tumor pulmonar primario que no mostró evidencia histológica de enfermedad. Las células se obtuvieron por dispersión enzimática con tripsina (Sigma-Aldrich). Se incubaron durante 20 minutos con agitación continua, posteriormente se añadió 1% de suero fetal bovino para inhibir la actividad enzimática. También se trabajó con una línea celular normal de fibroblastos de pulmón humano (NHLF) obtenida de Lonza. Todos los cultivos primarios se cultivaron en medio Ham's F-12 (Gibco) con 10% de FBS (Gibco), mientras que los fibroblastos NHLF se crecieron en medio FGM (Lonza), todo a 37 ° C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO² hasta la confluencia temprana del paso 6 al 8. Luego, las células se trataron con TGF-β1 (10ng/ml), utilizando dos períodos de tiempo diferentes (24 horas o 5 días), todas ellas cultivadas en HAM's F-12 con bajo contenido en suero (0.1%). La dosis y los períodos de tiempo se determinaron en función de los resultados de estudios previos. [42]

Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico se realizó con el Kit de purificación de ADN y ARN MasterPure Complete (Epicentre) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN total se resuspendió en un volumen de 20 µl. La concentración y la calidad del ADN

se determinaron por espectrofotometría (ND-1000 UV / Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies USA).

Extracción de ARN y análisis qRT-PCR

El ARN total se extrajo de fibroblastos de pulmón humano con reactivo TRIzol (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se transcribió 1 µg de ARN en ADNc y se realizó una PCR en tiempo real utilizando el kit de síntesis de ADNc Verso (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Análisis de detección de expresión de genes de fibroblastos para la cadena alfa 1 de la colágena tipo I (COL1A1), cadena alfa 2 de la colágena tipo I (COL1A2), alfa actina de músculo liso (ACTA2), antígeno de superficie celular Thy-1 (THY1), fibronectina que contiene un dominio adicional A (FnEDA) y la hipoxantina guanina fosforribosil transferasa1 (HPRT1; como gen endógeno para la normalización) se realizaron con SYBR Green PCR Master Mix (BioRad) (Tabla2).

La expresión de ADN metiltransferasa 3 alfa (DNMT3a) y tet metilcitosina dioxigenasa 3 (TET3) se determinó mediante PCR en tiempo real utilizando ensayos de expresión génica TaqMan (Applied Biosystems) y la subunidad A de ARN polimerasa II (POLR2A) se usó como gen de mantenimiento para la normalización. Las reacciones de amplificación se realizaron en un LightCycler 480 (Roche) con Maxima Probe qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). El método de cuantificación relativa basado en el $2^{-\Delta CT}$ se utilizó para analizar los resultados de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

Gen	Dirección	Secuencia (5'- 3')
COL1A2	Forward	AAGGTCATGCTGGTCTTGCT
	Reverse	GACCCTGTTACCTTTTCCA
COL1A1	Forward	CATCGCTCTCCTGCTAACAGTC
	Reverse	TGGTATTCTCATGGCGGCAGTC
FnEDA	Forward	CTGGTTCAGACTGCAGTAACC
	Reverse	CAGGGAATAGCTCATGGATTCC
ACTA2	Forward	CCCATCTATGAGGGCTATGCCTTG
	Reverse	TCTCAGCTCAGCAGTAGTAACG
THY1	Forward	CATCGCTCTCCTGCTAACAGTC
	Reverse	TGGTATTCTCATGGCGGCAGTC

HPRT1	Forward	AAGGACCCACGAAGTGTTG
	Reverse	GGCTTTGTATTTTGCTTTTCCA

Tabla 2. Primers para PCR tiempo real

Expresión global de genes y ensayos de metilación del ADN

El ensayo de ARN global se realizó con el microarreglo de expresión génica humana Affymetrix GeneChip PrimeViewT. La matriz se procesó usando R 3.4.2,[43] usando Bioconductor 3.6 [44], con un paquete affy. La corrección de fondo y la normalización de datos se realizaron usando RMA. Se calcularon 49,495 sondas para su nivel de expresión. Se promediaron los niveles de expresión de tres réplicas técnicas de cada condición. Para obtener genes expresados diferencialmente, se utilizó el paquete Limma [45]. Las sondas con valor de p ajustado <0.01 y \log_2 veces el cambio > 2 y <-2 se consideraron expresadas diferencialmente y se mapearon al genoma usando la anotación Affymetrix.

Para el ensayo global de metilación del ADN, se usó el kit Infinium Human Methylation 450 BeadChip siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos se analizaron utilizando R 3.4.2 [43] ,utilizando Bioconductor 3.6 [44], siguiendo la tubería de Maksimovic [46]. Se determinó el estado de metilación de 485.512 loci [47]. Para todas las posiciones genómicas sondeadas, los valores p > 0.01 se filtraron (485,179 loci). Las sondas con SNPs en el sitio CpG o SBE se filtraron (456,352), seguido del filtrado de las sondas que han demostrado inespecificidad, dejando 429,792 sondas utilizadas para el análisis [48]. Para el análisis de expresión diferencial, los niveles de metilación de dos réplicas en cada condición se promediaron para considerar como un loci metilado diferencialmente (DML) y se seleccionaron de acuerdo con los resultados del paquete de limma (valor p $<0,00005$). Las sondas CpG se asociaron con genes RefSeq, regiones insulares y subclasificadas según la base de datos de anotaciones UCSC [49]. Para el análisis, las regiones genéticas se agruparon de la siguiente manera: Promotor (TSS1500 y TSS200), 5'UTR / 1er Exon, Cuerpo del gen y 3 'UTR. Se recogieron genes superpuestos de metilación y expresión.

Análisis de enriquecimiento

Para analizar la importancia biológica de los cambios en la expresión de microarreglos, se subieron genes significativos regulados hacia arriba y hacia abajo que pasaron el valor p ajustado <0.01 a la herramienta Enrichr para realizar análisis de enriquecimiento con procesos biológicos de ontología génica (GOBP).[50] Los términos de GO que pasaron el valor p ajustado <0.01 se ordenaron usando la puntuación combinada. Las categorías que compartían los mismos genes se descartaron para eliminar la representación excesiva del grupo. Los 10 principales términos GOBP fueron elegidos para los gráficos. Las listas detalladas de genes y GO / análisis se adjuntan por separado (Tabla S1).

Estadística

Los experimentos de tiempo real se llevaron a cabo por triplicado en dos ocasiones diferentes. Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar. Se aplicó t de student. Valor de $p < 0.05$ se consideró significativo. Los resultados se analizaron con GraphPad Prism 6.

Resultados

Respuesta de los fibroblastos al TGF- β 1

De un grupo de cuatro líneas celulares primarias examinadas de pulmones humanos normales y cinco de pulmones de FPI, elegimos uno de cada grupo para evaluar la expresión y metilación global de genes. Basamos nuestra selección en un cribado qRT-PCR de genes con respuesta bien conocida a TGF- β 1[22, 39, 51-53]. Ambas líneas celulares de fibroblastos seleccionadas mostraron una expresión significativamente aumentada de COL1A1, COL1A2, ACTA2, FnEDA y niveles disminuidos de THY1 después de 24 horas y 5 días de tratamiento con TGF- β 1. (Fig. 3) Ambas líneas habían disminuido significativamente la expresión de THY1 después de 24 horas y 5 días de tratamiento con TGF- β 1, aunque la línea de FPI

seleccionada tenía una expresión basal de THY1 más baja, como hemos demostrado previamente [54] [55] [56].

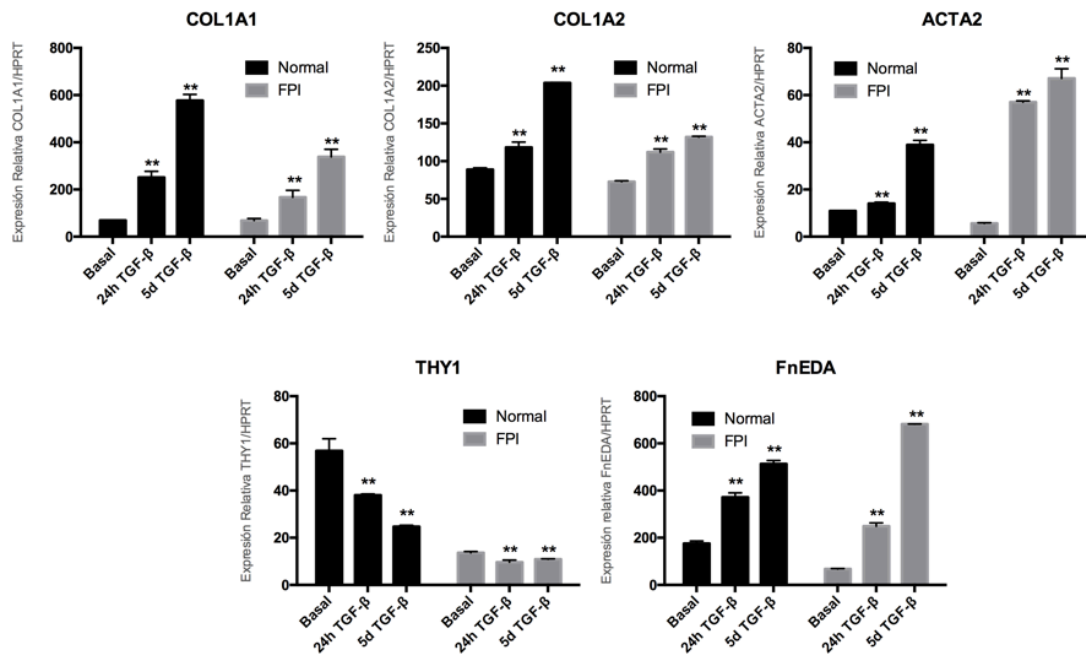


Fig. 3. Análisis de detección de qRT-PCR de líneas celulares de fibroblastos normales e FPI estimulados con TGF-β1. Las barras oscuras y grises representan fibroblastos normales y derivados de FPI, respectivamente respecto a su expresión de las cadenas de colágenos (COL1A1 y COL1A2), otras proteínas de la matriz extracelular, fibronectina EDA (FnEDA) y proteínas intra- o transmembranales: actina del músculo liso (ACTA2) y Thy-1 (THY1), respectivamente. Estos son el resultado de dos experimentos independientes por duplicado; ** p < 0.05

Cambios en la expresión génica inducida por TGF-β1

El análisis de expresión de microarreglos reveló que un mayor número de genes tenía cambios de expresión después de un corto plazo (24 horas), en comparación con el estímulo a largo plazo (5 días) de TGF-β1. Del mismo modo, el tratamiento a corto plazo indujo cambios mayores en los fibroblastos normales (25%) en

comparación con los fibroblastos de FPI. Como se muestra en la Figura 4A, una mayor proporción de genes se redujo tanto en las líneas celulares de FPI como en las normales, lo que incluso fue más evidente a los cinco días.

Para comparar si el efecto de los estímulos de TGF- β 1 era diferente en fibroblastos derivados de pulmones normales comparados con los de FPI, realizamos un análisis de enriquecimiento de ontología génica de procesos biológicos (GOBP) con los genes significativamente sobre- y desregulados en el arreglo. Los genes sobrerregulados con el tratamiento con TGF- β 1 a corto plazo revelaron enriquecimiento en categorías relacionadas con la señalización de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP) así como con la regulación de la proliferación celular en ambas líneas de fibroblastos. En contraste, los grupos enriquecidos para los genes regulados negativamente fueron diferentes. En la línea celular normal, los cambios se relacionaron con la señalización asociada con el fármaco antitumoral, la daunorrubicina, mientras que los cambios en los fibroblastos derivados de FPI se asociaron con procesos de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Figura 4B).

Por otro lado, los genes regulados al alza con el tratamiento a largo plazo con TGF- β 1 comprendían categorías asociadas con la producción de matriz extracelular en ambas líneas celulares; Además, la línea FPI mostró enriquecimiento para el enriquecimiento de la categoría de migración celular. Además, el grupo de genes con expresión disminuida en ambas líneas de fibroblastos se enriqueció para las categorías de proliferación celular (Figura 4C).

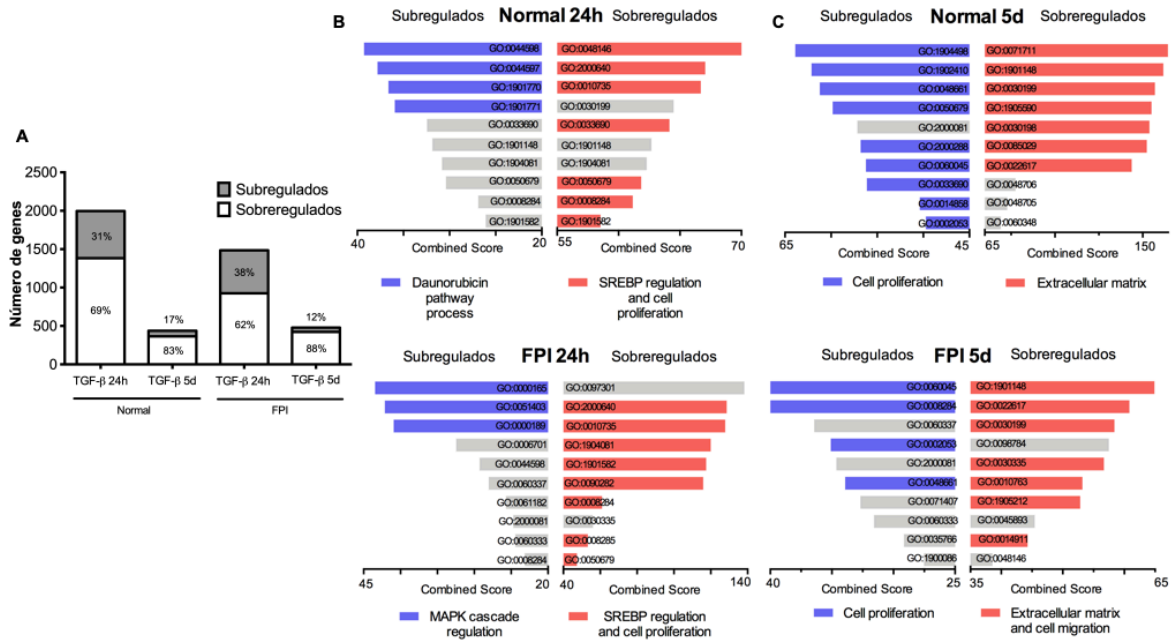


Fig. 4. TGF-β1 cambió la expresión génica predominantemente a las 24 horas y el enriquecimiento de la categoría GOBP difirió entre los tratamientos. El número de genes que cambia cambió su expresión después de 24 horas (24 h) o 5 días (5 días) de tratamiento con TGF-β1 en fibroblastos normales o derivados de FPI. El número dentro o sobre las barras blancas (regulados negativamente) o gris (regulados positivamente) representa el porcentaje de genes que presentan cambios de expresión (A). Los grupos de barras representan los diez términos principales de GOBP clasificados por puntaje combinado, asociados con el tratamiento a corto plazo (B) y a largo plazo (C). Cada gráfico agrupa GOs de genes sobreexpresados en la izquierda y genes subexpresados en la derecha. Los términos que pertenecen a categorías estrechamente relacionadas se resaltan en el mismo color (azul para genes con regulación negativa y rojo para genes con regulación positiva) y como se especifica en cada gráfico. Las barras grises representan categorías aisladas, los detalles de cada barra se especifican en Tabla S1.

Efecto de TGF-β1 sobre la maquinaria de metilación

El análisis de expresión de microarreglos mostró que la metilcitosina dioxigenasa 3 de Tet (TET3) estaba sobrerregulada tanto en líneas celulares de fibroblastos normales como de FPI. Para confirmar este hallazgo, se midió TET3 por PCR en tiempo real en dos líneas celulares FPI y dos normales, a uno y cinco días de

estímulo con TGF- β 1. Como se muestra en la Figura 5A, aunque no se observaron cambios en el día 1 de estímulo, a los 5 días TGF- β 1 indujo un aumento significativo de TET3. Recientemente, las proteínas de la familia TET se han descrito como parte del proceso de desmetilación de la citosina. Dado que la metilación se regula dinámicamente a través de la acción coordinada de las enzimas DNMT y TET, nos preguntamos si TGF- β 1 también modificó la expresión de DNMT. Examinamos DNMT1, DNMT3a y DNMT3b (ADN metiltransferasa 1, 3 alfa y 3 beta), y encontramos que DNMT3a se reguló significativamente después de 24 horas en fibroblastos FPI y después de 5 días de tratamiento en ambas líneas celulares (Figura 5B, $p < 0.05$)

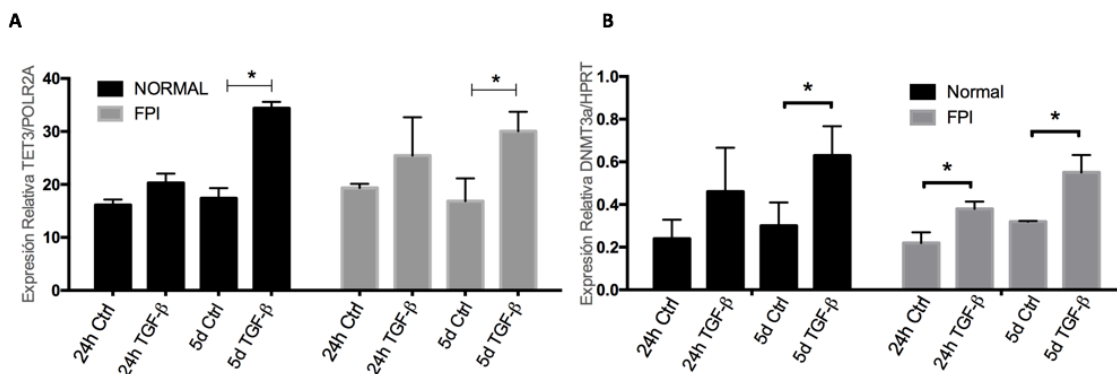


Figura 5. TGF- β 1 altera la expresión de la maquinaria de metilación / desmetilación. Las barras negras y grises representan fibroblastos normales e FPI, respectivamente. qRT-PCR de TET3 (A) y DNMT3a (B) después del tratamiento con TGF- β 1 a corto y largo plazo. (* $p < 0.05$) La figura muestra una línea celular representativa de cada grupo conformado por dos líneas celulares normales y dos líneas celulares de FPI. Todas las mediciones son el resultado de dos experimentos independientes por triplicado.

Efecto de TGF- β 1 sobre el metiloma

TGF- β 1 modificó la metilación del ADN de fibroblastos normales y de FPI después de 24 horas y 5 días de estímulo de TGF- β 1 (figura 6A). En ambas líneas celulares el efecto fue significativamente mayor a los cinco días. Otra característica notable fue la presencia de más cambios de metilación del ADN en los fibroblastos de FPI en comparación con la línea celular normal con un mayor número de cambios asociados a hipermetilación. (Figura 6A).

A pesar de que la metilación del ADN se ha estudiado principalmente en promotores de genes y en tramos de dinucleótidos CpG (conocidos como Islas), esta modificación puede ocurrir en cualquier parte del gen y más lejos de estos grupos. El impacto en la expresión génica depende en parte de la densidad de CpG y la localización génica donde se produce la metilación del ADN[57] [33. Cuando nos centramos en la distribución de estos cambios en relación con la distancia de la isla CpG, encontramos que en los fibroblastos normales la mayoría de los cambios de metilación inducidos por TGF- β 1 ocurrieron directamente en las islas (67-80%), mientras que en los fibroblastos de FPI, La isla y el mar abierto fueron los grupos mejor representados (entre 33-54% y 50-34%, respectivamente; Figura 6B).

Por otro lado, cuando los cambios de metilación se analizaron en relación con las regiones genéticas de la base de datos UCSC (22), la mayoría de los cambios en los fibroblastos normales se distribuyen de manera similar en tres categorías: Promotor, 5'UTR / 1stExon y Cuerpo (~ 30%), aunque los dos primeros parecen disminuir con el tratamiento sostenido con TGF- β 1. En la línea celular FPI, la característica más notable fue la representación excesiva de la categoría de: cuerpo del gen (~ 40%) y, a diferencia del caso de los fibroblastos normales, disminuyó con el tiempo de tratamiento. (Figura 6C)

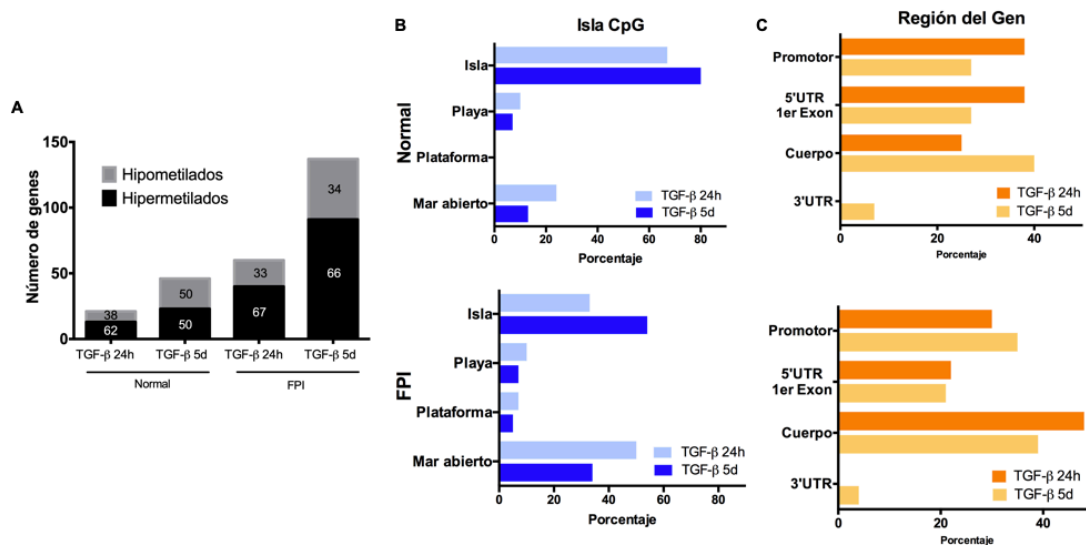


Fig. 6. Frecuencia, localización y densidad CpG de los cambios de metilación después del tratamiento con TGF- β 1. (A) El número de genes que cambiaron su estado de metilación en fibroblastos normales e FPI después de 24 horas (24h) o cinco días (5d) de tratamiento con TGF- β 1. Los números dentro de las barras representan el porcentaje de genes hipometilados (grises), hipermetilados (negros). (B) Porcentaje de genes que cambian su estado de metilación en relación con la distancia de la isla CpG (Isla, costa, plataforma y mar abierto) o de su ubicación respecto al gen (Promotor, 5'UTR / 1st Exon, Cuerpo y 3'UTR) a las 24 horas (azul claro, naranja) y a los cinco días (azul oscuro, amarillo) en fibroblastos normales (superior) e FPI (inferior).

Superposición entre los cambios de metilación del DNA y la expresión génica. Pocos genes exhibieron una superposición de metilación y cambios de expresión. A diferencia de otros estudios, no restringimos nuestro análisis a aquellos con una correlación inversa. En los fibroblastos de los pulmones humanos normales, un número limitado de genes cambió y prevaleció la hipermetilación. En el caso de los fibroblastos de FPI encontramos, bajo tratamiento extendido (5 días), el mayor número de genes con niveles de expresión alterados y las tasas más altas de hipometilación (Figura 7).

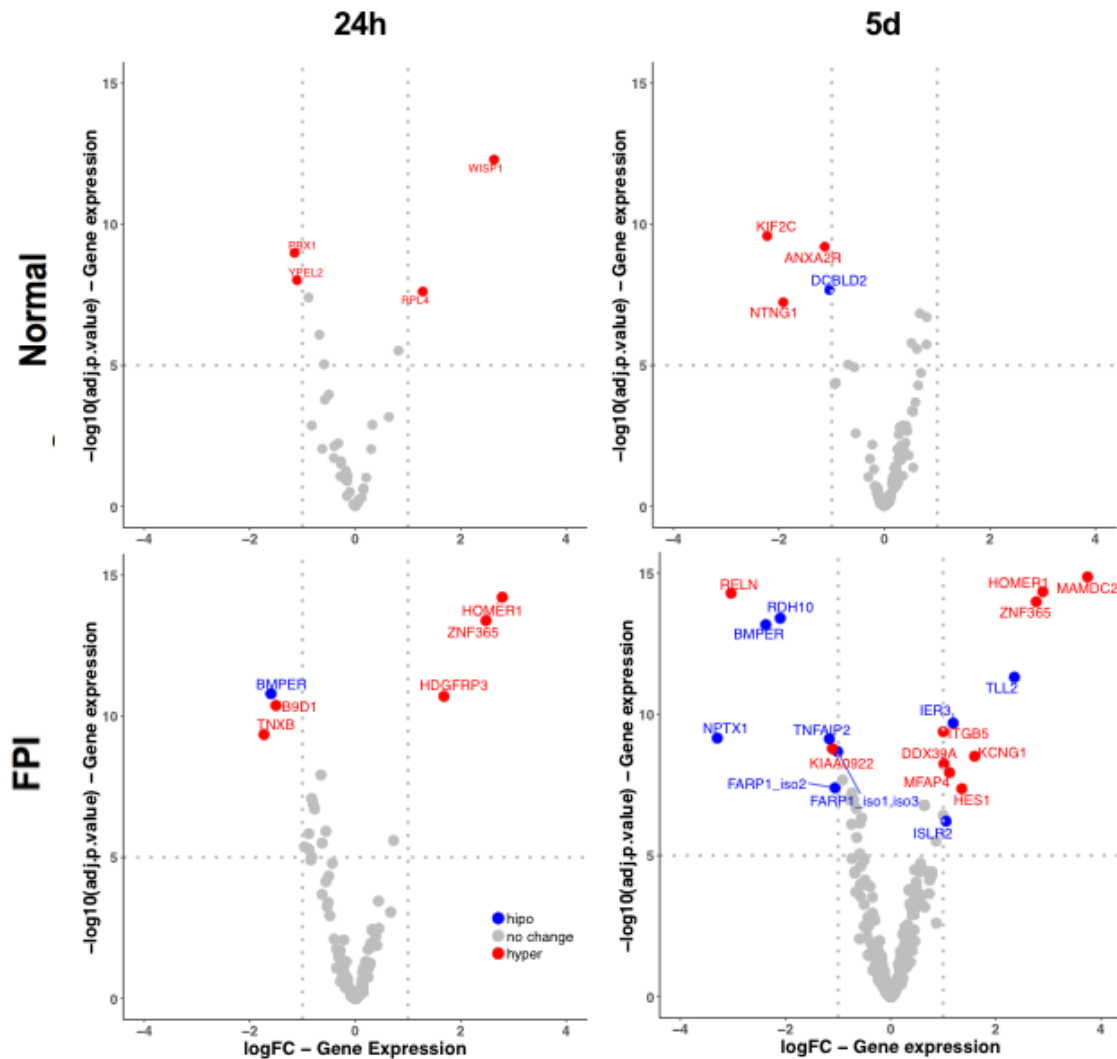


Fig. 7. Gráficos de volcanes de genes expresados diferencialmente y metilados después de estímulos de TGF-β1. Las líneas verticales indican el umbral para las veces de aumento (logFC) de -1 o 1 en comparación con los controles. La línea horizontal representa el umbral de un valor 5 -log10 P. Los puntos azul y rojo representan genes hipo e hipermetilados, los puntos grises representan genes sin cambios significativos. Algunos genes pueden duplicarse si más de una sonda está asociada con un gen regulado.

Los genes que comparten cambios en la metilación y la expresión génica después del tratamiento con TGF-β1 fueron muy limitados. En este contexto, analizamos

todos los grupos juntos para descubrir un posible patrón independientemente de una correlación positiva o inversa. Cuando la metilación se clasificó por región génica, no encontramos ninguna diferencia entre los grupos de genes expresados (Figura 8A), pero cuando nos enfocamos en la distancia de la isla CpG, encontramos que los genes regulados negativamente están asociados con la metilación que ocurre directamente en la isla CpG mientras Open Sea es la categoría mejor representada en los genes sobreexpresados, en comparación con las otras categorías y con los genes sobreexpresados. (Figura 8B)

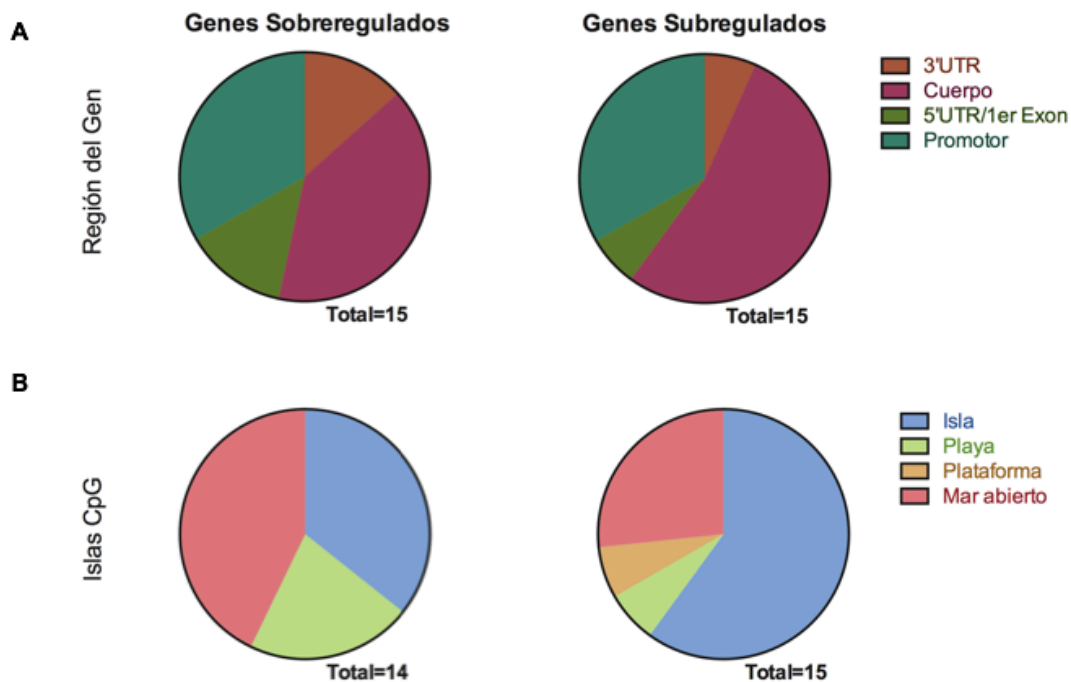


Fig. 8. La metilación del ADN cambia la localización génica o la densidad CpG de los genes que también cambiaron la expresión, después de los tratamientos con TGF- β 1. Los gráficos circulares representan todos los genes que cambian sus estados de metilación del ADN y la expresión génica (sobreexpresada y subexpresada, izquierda y derecha, respectivamente) después del tratamiento con TGF- β 1; la metilación está organizada por regiones genéticas UCSC (arriba) y en relación con la distancia desde las islas CpG (abajo).

Discusión

Durante la reparación después del daño tisular, los fibroblastos pulmonares deben expresar y silenciar de manera coordinada los genes involucrados en procesos como la migración, la proliferación, el depósito de la matriz extracelular, la diferenciación y la apoptosis, lo que permitirá la reparación correcta del insulto. Una interacción compleja de mecanismos epigenéticos coordina la ejecución correcta de esos programas, y el fracaso de esta regulación se ha asociado con factores como la edad y el medio ambiente [24]. La pérdida de esta coordinación, como ocurre en la FPI, conducirá a fenotipos patológicos asociados con la enfermedad[52, 58]. El TGF- β 1 es probablemente el mediador profibrótico más fuerte y juega un papel crítico en la activación de los fibroblastos, pero sus efectos sobre la metilación del ADN no están bien descritos. En el presente estudio, nos centramos en los efectos de la exposición a corto y largo plazo al TGF- β 1 sobre la expresión génica y los patrones de metilación del ADN, así como los cambios en los reguladores de la metilación del ADN, en la línea de fibroblastos de FPI y en los fibroblastos pulmonares normales. Descubrimos que un estímulo TGF- β 1 de 24 h genera cambios en la expresión génica relacionados con las vías reguladoras y los factores transcripcionales (MAPK, SREBP y las vías asociadas a la daunorrubicina), mientras que el estímulo a más largo plazo provocó cambios relacionados con el fenotipo fibrótico de los fibroblastos, descritos anteriormente en FPI, como el aumento de la migración y la secreción de moléculas de matriz y la disminución de la proliferación[55]. Además, encontramos que TGF- β 1 genera un mayor número de cambios en la expresión a las 24 horas, en contraste con los cambios en la metilación que ocurren principalmente a los cinco días. Curiosamente, los fibroblastos normales mostraron significativamente más cambios en la expresión génica, mientras que los fibroblastos de FPI experimentaron más modificaciones en el metiloma. Los cambios en la metilación podrían estar relacionados con el aumento de la expresión de DNMT3a que encontramos después de la estimulación con TGF- β 1. Curiosamente, en la fibrosis renal, se ha informado que la estimulación de TGF- β 1 a largo plazo indujo la metilación del ADN, pero se descubrió que DNMT1

estaba relacionado con este cambio.[42]

El uso de la plataforma Illumina 450k nos permitió determinar la localización exacta de los cambios de metilación con respecto a los genes y las islas CpG, lo que a su vez nos permitió descubrir que después del tratamiento con TGF- β 1, la mayoría de los cambios de metilación del ADN ocurrieron en el cuerpo del gen, confirmando hallazgos previamente reportados en pulmones fibróticos [56]. Además, cuando analizamos el grupo de genes que cambian la expresión, además de experimentar cambios en la metilación del ADN, nuevamente encontramos que estos cambios se encontraron principalmente en el cuerpo del gen, lo que respalda la idea de que, aunque los cambios en la expresión génica se han asociado principalmente con la metilación de la región promotora, el cuerpo genético juega un papel importante y su metilación está relacionada con la sobreexpresión génica, la regulación de las isoformas, la estabilidad de los nucleosomas y la eficiencia de la transcripción, como se encuentra en los estudios de metilación de todo el genoma [57]. Nuestros datos muestran que la mayoría de los cambios de metilación asociados con el TGF- β 1 ocurren en las islas y muy pocos en las regiones circundantes, como las costas y plataformas de CpG, lo que difiere de los hallazgos previamente informados en pulmones enteros [59] [60]. Nuestro estudio difiere de este último en que se utilizó una plataforma diferente, y las técnicas tienen diferentes sesgos intrínsecos (por ejemplo, los cambios se limitan a las regiones cercanas a los sitios de reconocimiento de enzimas en el método CHARM, mientras que la cobertura de la plataforma de metilación Infinium depende del diseño del ensayo) [61]. Sin embargo, nuestro estudio informa cambios significativos en la metilación del ADN en las islas CpG, principalmente en genes con expresión regulados negativamente; Se necesitará más investigación para descifrar la importancia biológica de estos cambios.

Como en otros estudios previos que utilizaron pulmones completos o fibroblastos aislados, no encontramos un patrón de correlación en la metilación global que explique todos los cambios en la expresión génica relacionados con TGF- β 1 [37, 38, 56]. En estudios de pulmón completo, se ha sugerido que la diversidad y el número variable de tipos de células en el pulmón pueden explicar la falta de

superposición. Sin embargo, incluso en un estudio previo con fibroblastos de pulmón, se informó una falta de correlación [62]. La heterogeneidad de los fibroblastos de pulmón, así como la existencia de otros mecanismos epigenéticos regulados por TGF- β 1, como la expresión alterada de la metiltransferasa de histonas (dominio SET y MYND que contiene 3: SMYD3) [63], que encontramos sobreexpresada en nuestro estudio, pueden contribuir a la falta de correlación.

Además, también encontramos sobreexpresión de TET3, un miembro de la familia TET responsable de la hidroximetilación y la posterior desmetilación en el ADN. La hidroximetilación no se puede distinguir de la metilación clásica con enfoques de bisulfito, y esta modificación no ha sido abordada metodológicamente por estudios globales de metilación en FPI [64].

La limitación más importante de nuestro estudio es el número de muestras utilizadas; sin embargo, nuestro enfoque en este estudio se centra más en los mecanismos de respuesta al TGF- β 1. La investigación futura debería incluir un mayor número de líneas celulares para evitar el sesgo interindividual, como estrategias metodológicas para estudiar la metilación del ADN en todo el genoma, incluido el análisis de la hidroximetilación.

Si bien, nuestro estudio se enfocó a los cambios asociados al estímulo de TGF- β 1, es cierto que se necesitan estudios posteriores para averiguar cuáles de estos cambios se deben directamente a la activación de las vías de TGF- β . Para esto se propone el uso de anticuerpos contra TGF- β así como el uso de inhibidores farmacológicos específicos para las distintas vías que puede activar dicha citocina, para distinguir efectos indirectos y ganar claridad con respecto a los mecanismos que pudieran estar participando en los eventos aquí descritos.

Continuando con las vías de TGF- β , aunque está aceptado que la gran mayoría de los tipos celulares expresan los receptores para TGF- β también existen algunos estudios en los que se ha abordado la expresión diferencial de los mismos [65] [66]. En nuestro trabajo no se estudió la expresión diferencial de los receptores para TGF- β y aunque no se poseen datos de la proteína, a través de los microarreglos

encontramos que la línea fibrótica expresa más del TGFBR1 de manera basal (Fig. S2) Si pensamos que esto se ve reflejado con los niveles de proteína, podría parecer un sesgo respecto a la respuesta de TGF- β 1 de cada una de las líneas. Sin embargo, los receptores de TGF- β funcionan como heterotetrámeros y también se necesitaría la sobreexpresión del receptor tipo II. Si bien, no descartamos que el efecto de la sobreexpresión de solo uno de los receptores de TGF- β 1 pudiera afectar la forma en que las células detectan dicha molécula, no existen estudios en fibroblastos al respecto.

Dos resultados interesantes y novedosos resultaron del análisis de ontología génica: la identificación de la modificación de vías relacionadas con SREBP y daunorrubicina. Esas moléculas han sido ampliamente estudiadas y relacionadas con la homeostasis de los lípidos y con la terapia antitumoral, respectivamente. El SREBP se ha estudiado en las respuestas a lesiones pulmonares en otros tipos de células, como las células alveolares Tipo II [67, 68], y se ha implicado en la fibrosis en otros órganos, como los riñones y el hígado [69, 70]. En este sentido, los resultados de un estudio realizado en fibrosis renal encontraron que la inhibición de SREBP puede disminuir la deposición de la matriz extracelular debido a la activación de fibroblastos [71]. La daunorrubicina se ha asociado en el desarrollo de la fibrosis miocárdica, pero esta es la primera vez que se ha relacionado con los fibroblastos pulmonares y la posible regulación de un fenotipo fibrótico [72]. Un estudio informó que la daunorrubicina podría prevenir la formación de fibrosis epineural al inhibir la proliferación de fibroblastos [73]. En conjunto, estos hallazgos podrían sugerir un posible papel para la orientación terapéutica de estas vías, sin embargo, se necesitan más estudios.

Conclusiones

- El TGF- β 1 genera cambios de expresión diferenciales, dependiendo de tiempo y el origen de la célula.

- Se encontraron vías enriquecidas a las 24 horas que no han sido exploradas previamente, como la vía de SREBP y la vía de Daunorubicina que además se encontró exclusivamente en la línea normal.
- Los cambios en expresión y metilación que se asocian a TGF- β 1 suceden de forma temporalmente distinta, los cambios de expresión suceden más rápido, mientras que los de metilación aparecen de manera tardía. Así mismo, en la línea normal los cambios de expresión son mayores, mientras que los de metilación son más notorios en la línea fibrótica.
- El estímulo de TGF- β 1 aumenta la expresión de DNMT3a y TET3 en los fibroblastos estudiados, las cuales participan en la adición y remoción de metilación del ADN, respectivamente.
- Los cambios de metilación en genes que también cambian su expresión post exposición a TGF- β 1 se asocian más a la densidad de CpGs que a la región génica a la que afectan.

Referencias

1. Grabowski SR, Tortora GJ. Principles of anatomy and physiology: Wiley; 2000.
2. Popper H. Normal Lung. Pathology of Lung Disease: Springer; 2017. p. 7-20.
3. Kalchier-Dekel O, Galvin JR, Burke AP, Atamas SP, Todd NW. Interstitial Lung Disease and Pulmonary Fibrosis: A Practical Approach for General Medicine Physicians with Focus on the Medical History. *J Clin Med*. 2018;7(12). Epub 2018/11/28. doi: 10.3390/jcm7120476. PubMed PMID: 30477216; PubMed Central PMCID: PMC6306719.
4. Mejía M, Buendía-Roldán I, Mateos-Toledo H, Estrada A, Espinoza-Hernández M, Juárez-Hernández F, et al. Primer Consenso Mexicano sobre Fibrosis Pulmonar Idiopática. *Neumología y cirugía de tórax*. 2016;75(1):32-51.
5. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(2 Pt 1):646-64. Epub 2000/02/15. doi: 10.1164/ajrccm.161.2.ats3-00. PubMed PMID: 10673212.
6. King TE, Jr., Schwarz MI, Brown K, Tooze JA, Colby TV, Waldron JA, Jr., et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(6):1025-32. Epub 2001/10/06. doi: 10.1164/ajrccm.164.6.2001056. PubMed PMID: 11587991.
7. Cool CD, Groshong SD, Rai PR, Henson PM, Stewart JS, Brown KK. Fibroblast foci are not discrete sites of lung injury or repair: the fibroblast reticulum. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(6):654-8. Epub 2006/06/27. doi: 10.1164/rccm.200602-205OC. PubMed PMID: 16799077; PubMed Central PMCID: PMC6306719.
8. Crestani B, Besnard V, Plantier L, Borensztajn K, Mailleux A. Fibroblasts: the missing link between fibrotic lung diseases of different etiologies? *Respir Res*. 2013;14:81. Epub 2013/08/07. doi: 10.1186/1465-9921-14-81. PubMed PMID: 23915374; PubMed Central PMCID: PMC3734215.
9. Agostini C, Gurrieri C. Chemokine/cytokine cocktail in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(4):357-63. doi: 10.1513/pats.200601-010TK. PubMed PMID: 16738201.
10. Datta A, Scotton CJ, Chambers RC. Novel therapeutic approaches for pulmonary fibrosis. *Br J Pharmacol*. 2011;163(1):141-72. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01247.x. PubMed PMID: 21265830; PubMed Central PMCID: PMC3085875.
11. Lasky JA, Brody AR. Interstitial fibrosis and growth factors. *Environ Health Perspect*. 2000;108 Suppl 4:751-62. Epub 2000/08/10. doi: 10.1289/ehp.00108s4751. PubMed PMID: 10931794; PubMed Central PMCID: PMC1637668.
12. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science*.

1986;233(4763):532-4. Epub 1986/08/01. doi: 10.1126/science.3487831. PubMed PMID: 3487831.

13. Fernandez IE, Eickelberg O. The impact of TGF-beta on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proc Am Thorac Soc.* 2012;9(3):111-6. Epub 2012/07/18. doi: 10.1513/pats.201203-023AW. PubMed PMID: 22802283.

14. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(5). Epub 2016/05/04. doi: 10.1101/cshperspect.a021873. PubMed PMID: 27141051; PubMed Central PMCID: PMC4852809.

15. Zhang W, Jiang Y, Wang Q, Ma X, Xiao Z, Zuo W, et al. Single-molecule imaging reveals transforming growth factor-beta-induced type II receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(37):15679-83. Epub 2009/09/02. doi: 10.1073/pnas.0908279106. PubMed PMID: 19720988; PubMed Central PMCID: PMC2747179.

16. Yan X, Xiong X, Chen YG. Feedback regulation of TGF-beta signaling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2018;50(1):37-50. Epub 2017/12/12. doi: 10.1093/abbs/gmx129. PubMed PMID: 29228156.

17. Deheuninck J, Luo K. Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling. *Cell Res.* 2009;19(1):47-57. Epub 2008/12/31. doi: 10.1038/cr.2008.324. PubMed PMID: 19114989; PubMed Central PMCID: PMC3103856.

18. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 2009;19(1):128-39. Epub 2008/12/31. doi: 10.1038/cr.2008.328. PubMed PMID: 19114990; PubMed Central PMCID: PMC2635127.

19. Eickelberg O, Kohler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, et al. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3. *Am J Physiol.* 1999;276(5 Pt 1):L814-24. PubMed PMID: 10330038.

20. Horowitz JC, Rogers DS, Sharma V, Vittal R, White ES, Cui Z, et al. Combinatorial activation of FAK and AKT by transforming growth factor-beta1 confers an anoikis-resistant phenotype to myofibroblasts. *Cell Signal.* 2007;19(4):761-71. doi: 10.1016/j.cellsig.2006.10.001. PubMed PMID: 17113264; PubMed Central PMCID: PMC1820832.

21. Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest.* 2007;132(4):1311-21. doi: 10.1378/chest.06-2568. PubMed PMID: 17934117.

22. Chambers RC, Leoni P, Kaminski N, Laurent GJ, Heller RA. Global expression profiling of fibroblast responses to transforming growth factor-beta1 reveals the induction of inhibitor of differentiation-1 and provides evidence of smooth muscle cell phenotypic switching. *Am J Pathol.* 2003;162(2):533-46. PubMed PMID: 12547711; PubMed Central PMCID: PMC1851161.

23. Renzoni EA, Abraham DJ, Howat S, Shi-Wen X, Sestini P, Bou-Gharios G, et al. Gene expression profiling reveals novel TGFbeta targets in adult lung fibroblasts. *Respir Res.* 2004;5:24. doi: 10.1186/1465-9921-5-24. PubMed PMID: 15571627; PubMed Central PMCID: PMC538264.

24. Hagood JS. Beyond the genome: epigenetic mechanisms in lung remodeling. *Physiology (Bethesda).* 2014;29(3):177-85. doi: 10.1152/physiol.00048.2013. PubMed PMID: 24789982; PubMed Central PMCID: PMC4046816.

25. Benayoun BA, Pollina EA, Brunet A. Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(10):593-610. doi: 10.1038/nrm4048. PubMed PMID: 26373265; PubMed Central PMCID: PMC4736728.
26. Tollefsbol T. *Handbook of epigenetics: the new molecular and medical genetics*: Academic Press; 2017.
27. Bird A, Tate P, Nan X, Campoy J, Meehan R, Cross S, et al. Studies of DNA methylation in animals. *J Cell Sci Suppl.* 1995;19:37-9. Epub 1995/01/01. doi: 10.1242/jcs.1995.supplement_19.5. PubMed PMID: 8655645.
28. Karlic R, Chung HR, Lasserre J, Vlahovicek K, Vingron M. Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(7):2926-31. Epub 2010/02/06. doi: 10.1073/pnas.0909344107. PubMed PMID: 20133639; PubMed Central PMCID: PMC2814872.
29. Black JC, Whetstine JR. Chromatin landscape: methylation beyond transcription. *Epigenetics.* 2011;6(1):9-15. Epub 2010/09/22. doi: 10.4161/epi.6.1.13331. PubMed PMID: 20855937; PubMed Central PMCID: PMC3052912.
30. Frias-Lasserre D, Villagra CA. The Importance of ncRNAs as Epigenetic Mechanisms in Phenotypic Variation and Organic Evolution. *Front Microbiol.* 2017;8:2483. Epub 2018/01/10. doi: 10.3389/fmicb.2017.02483. PubMed PMID: 29312192; PubMed Central PMCID: PMC5744636.
31. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet.* 2008;9(6):465-76. Epub 2008/05/09. doi: 10.1038/nrg2341. PubMed PMID: 18463664.
32. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet.* 2009;41(2):178-86. Epub 2009/01/20. doi: 10.1038/ng.298. PubMed PMID: 19151715; PubMed Central PMCID: PMC2729128.
33. Brenet F, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale AJ, Socci ND, et al. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS One.* 2011;6(1):e14524. Epub 2011/01/27. doi: 10.1371/journal.pone.0014524. PubMed PMID: 21267076; PubMed Central PMCID: PMC3022582.
34. Gowher H, Jeltsch A. Mammalian DNA methyltransferases: new discoveries and open questions. *Biochem Soc Trans.* 2018;46(5):1191-202. Epub 2018/08/30. doi: 10.1042/BST20170574. PubMed PMID: 30154093; PubMed Central PMCID: PMC6581191.
35. Jeltsch A, Jurkowska RZ. New concepts in DNA methylation. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(7):310-8. Epub 2014/06/21. doi: 10.1016/j.tibs.2014.05.002. PubMed PMID: 24947342.
36. Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet.* 2017;18(9):517-34. Epub 2017/05/31. doi: 10.1038/nrg.2017.33. PubMed PMID: 28555658.
37. Sanders YY, Ambalavanan N, Halloran B, Zhang X, Liu H, Crossman DK, et al. Altered DNA methylation profile in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(6):525-35. doi: 10.1164/rccm.201201-0077OC. PubMed PMID: 22700861; PubMed Central PMCID: PMC3480526.

38. Rabinovich EI, Kapetanaki MG, Steinfeld I, Gibson KF, Pandit KV, Yu G, et al. Global methylation patterns in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 2012;7(4):e33770. doi: 10.1371/journal.pone.0033770. PubMed PMID: 22506007; PubMed Central PMCID: PMC3323629.
39. Neveu WA, Mills ST, Staitieh BS, Sueblinvong V. TGF-beta1 epigenetically modifies Thy-1 expression in primary lung fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015;309(9):C616-26. doi: 10.1152/ajpcell.00086.2015. PubMed PMID: 26333597; PubMed Central PMCID: PMC34628935.
40. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(6):788-824. doi: 10.1164/rccm.2009-040GL. PubMed PMID: 21471066; PubMed Central PMCID: PMC3450933.
41. Raghu G, Rochwerg B, Zhang Y, Garcia CA, Azuma A, Behr J, 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*. 2015;192(2):e3-19. doi: 10.1164/rccm.201506-1063ST. PubMed PMID: 26177183.
42. Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Muller GA, Kalbacher H, Salant DJ, et al. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med*. 2010;16(5):544-50. Epub 2010/04/27. doi: 10.1038/nm.2135. PubMed PMID: 20418885; PubMed Central PMCID: PMC3106179.
43. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. 2014.
44. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods*. 2015;12(2):115-21. doi: 10.1038/nmeth.3252. PubMed PMID: 25633503; PubMed Central PMCID: PMC34509590.
45. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(7):e47. Epub 2015/01/22. doi: 10.1093/nar/gkv007. PubMed PMID: 25605792; PubMed Central PMCID: PMC34402510.
46. Maksimovic J, Phipson B, Oshlack A. A cross-package Bioconductor workflow for analysing methylation array data. *F1000Res*. 2016;5:1281. doi: 10.12688/f1000research.8839.3. PubMed PMID: 27347385; PubMed Central PMCID: PMC34916993.
47. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 2014;30(10):1363-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu049. PubMed PMID: 24478339; PubMed Central PMCID: PMC34016708.
48. Chen YA, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, et al. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. *Epigenetics*. 2013;8(2):203-9. doi: 10.4161/epi.23470. PubMed PMID: 23314698; PubMed Central PMCID: PMC33592906.

49. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 2011;98(4):288-95. doi: 10.1016/j.ygeno.2011.07.007. PubMed PMID: 21839163.
50. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W90-7. doi: 10.1093/nar/gkw377. PubMed PMID: 27141961; PubMed Central PMCID: PMC4987924.
51. Gimenez A, Duch P, Puig M, Gabasa M, Xaubet A, Alcaraz J. Dysregulated Collagen Homeostasis by Matrix Stiffening and TGF-beta1 in Fibroblasts from Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients: Role of FAK/Akt. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11). doi: 10.3390/ijms18112431. PubMed PMID: 29144435; PubMed Central PMCID: PMC5713399.
52. Oruçaj G, Karnati S, Vijayan V, Kotarkonda LK, Boateng E, Zhang W, et al. Compromised peroxisomes in idiopathic pulmonary fibrosis, a vicious cycle inducing a higher fibrotic response via TGF-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(16):E2048-57. Epub 2015/04/08. doi: 10.1073/pnas.1415111112. PubMed PMID: 25848047; PubMed Central PMCID: PMC4413321.
53. White ES, Sagana RL, Booth AJ, Yan M, Cornett AM, Bloomheart CA, et al. Control of fibroblast fibronectin expression and alternative splicing via the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Exp Cell Res*. 2010;316(16):2644-53. Epub 2010/07/10. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.06.028. PubMed PMID: 20615404; PubMed Central PMCID: PMC2924943.
54. Sanders YY, Pardo A, Selman M, Nuovo GJ, Tollefsbol TO, Siegal GP, et al. Thy-1 promoter hypermethylation: a novel epigenetic pathogenic mechanism in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;39(5):610-8. doi: 10.1165/rcmb.2007-0322OC. PubMed PMID: 18556592; PubMed Central PMCID: PMC2574530.
55. Ramirez G, Hagood JS, Sanders Y, Ramirez R, Becerril C, Segura L, et al. Absence of Thy-1 results in TGF-beta induced MMP-9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts. *Lab Invest*. 2011;91(8):1206-18. doi: 10.1038/labinvest.2011.80. PubMed PMID: 21577212.
56. Hagood JS, Prabhakaran P, Kumbala P, Salazar L, MacEwen MW, Barker TH, et al. Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am J Pathol*. 2005;167(2):365-79. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62982-3. PubMed PMID: 16049324; PubMed Central PMCID: PMC1603564.
57. Illingworth RS, Bird AP. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett*. 2009;583(11):1713-20. Epub 2009/04/21. doi: 10.1016/j.febslet.2009.04.012. PubMed PMID: 19376112.
58. King TE, Jr., Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2011;378(9807):1949-61. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60052-4. PubMed PMID: 21719092.
59. Alvarez D, Cardenas N, Sellares J, Bueno M, Corey C, Hanumanthu VS, et al. IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;313(6):L1164-L73. Epub 2017/09/02. doi: 10.1152/ajplung.00220.2017. PubMed PMID: 28860144; PubMed Central PMCID: PMC6148001.

60. Yang IV, Pedersen BS, Rabinovich E, Hennessy CE, Davidson EJ, Murphy E, et al. Relationship of DNA methylation and gene expression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(11):1263-72. Epub 2014/10/22. doi: 10.1164/rccm.201408-1452OC. PubMed PMID: 25333685; PubMed Central PMCID: PMC4315819.
61. Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queiros AC, Navarro A, Clot G, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2012;44(11):1236-42. Epub 2012/10/16. doi: 10.1038/ng.2443. PubMed PMID: 23064414.
62. Yang X, Han H, De Carvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell.* 2014;26(4):577-90. Epub 2014/09/30. doi: 10.1016/j.ccr.2014.07.028. PubMed PMID: 25263941; PubMed Central PMCID: PMC4224113.
63. Varley KE, Gertz J, Bowling KM, Parker SL, Reddy TE, Pauli-Behn F, et al. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res.* 2013;23(3):555-67. Epub 2013/01/18. doi: 10.1101/gr.147942.112. PubMed PMID: 23325432; PubMed Central PMCID: PMC3589544.
64. Yong WS, Hsu FM, Chen PY. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9:26. Epub 2016/07/01. doi: 10.1186/s13072-016-0075-3. PubMed PMID: 27358654; PubMed Central PMCID: PMC4926291.
65. Zhou B, Guo W, Sun C, Zhang B, Zheng F. Linc00462 promotes pancreatic cancer invasiveness through the miR-665/TGFBR1-TGFBR2/SMAD2/3 pathway. *Cell Death Dis.* 2018;9(6):706. Epub 2018/06/15. doi: 10.1038/s41419-018-0724-5. PubMed PMID: 29899418; PubMed Central PMCID: PMC5999603.
66. Kim W, Kim E, Lee S, Kim D, Chun J, Park KH, et al. TFAP2C-mediated upregulation of TGFBR1 promotes lung tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition. *Exp Mol Med.* 2016;48(11):e273. Epub 2016/11/26. doi: 10.1038/emm.2016.125. PubMed PMID: 27885255; PubMed Central PMCID: PMC5133372.
67. Huang SK, Scruggs AM, McEachin RC, White ES, Peters-Golden M. Lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis exhibit genome-wide differences in DNA methylation compared to fibroblasts from nonfibrotic lung. *PLoS One.* 2014;9(9):e107055. Epub 2014/09/13. doi: 10.1371/journal.pone.0107055. PubMed PMID: 25215577; PubMed Central PMCID: PMC4162578.
68. Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, et al. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol.* 2004;6(8):731-40. Epub 2004/07/06. doi: 10.1038/ncb1151. PubMed PMID: 15235609.
69. Zhang W, Niu M, Yan K, Zhai X, Zhou Q, Zhang L, et al. Stat3 pathway correlates with the roles of leptin in mouse liver fibrosis and sterol regulatory element binding protein-1c expression of rat hepatic stellate cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(3):736-44. Epub 2013/01/09. doi: 10.1016/j.biocel.2012.12.019. PubMed PMID: 23295202.
70. Wang TN, Chen X, Li R, Gao B, Mohammed-Ali Z, Lu C, et al. SREBP-1 Mediates Angiotensin II-Induced TGF-beta1 Upregulation and Glomerular Fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(8):1839-54. Epub 2014/11/16. doi:

10.1681/ASN.2013121332. PubMed PMID: 25398788; PubMed Central PMCID: PMC4520156.

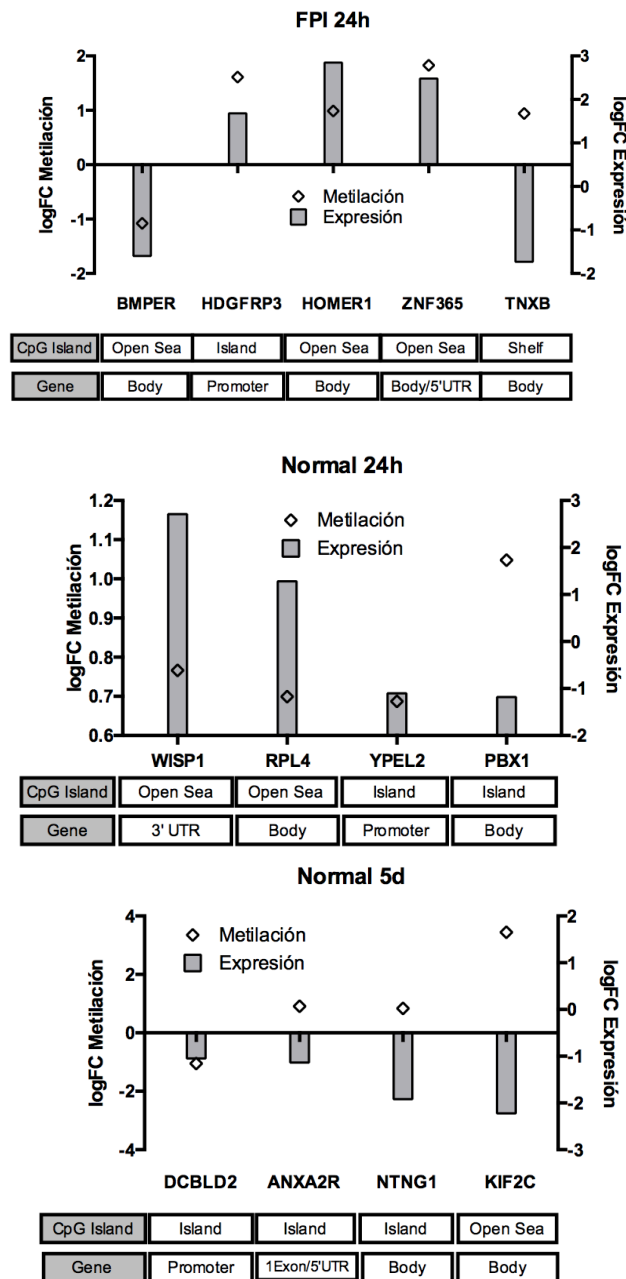
71. Mustafa M, Wang TN, Chen X, Gao B, Krepinsky JC. SREBP inhibition ameliorates renal injury after unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;311(3):F614-25. Epub 2016/07/08. doi: 10.1152/ajprenal.00140.2016. PubMed PMID: 27385736.

72. Wilcox RG, James PD, Toghiani PJ. Endomyocardial fibrosis associated with daunorubicin therapy. *Br Heart J*. 1976;38(8):860-3. Epub 1976/08/01. PubMed PMID: 1067858; PubMed Central PMCID: PMC483097.

73. Bays K, Mink D, Brim J, Moiger F, Brock J, Burks M, et al. Were patient voices heard in the technician certification debate in Georgia? *Nephrol News Issues*. 2002;16(4):20-1, 5. PubMed PMID: 11902058.

Anexos

Figura S1. Genes diferencialmente metilados y expresados. Las barras y los diamantes muestran los niveles de metilación y expresión de cada categoría. En la parte inferior de cada categoría se muestran los lugares génicos y la densidad de CpGs en donde se encontró alterada la metilación.



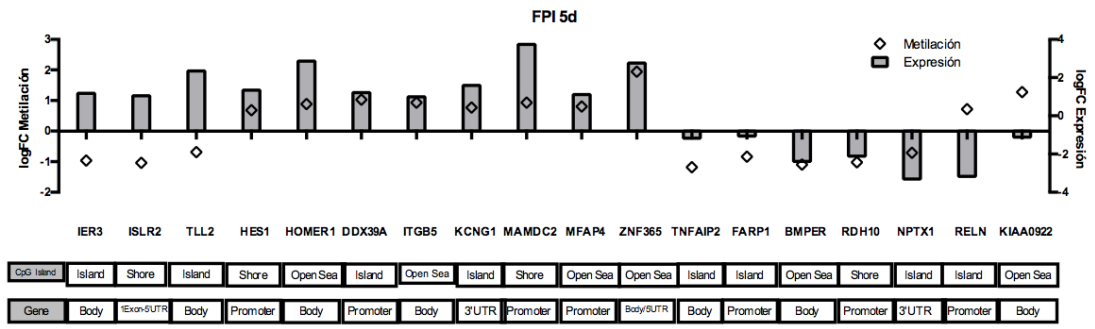


Figura S2.

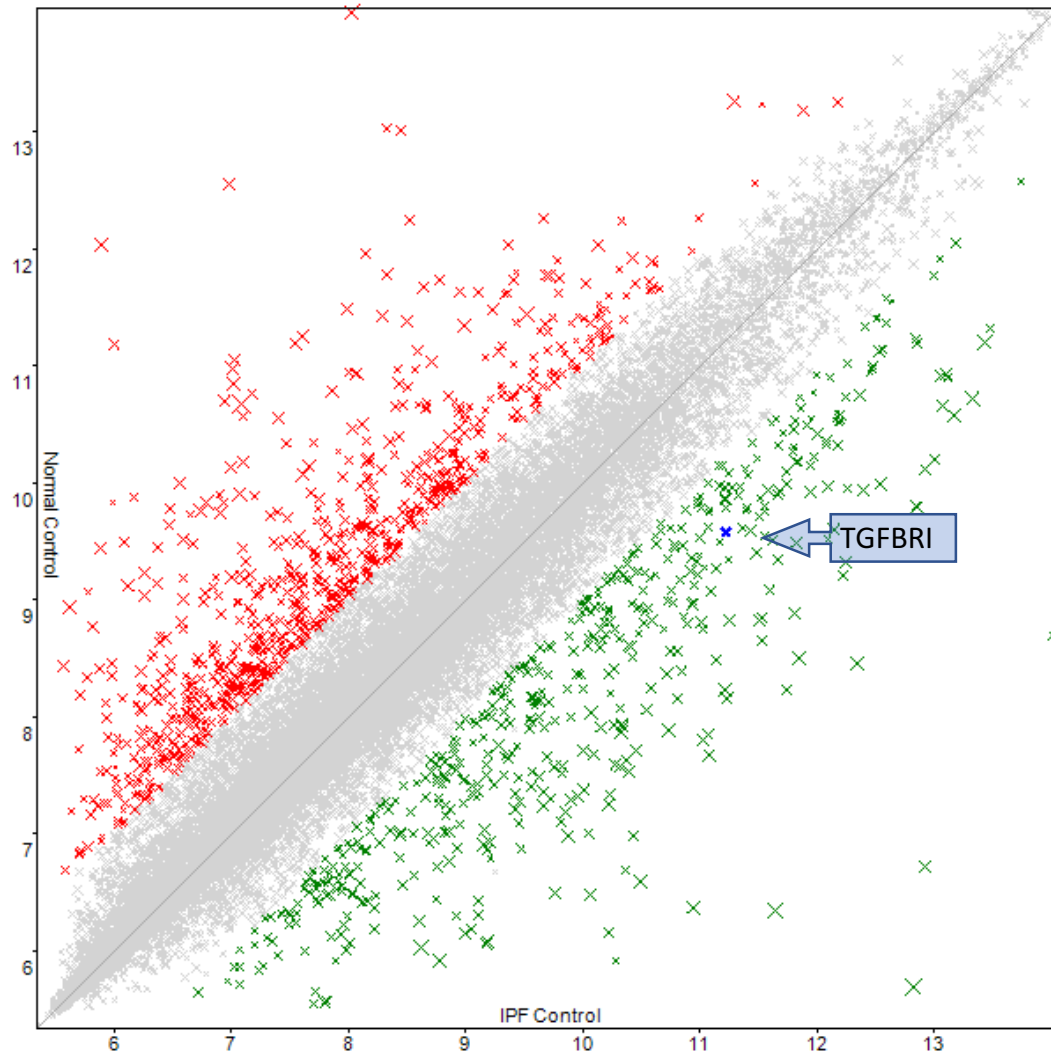


Tabla S1. Anotación de GO

Normal 24 hours					
	ID	Term	Overlap	P-value	Combined Score
Upregulated Genes	GO:0048146	positive regulation of fibroblast proliferation	16/345	2.76E-07	72.37
	GO:2000640	positive regulation of SREBP signaling pathway	20/725	2.71E-05	67.06
	GO:0010735	positive regulation of transcription via serum response element binding	20/721	2.51E-05	66.7
	GO:0030199	collagen fibril organization	13/154	3.56E-09	64.48
	GO:0033690	positive regulation of osteoblast proliferation	15/335	1.02E-06	64.14
	GO:1901148	gene expression involved in extracellular matrix organization	13/146	1.85E-09	62.67
	GO:1904081	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter involved in neuron differentiation	20/770	6.27E-05	62.28
	GO:0050679	positive regulation of epithelial cell proliferation	15/348	1.64E-06	61.84
	GO:0008284	positive regulation of cell proliferation	16/442	6.91E-06	61.16
	GO:1901582	positive regulation of telomeric RNA transcription from RNA pol II promoter	19/720	7.83E-05	58.53

Downregulated genes	GO:0044598	doxorubicin metabolic process	04/10	4.28E-06	39.27
	GO:0044597	daunorubicin metabolic process	04/10	4.28E-06	37.81
	GO:1901770	daunorubicin catabolic process	04/11	6.67E-06	36.62
	GO:1901771	daunorubicin biosynthetic process	04/08	1.46E-06	35.93
	GO:1904316	response to 2-O-acetyl-1-O-hexadecyl-sn-glycero-3-phosphocholine	03/08	9.60E-05	32.45
	GO:1905711	response to phosphatidylethanolamine	03/08	9.60E-05	31.85
	GO:0042346	positive regulation of NF-kappaB import into nucleus	9/170	2.48E-04	30.81
	GO:1904565	response to 1-oleoyl-sn-glycerol 3-phosphate	03/08	9.60E-05	30.39
	GO:0006701	progesterone biosynthetic process	01/04	1.33E-04	26.89
	GO:0008206	bile acid metabolic process	01/05	1.06E-04	26.08

Normal 5 days					
	ID	Term	Overlap	P-value	Combined Score
Upregulated Genes	GO:0071711	basement membrane organization	27/144	1.89E-23	164.4
	GO:1901148	gene expression involved in extracellular matrix organization	27/146	2.78E-23	161.75
	GO:0030199	collagen fibril organization	26/154	2.13E-21	156.93

GO:1905590	fibronectin fibril organization	26/144	3.54E-22	155
GO:0030198	extracellular matrix organization	26/143	2.94E-22	153.85
GO:0085029	extracellular matrix assembly	26/149	8.84E-22	152.28
GO:0022617	extracellular matrix disassembly	26/198	1.48E-18	143.76
GO:0048706	embryonic skeletal system development	16/112	1.86E-12	77.46
GO:0048705	skeletal system morphogenesis	15/110	1.85E-11	72.73
GO:0060348	bone development	15/118	5.18E-11	69.15

Downregulated genes	GO:1904498	protein localization to mitotic actomyosin contractile ring	09/30	1.14E-09	63.89
	GO:1902410	mitotic cytokinetic process	09/30	1.59E-09	62.12
	GO:0048661	positive regulation of smooth muscle cell proliferation	20/347	2.39E-06	61.22
	GO:0050679	positive regulation of epithelial cell proliferation	20/348	2.50E-06	59.83
	GO:2000081	positive regulation of canonical Wnt signaling pathway involved in controlling type B pancreatic cell proliferation	21/419	1.17E-05	57.15
	GO:2000288	positive regulation of myoblast proliferation	19/330	4.34E-06	56.8
	GO:0060045	positive regulation of cardiac muscle cell proliferation	19/334	5.17E-06	56.21
	GO:0033690	positive regulation of osteoblast proliferation	19/335	5.39E-06	56.12
	GO:0014858	positive regulation of skeletal muscle cell proliferation	18/327	1.43E-05	50.38
	GO:0002053	positive regulation of mesenchymal cell proliferation	18/329	1.55E-05	49.72

IPF 24 hours

	ID	Term	Overlap	P-value	Combined Score
Upregulated Genes	GO:0097301	Regulation of potassium ion concentration by positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	29/728	9.84E-10	138.2
	GO:2000640	Positive regulation of SREBP signaling pathway	28/725	3.89E-09	128.66
	GO:0010735	Positive regulation of transcription via serum response element binding	28/721	3.45E-09	127.84
	GO:1904081	Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter involved in neuron differentiation	28/770	1.43E-08	119.94
	GO:1901582	Positive regulation of telomeric RNA transcription from RNA pol II promoter	27/720	1.40E-08	117.23
	GO:0090282	Positive regulation of transcription involved in G2/M transition of mitotic cell cycle	27/721	1.45E-08	115.91
	GO:0008284	Positive regulation of cell proliferation	17/442	5.57E-06	60.97
	GO:0030335	Positive regulation of cell migration	13/193	1.60E-07	56.04
	GO:0008285	Negative regulation of cell proliferation	15/399	2.62E-05	53.32
	GO:0050679	Positive regulation of epithelial cell proliferation	14/348	2.33E-05	47.31

Downregulated genes	GO:0000165	MAPK cascade	10/232	1.62E-05	43.44
	GO:0051403	Stress-activated MAPK cascade	10/250	3.08E-05	42.13
	GO:0000189	MAPK import into nucleus	10/273	6.47E-05	40.92
	GO:0006701	Progesterone biosynthetic process	4/22	2.45E-05	32.44
	GO:0044598	Doxorubicin metabolic process	03/10	5.57E-05	29.28
	GO:0060337	Type I interferon signaling pathway	7/148	1.77E-04	28.02
	GO:0061182	Negative regulation of chondrocyte development	03/12	1.01E-04	25.71
	GO:2000081	Positive regulation of canonical Wnt signaling pathway involved in controlling type B pancreatic cell proliferation	9/419	6.19E-03	24.71
	GO:0060333	Interferon-gamma-mediated signaling pathway	7/204	1.21E-03	24.41
	GO:0008284	Positive regulation of cell proliferation	9/442	8.64E-03	23.16

IPF 5 days

	ID	Term	Overlap	P-value	Combined Score
Upregulated Genes	GO:1901148	Gene expression involved in extracellular matrix organization	12/146	9.05E-10	64.9
	GO:0022617	Extracellular matrix disassembly	12/198	2.86E-08	60.82
	GO:0030199	Collagen fibril organization	11/154	2.04E-08	58.39
	GO:0098784	Biofilm matrix organization	11/143	9.38E-09	57.46
	GO:0030335	Positive regulation of cell migration	11/193	2.06E-07	56.67
	GO:0010763	Positive regulation of fibroblast migration	10/152	1.98E-07	53.19
	GO:1905212	Positive regulation of fibroblast chemotaxis	10/149	1.65E-07	52.84
	GO:0045893	Positive regulation of transcription, DNA-templated	17/1004	1.24E-03	45.43
	GO:0014911	Positive regulation of smooth muscle cell migration	9/148	1.59E-06	44.29
	GO:0048146	Positive regulation of fibroblast proliferation	10/345	2.55E-04	38.57

Downregulated genes	GO:0060045	positive regulation of cardiac muscle cell proliferation	12/334	1.13E-04	42.19
	GO:0008284	positive regulation of cell proliferation	13/442	4.17E-04	40
	GO:0060337	type I interferon signaling pathway	9/148	1.51E-05	36.43
	GO:0002053	positive regulation of mesenchymal cell proliferation	11/329	4.02E-04	35.09
	GO:2000081	positive regulation of canonical Wnt signaling pathway involved in controlling type B pancreatic cell proliferation	12/419	8.73E-04	34.63

GO:0048661	positive regulation of smooth muscle cell proliferation	11/347	6.26E-04	33.92
GO:0071407	cellular response to organic cyclic compound	04/19	3.03E-05	32.69
GO:0060333	interferon-gamma-mediated signaling pathway	9/204	1.82E-04	31.58
GO:0035766	cell chemotaxis to fibroblast growth factor	06/63	3.41E-05	29.14
GO:1900086	positive regulation of peptidyl-tyrosine autophosphorylation	06/73	7.87E-05	27.52

RESEARCH ARTICLE

Transforming growth factor beta 1 induces methylation changes in lung fibroblasts

Miguel Negreros¹, James S. Hagood^{2,3}, Celia R. Espinoza², Yalbi I. Balderas-Martínez^{4,5}, Moisés Selman⁴, Annie Pardo^{1*}

1 Facultad de Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, **2** Department of Pediatrics, Division of Respiratory Medicine, University of California-San Diego, La Jolla, California, United States of America, **3** Department of Pediatrics, Pulmonology Division, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, United States of America, **4** Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico, **5** Cátedra CONACyT-INER, Mexico City, Mexico

* apardos@unam.mx



OPEN ACCESS

Citation: Negreros M, Hagood JS, Espinoza CR, Balderas-Martínez YI, Selman M, Pardo A (2019) Transforming growth factor beta 1 induces methylation changes in lung fibroblasts. PLoS ONE 14(10): e0223512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223512>

Editor: Yan-Ming Xu, Shantou University, CHINA

Received: June 8, 2019

Accepted: September 22, 2019

Published: October 11, 2019

Copyright: © 2019 Negreros et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files. The high-throughput data was submitted to the Gene Expression Omnibus database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), SuperSeries accession number: GSE135099 (Expression data: GSE135065, Methylation data: GSE135097).

Funding: This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Award number: 281074 (Recipient, Annie Pardo), National Institutes of Health, Award number: R01-

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis is a complex disease of unknown etiology. Environmental factors can affect disease susceptibility via epigenetic effects. Few studies explore global DNA methylation in lung fibroblasts, but none have focused on transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1) as a potential modifier of the DNA methylome. Here we analyzed changes in methylation and gene transcription in normal and IPF fibroblasts following TGF- β 1 treatment. We analyzed the effects of TGF- β 1 on primary fibroblasts derived from normal or IPF lungs treated for 24 hours and 5 days using the Illumina 450k Human Methylation array and the Prime View Human Gene Expression Array. TGF- β 1 induced an increased number of gene expression changes after short term treatment in normal fibroblasts, whereas greater methylation changes were observed following long term stimulation mainly in IPF fibroblasts. DNA methyltransferase 3 alpha (DNMT3a) and tet methylcytosine dioxygenase 3 (TET3) were upregulated after 5-days TGF- β 1 treatment in both cell types, whereas DNMT3a was upregulated after 24h only in IPF fibroblasts. Our findings demonstrate that TGF- β 1 induced the upregulation of DNMT3a and TET3 expression and profound changes in the DNA methylation pattern of fibroblasts, mainly in those derived from IPF lungs.

Introduction

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is an irreversible, chronic, progressive and lethal disease of unknown etiology, characterized by excessive extracellular matrix (ECM) deposition [1]. ECM is secreted mainly by activated fibroblasts under certain stimuli [2].

Several molecules/cytokines have been previously described as key effectors of the fibrotic response. Among them, transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) is considered one of the most potent mediators of tissue remodeling and fibrosis [3, 4]. TGF- β 1 promotes fibroblast proliferation, and their differentiation to myofibroblasts, highly synthetic cells producing multiple ECM components (mainly collagens) with increased contractility and apoptosis resistance [5–8]. This phenotypic change is the result of the strong effect of TGF- β 1 on global gene

HL111169 (Recipient, James S. Hagood), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Award number: LaNSBioDiT 28037 (Recipient, Not Applicable). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

expression [9, 10], likely associated with epigenetic mechanisms [11]. Additionally, recent studies have linked alterations in DNA methylation, one of the best understood epigenetic processes, with aging, a driver of IPF [12].

Some prior studies have analyzed DNA methylation differences in IPF and normal human lungs, but studies on isolated fibroblasts and those evaluating primarily the role of TGF- β 1 are scanty [13, 14]. One targeted study considers TGF- β 1 as a DNA methylation modulator; however, it lacks analysis of the global methylation landscape [15].

In our study, we used Illumina 450k technology to evaluate methylation of 485,512 CpG sites, in normal and IPF derived fibroblasts under short (24h) and longer-term (5d) TGF- β 1 stimulation. In addition, we examined the methylation relative to gene location and the relationship to changes in gene expression.

Materials and methods

Cell culture

Primary human lung fibroblasts were obtained from normal and IPF lungs under protocols approved by the ethics committee of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), and the participants gave written informed consent. IPF fibroblasts were obtained from five patients by open lung biopsy usually performed 1 week after hospital admission for diagnosis purposes. IPF was diagnosed as described elsewhere, including the characteristic high-resolution computed tomography imaging and morphology of usual interstitial pneumonia [16]. Interstitial lung diseases associated with connective tissue disorders or with environmental and occupational exposures were excluded.

Patients (three male and two female; four former smokers and one nonsmoker) aged 63 ± 5 yr (mean \pm standard deviation [SD]) were inpatients at INER, Mexico City. All of them had progressive dyspnea, restrictive pulmonary function tests (forced vital capacity: $67 \pm 3\%$), reduced diffusion lung capacity of carbon monoxide (DLCO: $59.2 \pm 3.5\%$), and hypoxemia at rest ($91 \pm 1.5\%$) worsening with exercise ($81 \pm 3.5\%$). None of the patients had been treated with corticosteroids or immunosuppressive drugs at the time of biopsy. [17]

Control fibroblasts ($n = 4$; three male and one female; three smokers and one non-smoker) were derived from lungs of age-matched patients undergoing lobectomy/pneumectomy for removal of a primary lung tumor which showed no histologic evidence of disease. Cells were obtained by enzymatic dispersion with trypsin (Sigma-Aldrich). Additionally, a normal human lung fibroblast (NHLF) cell line was obtained from Lonza. All primary cultures were grown in Ham's F-12 medium (Gibco) with 10% FBS (Gibco), while NHLF were grown in Lonza FGM, at 37°C in an atmosphere of 95% air and 5% CO_2 until early confluence from passage 6 to 8. Then, cells were treated with TGF- β 1 (10 ng/ml), using two different time periods (24 hours or 5 days) all of them cultured in Ham's F-12 with low serum (0.1%). The dosage and time periods were determined based on the results of previous studies [18].

DNA extraction

Genomic DNA extraction was performed with MasterPure Complete DNA and RNA purification Kit (Epicentre) following the manufacturer's instructions. Total DNA was resuspended in a volume of 20 μl . DNA concentration and quality were determined by spectrophotometry (ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies USA).

RNA extraction and qRT-PCR analysis

Total RNA was extracted from human lung fibroblasts with TRIzol reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. 1 µg of RNA was reverse transcribed into cDNA, and real-time PCR was performed using Verso cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions.

Fibroblast gene expression screening analysis for collagen type I alpha 1 chain (COL1A1), collagen type I alpha 2 chain (COL1A2), actin alpha 2 smooth muscle (ACTA2), Thy-1 cell surface antigen (THY1), fibronectin containing extra domain A (FnEDA), and hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1; as housekeeping gene for normalization) were performed with SYBR Green PCR Master Mix (BioRad) (S1 Table).

DNA methyltransferase 3 alpha (DNMT3a) and tet methylcytosine dioxygenase 3 (TET3) expression were determined by real-time PCR using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) and RNA polymerase II subunit A (POLR2A) was used as housekeeping gene for normalization. The amplification reactions were done in a LightCycler 480 (Roche) with Maxima Probe qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). The relative quantitation method based on the $2^{-\Delta\text{CT}}$ was used to analyze the results of two independent experiments made in triplicate.

Global gene expression and DNA methylation assays

Global RNA assay was performed with Affymetrix GeneChip PrimeViewT Human Gene Expression Array. The array was processed using R 3.4.2 [19], using Bioconductor 3.6 [20], with affy package. Background correction and data normalization were performed using RMA. 49,495 probes were calculated for their expression level. Expression levels of three technical replicates of each condition were averaged. To obtain differentially expressed genes, Limma package was used [21]. Probes with adjusted p -value < 0.01 and \log_2 fold change > 2 and < -2 were considered as differentially expressed and were mapped to the genome using Affymetrix annotation.

For the DNA methylation global assay, Infinium Human Methylation 450 BeadChip kit was used as per manufacturer instructions. Data were analyzed using R 3.4.2 [19], using Bioconductor 3.6 [20], following the pipeline of Maksimovic [22]. Methylation status of 485,512 loci was determined [23]. For all probed genomic positions, detection p -values > 0.01 were filtered out (485,179 loci). Probes with SNPs at CpG or SBE site were filtered (456,352), followed by filtering of probes that have shown to be cross-reactive, leaving 429,792 probes used for analysis [24]. For differential expression analysis, the methylation levels of two replicates under each condition were averaged to consider a region as a differentially methylated locus (DML) and selected according to limma package results (p -value < 0.00005). CpG probes were associated with RefSeq genes, island regions and subclassified according to the UCSC annotation database [25]. For the analysis, gene regions were grouped as follows: Promoter (TSS1500 and TSS200), 5'UTR/1st Exon, Body and 3' UTR. Overlapped genes from methylation and expression were collected.

The high-throughput data was submitted to the Gene Expression Omnibus database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), SuperSerie accession number: GSE135099 (Expression data: GSE135065, Methylation data: GSE135097).

Enrichment analysis

To analyze the biological significance of microarray expression changes, significant up- and down-regulated genes that passed adjusted p -value < 0.01 were uploaded to Enrichr tool to perform enrichment analysis with gene ontology biological processes (GOBP) [26].

GO terms that passed adjusted p -value <0.01 were ordered using combined score. Categories that shared the same genes were discarded to eliminate group overrepresentation. The top 10 GOBP terms were chosen for graphs. The detailed gene lists and GO/ analysis are attached separately (S2 Table).

Results

Fibroblasts' response to TGF- β 1

From a group of four primary cell lines examined from normal human lungs and five from IPF lungs, we chose one of each group to evaluate the global gene expression and methylation. We based our selection on a qRT-PCR screening of genes with well-known response to TGF- β 1 [9, 15, 27–29]. Both selected fibroblast cell lines showed significantly increased expression of COL1A1, COL1A2, ACTA2, FnEDA after 24-hours and 5-days of TGF- β 1 treatment. A significantly decreased expression of THY1 after 24 hours and 5 days of TGF- β 1 treatment was observed, although the IPF line selected had lower basal THY1 expression, as we have demonstrated previously [30–32]. (Fig 1)

Interestingly, after 5 days of TGF- β 1 treatment IPF fibroblasts showed a higher expression of ACTA2, and FnEDA and a lower increase of COL1A1 and A2 compared with the normal ones.

TGF- β 1-induced gene expression changes

Microarray expression analysis revealed that a higher number of genes had expression changes after short-term (24 hours), compared with long-term (5 days) TGF- β 1 stimulus. Likewise, short-term treatment induced greater changes in normal fibroblasts (25%) than in IPF fibroblasts (S3–S6 Tables). As shown in Fig 2A, in both IPF and normal cell lines a greater proportion of genes were downregulated, which even was more evident at 5 five days.

In order to compare if the effect of the TGF- β 1 stimuli was similar or different in fibroblasts derived from normal or IPF lungs, we performed a Gene Ontology enrichment analysis of

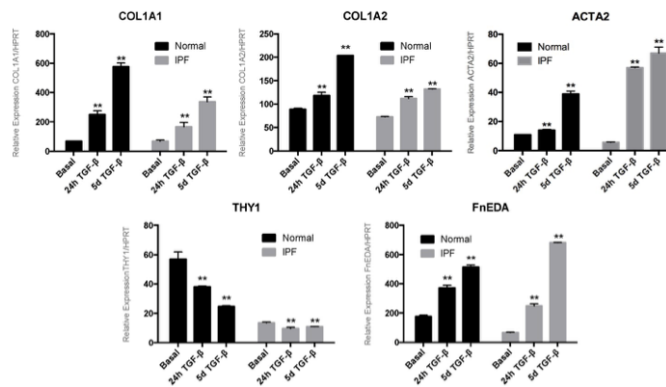


Fig 1. qRT-PCR screening analysis of normal and IPF fibroblast cell lines after TGF- β 1 stimuli. Dark bars represent normal fibroblast and grey bars their IPF counterpart gene expression of collagens (COL1A1 and COL1A2), EDA fibronectin (FnEDA) α -smooth muscle actin (ACTA2) and Thy-1 (THY1), respectively. These are the result of two independent experiments; ** p <0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223512.g001>

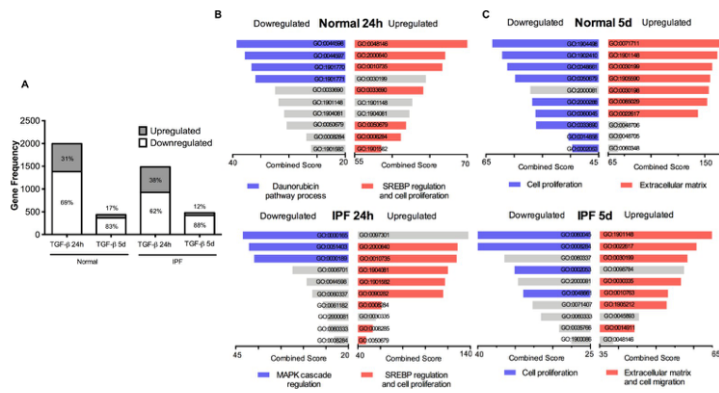


Fig 2. TGF-β1 changed gene expression predominantly at 24 hours and GOBP category enrichment differed between treatments. Number of genes that changed expression after 24 hours (24h) or 5 days (5d) of TGF-β1 treatment in normal or IPF derived fibroblasts. The number inside or over the white (downregulation) or gray (upregulation) bars represent the percentage of genes that present expression changes (A). Groups of bars represent the top ten GOBP terms ranked by combined score, associated with short-term (B) and long-term (C) treatment. Each graph groups GOs of downregulated genes in the left and upregulated genes on the right. Terms belonging to closely related categories are highlighted in the same color (blue for downregulated and red for upregulated genes) as specified in each graph. Grey bars represent ungrouped categories, each bar details are specified in (S2 Table).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223512.g002>

Biological Processes (GOBP) with the significantly up- and down-modulated genes of the Array. Genes upregulated with short-term TGF-β1 treatment revealed enrichment in categories related to sterol regulatory element-binding protein (SREBP) signaling and regulation of cell proliferation in both fibroblast lines. In contrast, the enriched groups for the downregulated genes were different. In the normal cell line, changes were related to signaling associated with the anti-tumor drug, daunorubicin, while the changes in the IPF derived fibroblasts were associated with Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) processes (Fig 2B).

On the other hand, the upregulated genes with long-term TGF-β1 treatment comprised categories associated with extracellular matrix production in both cell lines; additionally, the IPF line showed enrichment for the cell migration category. Also, the down-modulated group of genes in both fibroblast lines were enriched for cell proliferation categories (Fig 2C).

Effect of TGF-β1 on the methylation machinery

Microarray expression analysis showed that Tet methylcytosine dioxygenase 3 (TET3) was upregulated in both normal and IPF fibroblast cell lines. To confirm this finding, TET3 was measured by real-time PCR in two IPF and two normal cell lines, at 1 and five days of stimulus with TGF-β1. As shown in Fig 3A, while no changes were observed at 1 day, at 5 days TGF-β1 induced a significant increase of TET3. Recently, TET family proteins have been described as part of the cytosine demethylation process. Since methylation is dynamically regulated through the coordinated action of the DNMTs and TET enzymes, we wondered whether the expression of DNMTs was also modified by TGF-β1. We examined DNMT1, DNMT3a and DNMT3b (DNA methyltransferase 1, 3 alpha and 3 beta), and we found that DNMT3a was significantly upregulated after 24 hours in IPF fibroblast and after 5-day treatment in both cell lines (Fig 3B, $p < 0.05$).

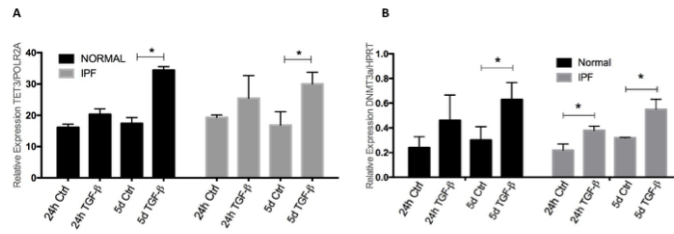


Fig 3. TGF-β1 alters the expression of the methylation/demethylation machinery. Black and Gray bars represent normal and IPF fibroblasts, respectively. qRT-PCR of TET3 (A) and DNMT3a (B) after short and long term TGF-β treatment. (**p*<0.05) The figure shows one representative cell line of each group from two normal and two IPF cell lines tested. All measurements are result of two independent triplicate experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223512.g003>

Effect of TGF-β1 on the methylome

TGF-β1 modified DNA methylation of normal and IPF fibroblasts after 24 hours and 5 days of TGF-β1 stimulus (Fig 4A). In both cell lines the effect was significantly higher at 5 days. Another remarkable feature was the presence of more gene methylation changes in the IPF fibroblasts in comparison with the normal cell line with the majority of the changes representing hypermethylation. (S7–S10 Tables, Fig 4A).

Despite DNA methylation having been studied mostly in gene promoters and in stretches of CpG dinucleotides (known as Islands), this modification can occur anywhere in the gene and more distant from these clusters. The impact on gene expression depends in part on both CpG-density and gene localization where DNA methylation occurs [33].

When we focused on the distribution of these changes in relation to the CpG Island distance, we found that in the normal fibroblasts most methylation changes induced by TGF-β1 occurred directly in the islands (67–80%), whereas in the IPF fibroblasts, the Island and Open sea were the best represented groups (between 33–54% and 50–34%, respectively; Fig 4B).

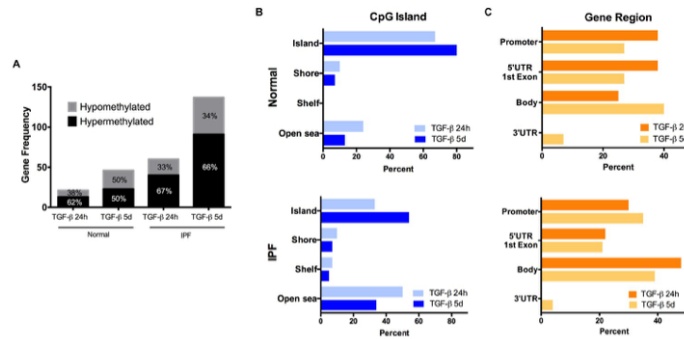


Fig 4. Methylation gene frequency and gene localization/ CpG density of those changes after TGF-β1 treatment. (A) The number of genes with changed methylation status in normal and IPF fibroblast after 24 hours (24h) or five days (5d) of TGF-β1 treatment. Numbers inside the bars represent the percentage of hypomethylated (gray), hypermethylated (black) genes. (Fold Change) (B) Percentage of genes that change methylation status relative to CpG island distance (Island, Shore, Shelf and Open sea) or to the Gene (Promoter, 5'UTR/1st Exon, Body and 3'UTR) at 24 hours (light blue, orange) and five days (dark blue, yellow) in Normal (upper) and IPF (lower) fibroblasts.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223512.g004>

On the other hand, when the methylation changes were analyzed in relation to the UCSC database gene regions (22), most of the changes in the normal fibroblasts are similarly distributed in three categories: Promoter, 5'UTR/1stExon, and Body (~30%), although the first two seem to decrease with sustained TGF- β 1 treatment. In the IPF cell line, the most notable characteristic was the overrepresentation of the gene body category (~40%) and, unlike the case in normal fibroblasts, it decreased with the treatment time. (Fig 4C)

Overlap between gene methylation and gene expression

Few genes exhibited an overlap of methylation and expression changes. Unlike other studies, we did not restrict our analysis to those with an inverse correlation (S1 Fig). In fibroblasts from normal human lungs, a limited number of genes changed and hypermethylation was prevalent. In the case of the IPF fibroblasts we found under extended treatment (5 days) the largest number of genes with altered expression levels and the highest rates of hypomethylation (Fig 5)

The genes that share changes in methylation and gene expression after TGF- β 1 treatment were very limited. In this context, we analyzed all the groups together to find out a possible pattern independently of a positive or inverse correlation. When methylation was classified by gene region, we didn't find any difference between groups of expressed genes (Fig 6A), but when we focus on CpG Island distance, we found that downregulated genes are associated with methylation that occurs directly in the CpG Island while Open Sea is best represented category in the overexpressed genes. (Fig 6B)

Discussion

During repair following tissue damage, lung fibroblasts must coordinately express and silence genes involved in processes such as migration, proliferation, deposition of extracellular matrix, differentiation and apoptosis, which will allow the correct repair of the insult. A complex interplay of epigenetic mechanisms coordinate the correct execution of those programs, and the failure of this regulation has been associated with factors such as age and environment [11]. The loss of this coordination, as occurs in IPF, will lead to pathological phenotypes associated with the disease (1, 28).

TGF- β 1 is likely the strongest profibrotic mediator and plays a critical role in the activation of fibroblasts, but its effects on DNA methylation are not well described. In the present study, we focused on the effects of short and longer-term exposure to TGF- β 1 on gene expression and DNA methylation patterns, as well as changes in regulators of DNA methylation, in IPF and normal lung fibroblasts. We found that a 24h TGF- β 1 stimulus generates gene expression changes related to regulatory pathways and transcriptional factors (MAPK, SREBP, and daunorubicin-associated pathways) while the longer-term stimulus provoked changes related to the fibrotic phenotype of fibroblasts, previously described in IPF, such as increased migration and secretion of matrix molecules and decreased proliferation [34]. Additionally, we found that TGF- β 1 generates a higher number of changes in expression at 24 hours, in contrast to changes in methylation that mainly occur at five days. Interestingly, normal fibroblasts showed significantly more gene expression changes, while IPF fibroblasts underwent more modifications in the methylome. The changes in methylation might be related to the increased DNMT3a expression that we found after TGF- β 1 stimulation. Interestingly, in renal fibrosis, it has been reported that long term TGF- β 1 stimulation induced DNA methylation, but DNMT1 was found to be related to this change. [18].

Use of the Illumina 450k platform allowed us to determine the exact localization of methylation changes with respect to genes and CpG islands, which in turn, enabled us to discover

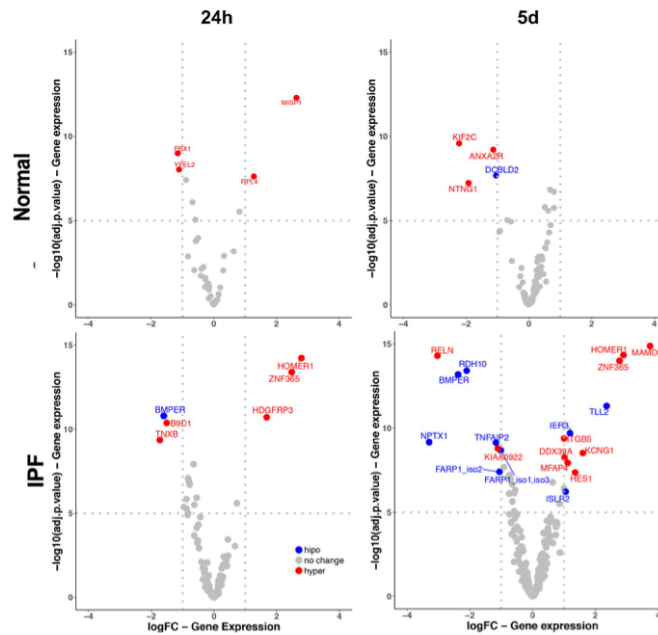


Fig 5. Volcano plots of differentially expressed and methylated genes following TGF-β1 stimuli. Vertical lines indicate the threshold for fold change (logFC) of -1 or 1-fold compared to controls. The horizontal line represents the threshold of a 5 -log₁₀ P value. The blue and red points represent hypo and hypermethylated genes, grey points represent genes with no significant change. Some genes can be duplicated if more than one probe is associated with a modulated gene.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223512.g005>

that after TGF-β1 treatment, most DNA methylation changes occurred in the gene body, confirming previously reported findings in fibrotic lungs [35]. Furthermore, when we analyzed the group of genes that change expression, in addition to undergoing changes in DNA methylation, we again found that these changes were primarily found in the gene body, supporting the notion that although gene expression changes have been mainly associated with methylation in the promoter region, the gene body plays an important role and its methylation is related to gene overexpression, regulation of isoforms, nucleosome stability and transcription efficiency as found in genome-wide methylation studies [36–38].

Our data shows that most of the TGF-beta- associated methylation changes occur in the islands and very few in the surrounding regions such as CpG shores and shelves, which differs from the findings previously reported in whole lungs [35]. Our study differs from the latter in that a different platform was used, and the techniques have different intrinsic biases (e. g. changes are limited to regions in proximity to enzymes recognition sites in the CHARM method, whereas the Infinium Methylation platform coverage is dependent on assay design) [39]. However, our study reports significant changes in DNA methylation in CpG islands, mainly in genes with downregulated expression; further research will be needed to decipher the biological significance of these changes.

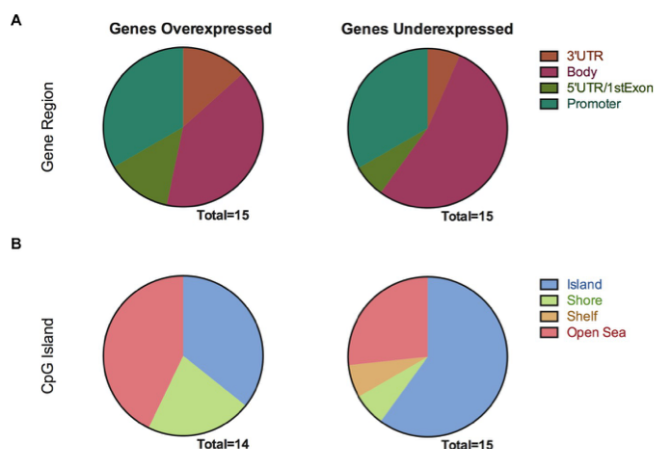


Fig 6. DNA Methylation changes gene-localization or CpG-density of genes that also changed expression, after TGF- β 1 treatments. Pie charts represent all the genes that change their states of DNA methylation and gene expression (over and underexpression, left and right, respectively) after TGF- β 1 treatment; the methylation is arranged by UCSC gene regions (upper) and in relation to the distance from CpG islands (lower).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223512.g006>

As in other previous studies using either whole lungs or isolated fibroblasts, we did not find a correlation pattern in global methylation that accounts for all the changes of gene expression related to TGF- β 1 [13, 14, 35]. In whole-lung studies, it has been suggested that the diversity and the variable number of cell types in the lung may explain the lack of overlap. However, even in a prior study using lung fibroblasts, there was a lack of correlation reported [40]. Heterogeneity of the lung fibroblasts, as well as the existence of other epigenetic mechanisms regulated by TGF- β 1, such as altered expression of the histone methyltransferase (SET and MYND domain containing 3: SMYD3) [41], which we found overexpressed in our study (S3, S4, S5 and S6 Tables), may contribute to the lack of correlation.

In addition, we also found overexpression of TET3, a member of the TET family responsible for hydroxymethylation and subsequent demethylation on DNA. Hydroxymethylation can't be distinguished from classical methylation with bisulfite approaches, and this modification has not been methodologically addressed by global studies of methylation in IPF [42]. The relative roles of TET3 and DNMT3a on the expression of any given gene cannot be determined from our findings.

The most important limitation of our study is the number of samples used; however, our focus in this study is more on the mechanisms of the response to TGF- β 1. Future research should include greater number of cell lines to circumvent inter-individual bias, as methodological strategies to study DNA methylation across the whole genome, including analysis of hydroxymethylation.

Two interesting and novel findings resulted from the gene ontology analysis: the identification of modification of pathways related to SREBP and daunorubicin. Those molecules have been extensively studied and related to lipid homeostasis and to antitumor therapy, respectively. SREBP has been studied in lung injury responses on other cell types such as alveolar Type II [43, 44] cells, and has been implicated in fibrosis in other organs such as kidney and liver [45, 46]. In this regard, findings from a study made in renal fibrosis found that inhibition

of SREBP can diminish extracellular matrix deposition due fibroblast activation [47]. Daunorubicin has been associated in the development of myocardial fibrosis, but this is the first time it has been related to lung fibroblasts and possible regulation of a fibrotic phenotype [48]. One study reported that daunorubicin could prevent the formation of epineural fibrosis by inhibition of fibroblast proliferation [49]. Altogether these findings might suggest a possible role for therapeutic targeting of these pathways, however, more studies are needed.

Conclusions

In summary, we have examined for the first time the effect of TGF- β 1 on DNA methylation in lung fibroblasts. We found that it affects some important elements of the DNA methylation/demethylation machinery (DNMT3a and TET3) and that IPF versus normal lung derived fibroblasts respond differently, likely because of the prior exposure to the fibrotic environment within the lung.

Supporting information

S1 Fig. Details of genes with overlapping methylation and expression changes following TGF- β 1 stimulation. Bars and diamonds represent gene expression and methylation changes against controls. The location of the methylation (related to CpG island or to gene compartment) is shown in the boxes below.

(TIF)

S1 Table. Primers for qPCR analysis.

(XLSX)

S2 Table. Gene ontology (GO) annotation.

(XLSX)

S3 Table. Microarray—Normal TGF-beta 24 hrs vs normal control.

(XLSX)

S4 Table. Microarray—Normal TGF-beta 5 days vs normal control.

(XLSX)

S5 Table. Microarray—IPF TGF-beta 24 hrs vs IPF control.

(XLSX)

S6 Table. Microarray—IPF TGF-beta 5 days vs IPF control.

(XLSX)

S7 Table. Methylation array—Normal TGF-beta 24 hrs vs normal control.

(XLSX)

S8 Table. Methylation array—Normal TGF-beta 5 days vs normal TGF-beta control.

(XLSX)

S9 Table. Methylation array—IPF TGF-beta 24 hrs vs IPF control.

(XLSX)

S10 Table. Methylation array—IPF TGF-beta 5 days vs IPF control.

(XLSX)

Acknowledgments

We thank Remedios Ramírez for her technical support.

Author Contributions

Conceptualization: Miguel Negreros, Moisés Selman, Annie Pardo.

Data curation: Yalbi I. Balderas-Martínez.

Formal analysis: Miguel Negreros, James S. Hagood, Celia R. Espinoza, Yalbi I. Balderas-Martínez, Moisés Selman, Annie Pardo.

Funding acquisition: James S. Hagood, Annie Pardo.

Investigation: Miguel Negreros, James S. Hagood, Celia R. Espinoza, Yalbi I. Balderas-Martínez, Moisés Selman, Annie Pardo.

Methodology: Miguel Negreros, Celia R. Espinoza, Yalbi I. Balderas-Martínez.

Writing – original draft: Annie Pardo.

Writing – review & editing: Miguel Negreros, James S. Hagood, Yalbi I. Balderas-Martínez, Moisés Selman, Annie Pardo.

References

1. King TE Jr., Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2011; 378(9807):1949–61. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60052-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60052-4) PMID: 21719092
2. Pardo A, Selman M. Lung Fibroblasts, Aging, and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc*. 2016; 13(Supplement_5):S417–S21. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201605-341AW> PMID: 28005427
3. Datta A, Scotton CJ, Chambers RC. Novel therapeutic approaches for pulmonary fibrosis. *Br J Pharmacol*. 2011; 163(1):141–72. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01247.x> PMID: 21265830
4. Agostini C, Gurrieri C. Chemokine/cytokine cocktail in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2006; 3(4):357–63. <https://doi.org/10.1513/pats.200601-010TK> PMID: 16738201
5. Fernandez IE, Eickelberg O. The impact of TGF-beta on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proc Am Thorac Soc*. 2012; 9(3):111–6. Epub 2012/07/18. <https://doi.org/10.1513/pats.201203-023AW> PMID: 22802283
6. Eickelberg O, Kohler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, et al. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3. *Am J Physiol*. 1999; 276(5 Pt 1):L814–24. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.276.5.L814> PMID: 10330038
7. Horowitz JC, Rogers DS, Sharma V, Vittal R, White ES, Cui Z, et al. Combinatorial activation of FAK and AKT by transforming growth factor-beta1 confers an anoikis-resistant phenotype to myofibroblasts. *Cell Signal*. 2007; 19(4):761–71. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.10.001> PMID: 17113264
8. Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest*. 2007; 132(4):1311–21. <https://doi.org/10.1378/chest.06-2568> PMID: 17934117
9. Chambers RC, Leoni P, Kaminski N, Laurent GJ, Heller RA. Global expression profiling of fibroblast responses to transforming growth factor-beta1 reveals the induction of inhibitor of differentiation-1 and provides evidence of smooth muscle cell phenotypic switching. *Am J Pathol*. 2003; 162(2):533–46. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63847-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63847-3) PMID: 12547711
10. Renzoni EA, Abraham DJ, Howat S, Shi-Wen X, Sestini P, Bou-Gharios G, et al. Gene expression profiling reveals novel TGFbeta targets in adult lung fibroblasts. *Respir Res*. 2004; 5:24. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-5-24> PMID: 15571627
11. Hagood JS. Beyond the genome: epigenetic mechanisms in lung remodeling. *Physiology (Bethesda)*. 2014; 29(3):177–85. <https://doi.org/10.1152/physiol.00048.2013> PMID: 24789982
12. Benayoun BA, Pollina EA, Brunet A. Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015; 16(10):593–610. <https://doi.org/10.1038/nm4048> PMID: 26373265
13. Sanders YY, Ambalavanan N, Halloran B, Zhang X, Liu H, Crossman DK, et al. Altered DNA methylation profile in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 186(6):525–35. <https://doi.org/10.1164/rccm.201201-0077OC> PMID: 22700861

14. Rabinovich EI, Kapetanaki MG, Steinfeld I, Gibson KF, Pandit KV, Yu G, et al. Global methylation patterns in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 2012; 7(4):e33770. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033770> PMID: 22506007
15. Neveu WA, Mills ST, Staitieh BS, Sueblinvong V. TGF-beta1 epigenetically modifies Thy-1 expression in primary lung fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015; 309(9):C616–26. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00086.2015> PMID: 26333597
16. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 183(6):788–824. <https://doi.org/10.1164/rccm.2009-040GL> PMID: 21471066
17. Raghu G, Rochberg B, Zhang Y, Garcia CA, Azuma A, Behr J, 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*. 2015; 192(2):e3–19. <https://doi.org/10.1164/rccm.201506-1063ST> PMID: 26177183
18. Bechtel W, McGoochan S, Zeisberg EM, Muller GA, Kalbacher H, Salant DJ, et al. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med*. 2010; 16(5):544–50. Epub 2010/04/27. <https://doi.org/10.1038/nm.2135> PMID: 20418885
19. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. 2014. Available from: <https://www.R-project.org/>
20. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods*. 2015; 12(2):115–21. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3252> PMID: 25633503
21. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43(7):e47. Epub 2015/01/22. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007> PMID: 25605792
22. Maksimovic J, Phipson B, Oshlack A. A cross-package Bioconductor workflow for analysing methylation array data. *F1000Res*. 2016; 5:1281. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8839.3> PMID: 27347385
23. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 2014; 30(10):1363–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu049> PMID: 24478339
24. Chen YA, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, et al. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. *Epi-genetics*. 2013; 8(2):203–9. <https://doi.org/10.4161/epi.23470> PMID: 23314698
25. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 2011; 98(4):288–95. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.07.007> PMID: 21839163
26. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44(W1):W90–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw377> PMID: 27141961
27. Gimenez A, Duch P, Puig M, Gabasa M, Xaubet A, Alcaraz J. Dysregulated Collagen Homeostasis by Matrix Stiffening and TGF-beta 1 in Fibroblasts from Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients: Role of FAK/Akt. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112431> PMID: 29144435
28. Oruqaj G, Karnati S, Vijayan V, Kotarkonda LK, Boateng E, Zhang W, et al. Compromised peroxisomes in idiopathic pulmonary fibrosis, a vicious cycle inducing a higher fibrotic response via TGF-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(16):E2048–57. Epub 2015/04/08. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415111112> PMID: 25848047
29. White ES, Sagana RL, Booth AJ, Yan M, Cornett AM, Bloomheart CA, et al. Control of fibroblast fibronectin expression and alternative splicing via the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Exp Cell Res*. 2010; 316(16):2644–53. Epub 2010/07/10. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.06.028> PMID: 20615404
30. Sanders YY, Pardo A, Selman M, Nuovo GJ, Tollefsbol TO, Siegal GP, et al. Thy-1 promoter hypermethylation: a novel epigenetic pathogenic mechanism in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008; 39(5):610–8. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0322OC> PMID: 18556592
31. Ramirez G, Hagood JS, Sanders Y, Ramirez R, Becerril C, Segura L, et al. Absence of Thy-1 results in TGF-beta induced MMP-9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts. *Lab Invest*. 2011; 91(8):1206–18. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.80> PMID: 21577212
32. Hagood JS, Prabhakaran P, Kumbia P, Salazar L, MacEwen MW, Barker TH, et al. Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am J Pathol*. 2005; 167(2):365–79. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62982-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62982-3) PMID: 16049324

33. Illingworth RS, Bird AP. CpG islands—a rough guide'. *FEBS Lett.* 2009; 583(11):1713–20. Epub 2009/04/21. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.012> PMID: 19376112
34. Alvarez D, Cardenas N, Sellares J, Bueno M, Corey C, Hanumanthu VS, et al. IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017; 313(6):L1164–L73. Epub 2017/09/02. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00220.2017> PMID: 28860144
35. Yang IV, Pedersen BS, Rabinovich E, Hennessy CE, Davidson EJ, Murphy E, et al. Relationship of DNA methylation and gene expression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014; 190(11):1263–72. Epub 2014/10/22. <https://doi.org/10.1164/rccm.201408-1452OC> PMID: 25333685
36. Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queiros AC, Navarro A, Clot G, et al. Epigenomic analysis detects wide-spread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2012; 44(11):1236–42. Epub 2012/10/16. <https://doi.org/10.1038/ng.2443> PMID: 23064414
37. Yang X, Han H, De Carvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell.* 2014; 26(4):577–90. Epub 2014/09/30. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.028> PMID: 25263941
38. Varley KE, Gertz J, Bowling KM, Parker SL, Reddy TE, Pauli-Behn F, et al. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res.* 2013; 23(3):555–67. Epub 2013/01/18. <https://doi.org/10.1101/gr.147942.112> PMID: 23325432
39. Yong WS, Hsu FM, Chen PY. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin.* 2016; 9:26. Epub 2016/07/01. <https://doi.org/10.1186/s13072-016-0075-3> PMID: 27358654
40. Huang SK, Scruggs AM, McEachin RC, White ES, Peters-Golden M. Lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis exhibit genome-wide differences in DNA methylation compared to fibroblasts from nonfibrotic lung. *PLoS One.* 2014; 9(9):e107055. Epub 2014/09/13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107055> PMID: 25215577
41. Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, et al. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol.* 2004; 6(8):731–40. Epub 2004/07/06. <https://doi.org/10.1038/ncb1151> PMID: 15235609
42. Skinner MK, Guerrero-Bosagna C. Role of CpG deserts in the epigenetic transgenerational inheritance of differential DNA methylation regions. *BMC Genomics.* 2014; 15:692. Epub 2014/08/22. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-692> PMID: 25142051
43. Besnard V, Wert SE, Stahlman MT, Postle AD, Xu Y, Ikegami M, et al. Deletion of Scap in alveolar type II cells influences lung lipid homeostasis and identifies a compensatory role for pulmonary lipofibroblasts. *J Biol Chem.* 2009; 284(6):4018–30. Epub 2008/12/17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805388200> PMID: 19074148
44. Plantier L, Besnard V, Xu Y, Ikegami M, Wert SE, Hunt AN, et al. Activation of sterol-response element-binding proteins (SREBP) in alveolar type II cells enhances lipogenesis causing pulmonary lipotoxicity. *J Biol Chem.* 2012; 287(13):10099–114. Epub 2012/01/24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.303669> PMID: 22267724
45. Zhang W, Niu M, Yan K, Zhai X, Zhou Q, Zhang L, et al. Stat3 pathway correlates with the roles of leptin in mouse liver fibrosis and sterol regulatory element binding protein-1c expression of rat hepatic stellate cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45(3):736–44. Epub 2013/01/09. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.12.019> PMID: 23295202
46. Wang TN, Chen X, Li R, Gao B, Mohammed-Ali Z, Lu C, et al. SREBP-1 Mediates Angiotensin II-Induced TGF-beta1 Upregulation and Glomerular Fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2015; 26(8):1839–54. Epub 2014/11/16. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013121332> PMID: 25398788
47. Mustafa M, Wang TN, Chen X, Gao B, Krepinsky JC. SREBP inhibition ameliorates renal injury after unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016; 311(3):F614–25. Epub 2016/07/08. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00140.2016> PMID: 27385736
48. Wilcox RG, James PD, Toghiani PJ. Endomyocardial fibrosis associated with daunorubicin therapy. *Br Heart J.* 1976; 38(8):860–3. Epub 1976/08/01. <https://doi.org/10.1136/hrt.38.8.860> PMID: 1067858
49. Vural E, Yilmaz M, Ilbay K, Ilbay G. Prevention of Epidural Fibrosis in Rats by Local Administration of Mitomycin C or Daunorubicin. *Turk Neurosurg.* 2016; 26(2):291–6. Epub 2016/03/10. <https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.7705-12.1> PMID: 26956828