



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

FUNCIÓN DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL SCLERAXIS EN LA FIBROSIS

PULMONAR IDIOPÁTICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. RAMÍREZ ARAGÓN MIGUEL

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CRISELDA MENDOZA MILLA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. JESÚS CHIMAL MONROY
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/831/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted qué en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de enero de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **RAMÍREZ ARAGÓN MIGUEL** con número de cuenta **512015147** con la tesis titulada **"FUNCIÓN DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL SCLERAXIS EN LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. CRISELDA MENDOZA MILLA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA
Vocal: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Vocal: DR. CARLOS CABELLO GUTIÉRREZ
Vocal: DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA
Secretario: DR. JESÚS CHIMAL MONROY

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 30 de agosto de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM.

Al apoyo recibido por parte de CONACYT beca No. de becario 262580, No. de apoyo 400447.

A mi tutora la Dra. Criselda Mendoza Milla y a los miembros del comité la Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas y el Dr. Jesús Chimal Monroy por brindarme sus observaciones, correcciones y apoyo con la finalidad de mejorar y culminar este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A los integrantes del laboratorio de biología celular de la unidad de investigación del INER por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

Al M. en C. Fernando Hernández Sánchez por su guía y apoyo constante durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Miguel Ángel Negreros Amaya por brindarme su ayuda y orientación en cada momento que fue necesaria.

A mis padres Mercedes, Miguel, mis hermanas Georgina, Monserrath y mi sobrino Emiliano, ya que su apoyo incondicional en cada una de las etapas de este proyecto fue de gran importancia para seguir adelante.

A mi esposa Ana por motivarme a ser siempre una mejor versión de mi persona, por apoyarme en cada paso que doy de manera incondicional, por ser una parte fundamental de mi vida y por estar siempre a mi lado en todo momento y situación.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. Fibrosis	3
3.2. Fibrosis Pulmonar Idiopática	4
3.3. TGFβ.....	5
3.4. TGFβ en Fibrosis Pulmonar Idiopática	6
3.5. Señalización del TGFβ.....	7
3.6. Factores transcripcionales bHLH.....	8
3.7. Scleraxis.....	10
4. ANTECEDENTES	10
4.1. Estructura de SCX	10
4.2. Mecanismo de acción.....	11
4.3. Funciones fisiológicas de Scleraxis	12
4.3.1. Scleraxis en desarrollo embrionario.....	12
4.3.2. Scleraxis en tejido adulto.....	15
4.4. Funciones patológicas de Scleraxis.....	18
5. HIPÓTESIS	21
6. OBJETIVOS	21
7. METODOLOGÍA	22
7.1. Población de estudio.....	22
7.1.1. Categorización de pacientes según su capacidad pulmonar	23
7.2. Toma de muestras sanguíneas.....	23
7.3. Cuantificación de SCX en suero	23
7.4. Plásmidos utilizados	24
7.5. Sub-clonación de SCX.....	25
7.6. Purificación de plásmido	26
7.7. Generación de partículas virales.....	26
7.8. Purificación de partículas virales.....	27
7.9. Titulación de partículas virales.....	27
7.10. Cultivo celular	28
7.11. Infección y tratamiento de células en cultivo.....	29

7.12.	PCR en tiempo real (qPCR).....	30
7.13.	Western Blot.....	30
7.14.	Inmunohistoquímica (IHC).....	31
7.15.	Análisis estadístico	32
8.	RESULTADOS	34
8.1.	El aumento en la expresión de SCX se relaciona con mayor expresión de los genes de MEC en fibroblastos pulmonares.....	34
8.2.	La expresión de SCX se incrementa en el tejido pulmonar de pacientes con FPI ...	37
8.3.	SCX aumenta en suero de pacientes con FPI comparado con individuos sanos	39
8.4.	Sobre expresión de SCX en fibroblastos pulmonares mediante vectores adenovirales.....	42
8.5.	La sobre expresión de SCX no causa un incremento significativo de COL1A2 en fibroblastos pulmonares	43
8.6.	TGFβ no contribuye a que la sobreexpresión inducida de SCX tenga efecto sobre sus genes blanco	45
8.7.	E47 como compañero de transcripción de SCX	48
9.	DISCUSIÓN	52
10.	CONCLUSIONES	59
11.	PERSPECTIVAS.....	60
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
13.	ANEXO – Artículo requisito para la obtención de grado	71

1. RESUMEN

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad asociada al envejecimiento, de causa desconocida y para la cual no existe un tratamiento específico; se considera la forma de fibrosis pulmonar más común y grave. La FPI se caracteriza por ser progresiva, irreversible y letal en un plazo breve de tiempo. Se cree que su patogénesis es dada por la activación anormal del epitelio alveolar, lo cual conduce a la producción de citocinas tales como el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF β , [*Transforming Grow Factor*], por sus siglas en inglés) y factores de crecimiento que promueven la migración, proliferación y diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, con la consecuente acumulación de componentes de la matriz extracelular (MEC) y deterioro progresivo de la arquitectura pulmonar. Scleraxis (SCX) es un factor de transcripción que se expresa en respuesta al TGF β y regula la transcripción de la MEC en órganos como el corazón, piel y tendones, sin embargo, su función en tejido pulmonar no ha sido reportada.

La hipótesis de este trabajo sostiene que SCX juega un papel importante en el desarrollo de la FPI. Para comprobarlo se evaluó la expresión de este factor en células, tejido pulmonar y suero de pacientes con FPI, mediante qPCR, Western Blot, inmunohistoquímica y ELISA. Posteriormente se indujo un aumento en la expresión de SCX en fibroblastos pulmonares.

Los resultados obtenidos nos muestran que SCX se encuentra incrementado tanto en células, como tejido pulmonar en los pacientes con FPI en comparación con el grupo control. De manera similar, la forma circulante de SCX se encuentra aumentada en pacientes con FPI en comparación con los individuos sanos. Este incremento se observó en mayor medida en los individuos con un severo deterioro pulmonar, con lo que se asume que el aumento de SCX está relacionado con las etapas más severas de FPI.

La sobreexpresión de SCX no tuvo un efecto por si sola en la expresión de sus genes blanco. Creemos que en células pulmonares es necesaria la interacción de SCX con otros factores de la misma familia, como E47, para ejercer su función reguladora.

2. ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a disease associated with ageing. It is of unknown cause, without specific treatment, and it is considered the most common form of pulmonary fibrosis. IPF is characterized by being progressive, irreversible, and lethal in a short period. Its pathogenesis is due to abnormal activation of the alveolar epithelium. It leads to cytokines production, such as Transforming Growth Factor β (TGF β) and growth factors that promote migration, proliferation, and differentiation of fibroblasts to myofibroblasts. It causes an accumulation of extracellular matrix components and progressive loss of pulmonary architecture.

Scleraxis (SCX) is a transcription factor that is expressed in response to TGF β . SCX regulates transcription of extracellular matrix (ECM). This regulation is reported in organs such as heart, skin, and tendons. However, its function in the lung has not been reported.

We hypothesize is that SCX participates plays an essential role in FPI development. SCX expression was evaluated by qPCR, Western Blot, Immunohistochemistry and ELISA in cells, lung tissue and serum of IPF patients. Subsequently, it was induced an increase in SCX expression in lung fibroblasts to evaluate mechanisms by it could participate in IPF pathogenesis.

Results show that SCX was increased in both cells and lung tissue in IPF patients than the control group. Circulating SCX was also increased in IPF patients compared to healthy individuals. Higher levels of SCX were observed in patients with severe pulmonary damage. It could mean that SCX increase is related to more severe stages of IPF.

SCX overexpression did not affect its target genes expression. In lung cells, we believe that interaction with other bHLH factors like E47 is necessary for SCX regulatory function.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Fibrosis

La fibrosis es un proceso patológico que se desarrolla como resultado de una deficiencia en la reparación de tejidos. Durante este proceso deficiente se producen citocinas, factores de crecimiento y angiogénicos que desembocan en la acumulación excesiva de matriz extracelular (MEC), misma que tiene como consecuencia una remodelación progresiva del tejido que, en última instancia, conduce a la destrucción de su arquitectura y la consecuente pérdida de funcionalidad del mismo ¹.

El proceso fibrótico participa en un amplio espectro de patologías, en las cuales es desencadenado por distintos factores y se presenta en diferentes etapas ². En enfermedades de origen autoinmune como la esclerosis sistémica (ES) la fibrosis se presenta como consecuencia de lesiones e inflamación crónica en el tejido. La fibrosis en piel es una de las principales características de esta enfermedad, sin embargo, se presenta de manera generalizada en diversos órganos como pulmón, corazón, intestino y riñones ^{1,3}.

En las patologías intersticiales pulmonares la fibrosis se presenta de manera recurrente, estas enfermedades son clasificadas según su origen. Dentro de esta clasificación, las que se presentan con mayor frecuencia son las asociadas a exposición ambiental y las neumonías intersticiales idiopáticas ⁴. Un ejemplo de enfermedad pulmonar debida a exposición ambiental es la neumonitis por hipersensibilidad (NH). La NH se desarrolla como resultado de una inflamación del parénquima pulmonar inducida por una respuesta inmunológica a diversos antígenos ^{5,6}. Los pacientes con NH crónica o recurrente pueden llegar a desarrollar fibrosis pulmonar en alguna etapa de la enfermedad, sin embargo, las causas exactas de esta no se conocen a profundidad y siguen siendo materia de estudio por numerosos grupos de investigación ^{5,7}.

Por otra parte, las neumonías intersticiales idiopáticas se caracterizan por presentar inflamación intersticial y fibrosis pero, como su nombre lo indica, se

desconoce cuál es su origen ⁸. Entre las neumonías idiopáticas de mayor estudio se encuentra la fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

3.2. Fibrosis Pulmonar Idiopática

La FPI es una de las neumonías intersticiales idiopáticas más común, además, se caracteriza por ser una patología crónica, progresiva, irreversible, y letal ⁹. Esta enfermedad afecta principalmente a personas entre 50 y 70 años ⁸. Se estima que su incidencia y prevalencia en Estados Unidos es de 140-42.7 y 6.8-16.3 por cada 100,000 personas respectivamente ⁸. El pronóstico para los pacientes con FPI es malo, la supervivencia de estos pacientes es peor que la de diferentes tipos de cáncer que afectan a personas con características demográficas similares ¹⁰. El cuadro clínico de la FPI se caracteriza inicialmente por presentar disnea progresiva y tos seca. La evolución de la FPI es muy variable, pudiendo permanecer asintomática por largos periodos de tiempo. Regularmente tiene una progresión lenta, aunque pueden darse formas aceleradas que llevan a la insuficiencia respiratoria en un lapso de 6 a 12 meses. La supervivencia varía de 2 a 5 años desde el inicio de los síntomas ¹¹.

A pesar de ser una enfermedad idiopática se han descrito diferentes factores de riesgo que podrían promover su desarrollo. Estos factores pueden ser genéticos, ambientales y demográficos. En lo que respecta al riesgo genético, se ha identificado que la presencia de variantes en genes relacionados con el mantenimiento de los telómeros (TERT, TERC, TINF2, DKC1, RTEL1, PARN y NAF1), las proteínas surfactantes (SFTPC, SFTPA2) y macromoléculas que constituyen componentes de secreciones mucosas (MUC5B) pueden incrementar el riesgo de desarrollar FPI. Entre los factores ambientales que más se han relacionados con el desarrollo de FPI se encuentran el tabaquismo, inhalación de partículas metálicas, polvo, piedra y sílice, así como la presencia de infecciones virales (virus de Epstein-Barr) y bacterianas (*Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.*) ^{9,10}. Por otra parte, la edad es el principal factor de riesgo demográfico, lo que indica que las personas en edad avanzada son las más susceptibles al desarrollo de esta patología ¹⁰.

La patogénesis de la FPI fue descrita originalmente como una enfermedad inflamatoria crónica; sin embargo, debido a la respuesta ineficiente del tratamiento antiinflamatorio este concepto fue modificado ^{11,12}. Actualmente la FPI se describe como una enfermedad multifactorial, en la que factores genéticos, ambientales y demográficos, promueven una activación aberrante de las células del epitelio alveolar, lo que conduce a la migración y proliferación de fibroblastos, fibrocitos y progenitores mesenquimales, así como su posterior diferenciación a miofibroblastos. Estas células en su conjunto son las responsables de la secreción exacerbada y acumulación de MEC, lo que tiene como consecuencia la destrucción de la arquitectura pulmonar (Figura 1) ¹⁰⁻¹².

Durante la patogénesis de la FPI la secreción de factores de crecimiento tiene una función importante en el desarrollo de un entorno profibrosante. Entre los factores que mayor participación tienen en el desarrollo de la FPI se encuentra el factor de crecimiento transformante β (TGF β , [*Transforming Grow Factor*], por sus siglas en inglés. Se ha reportado que la presencia de este factor promueve la transición epitelio mesénquima (TEM) durante la FPI, además de orquestar la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y dotarlos de resistencia a la apoptosis ¹²⁻¹⁴, así como otras características asociadas al fenotipo mesenquimal tales como el aumento en la capacidad migratoria y el aumento en la capacidad de síntesis de proteínas de matriz extracelular¹⁵.

3.3. TGF β

El TGF β es una citocina multifuncional que regula la proliferación, adhesión, diferenciación y apoptosis de varios tipos de células ¹⁶⁻¹⁸. Los mecanismos a través de los cuales realiza todas estas funciones son variados, ya que se ha observado que TGF β activa o reprime diferentes cascadas de señalización dependiendo del contexto fisiológico o celular, por lo que puede funcionar tanto como activador como inhibidor de un mismo proceso dependiendo del tipo celular o el contexto fisiológico en el que se esté expresando ^{17,18}.

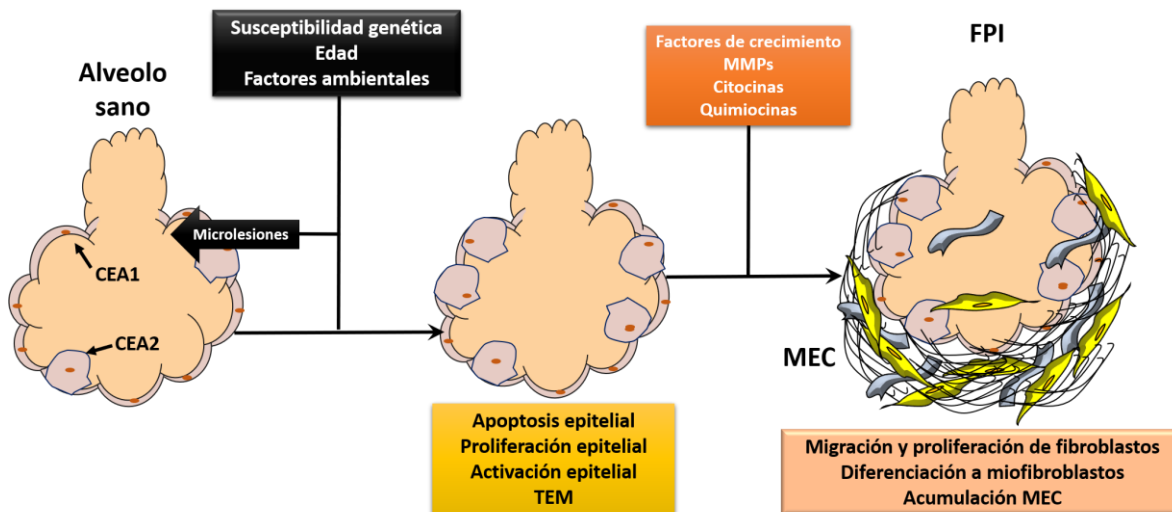


Figura 1. Patogénesis propuesta de la FPI. El tejido pulmonar sufre micro lesiones constantes que promueven una activación aberrante de las células del epitelio alveolar debido a susceptibilidad asociada a factores genéticos, demográficos y ambientales. Las células epiteliales activadas así, secretan factores que inducen la migración y proliferación de fibroblastos, así como su diferenciación a miofibroblastos. Estos secretan grandes cantidades de MEC, la cual se acumula y conduce a una remodelación aberrante de la arquitectura pulmonar. CEA1: Células del epitelio alveolar tipo 1. CEA2: Células del epitelio alveolar tipo 2.

3.4. TGFβ en Fibrosis Pulmonar Idiopática

En FPI se ha reportado que los niveles de TGFβ se encuentran aumentados, por lo que es una de las moléculas que más se han estudiado en esta enfermedad ^{13,14,18,19}. Bajo condiciones fisiológicas el TGFβ se encuentra en estado de latencia embebido en la MEC ¹⁴, sin embargo, durante el desarrollo de la fibrosis es activado por medio de integrinas expresadas por las células del epitelio alveolar, lo que le permite unirse a su receptor y activar la cascada de señalización en el tejido pulmonar ¹⁴.

En las células del epitelio alveolar el TGFβ inhibe su proliferación y promueve la TEM, lo que las conduce a adquirir un fenotipo mesenquimal, así como a realizar las funciones propias de este tipo celular. En fibroblastos pulmonares, el TGFβ favorece la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, promueve la expresión de proteínas de MEC, como colágena, fibronectina, laminina y vitronectina, además de incrementar la migración, proliferación y resistencia a apoptosis de estas células, lo que genera una

acumulación exacerbada tanto de células como de MEC en los espacios alveolares
13,18,19.

3.5. Señalización del TGF β

La cascada de señalización del TGF β inicia tras la unión de este factor con su receptor. El receptor de TGF β posee actividad de serina/treonina cinasa, se encuentra localizado en la membrana celular y tiene la capacidad de formar complejos heteroméricos. Tras la unión del TGF β con su receptor, este último fosforila a las proteínas Smad, específicamente a las Smad2 y Smad3. Una vez fosforiladas, estas proteínas forman un complejo con la proteína Smad4, el cual será translocado al núcleo, donde en colaboración con otros factores transcripcionales se unirá a la región promotora de sus genes blanco y regulará su expresión (Figura 2) ¹⁸⁻²¹.

La participación de diferentes factores transcripcionales con el complejo Smad resulta ser de vital importancia para la correcta regulación ejercida por esta vía de señalización. Entre los factores de transcripción para los que se han descrito alguna correlación con la vía del TGF β , se encuentran los de la familia bHLH.

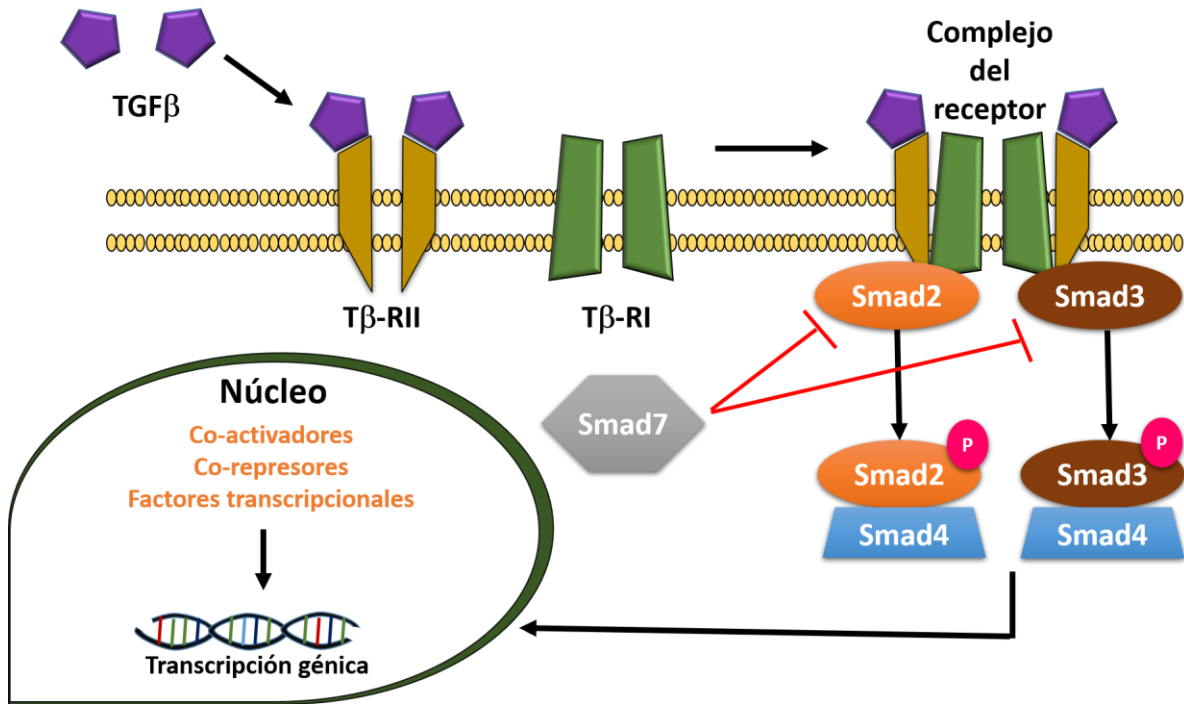


Figura 2. Ruta canónica de señalización del TGFβ. TGFβ se une a su receptor Tβ-RII. Tras esta unión el receptor Tβ-RII recluta y fosforila Tβ-RI. Esto conduce a la fosforilación de Smad2 y Smad3. Este proceso puede ser inhibido por la Smad7. Smad2 y Smad3 fosforiladas forman un complejo heterodimérico con Smad4 y es translocado al núcleo. Con ayuda de coactivadores, corepresores y factores transcripcionales el complejo de Smad regula la expresión de sus genes blanco.

3.6. Factores transcripcionales bHLH

Los factores transcripcionales bHLH son una familia de proteínas que adquieren su nombre debido a su estructura, la cual está conformada por una región básica que les permite unirse directamente al ácido desoxirribonucleico (DNA [*deoxyribonucleic acid*], por sus siglas en inglés) y un dominio hélice-bucle-hélice (HLH [*hélix-loop-helix*], por sus siglas en inglés) que les confiere la capacidad de interactuar como homodímeros o heterodímeros con miembros de la misma familia o con proteínas no relacionadas ^{22,23}.

Estos factores se encuentran altamente conservados entre especies. Se ha reportado su presencia en levaduras, aves y pasando por mamíferos inferiores hasta humanos ²⁴.

Debido a la diversidad de funciones que desempeñan en diferentes órganos, se han clasificado en tres clases principales:

- *Clase A:* Se caracterizan por expresarse en un rango amplio de células y tejidos en los organismos. Los miembros que pertenecen a esta clase son conocidos como proteínas E, y se incluyen E47, E12 (conocidos como proteínas E2A), HEB, y E2-2 ²³.
- *Clase B:* se caracterizan por la presencia de patrones de expresión restringida a ciertos órganos. Este grupo es el que presenta mayor cantidad de miembros, lo que se traduce en una amplia variedad de procesos celulares, sin embargo, aún no se conocen por completo las funciones y mecanismos de acción de todos ellos. Entre los más estudiados de este grupo se encuentran MyoD (proteína de diferenciación miogénica), TWIST y Scleraxis (SCX) ²³.
- *Clase C:* Cumplen una función inhibitoria debido a su estructura carente de sitio básico de unión a DNA. Los miembros de esta clase interactúan con las proteínas, entre ellos se encuentran las proteínas Id ²³.

Los procesos celulares en los que participan los factores bHLH son muy diversos ya que van desde la regulación de rutas vitales para la diferenciación celular en el desarrollo embrionario, hasta la generación de distintos linajes celulares, incluyendo células inmunes. Además de estas funciones también se ha descrito su participación en procesos de proliferación celular, mantenimiento del ciclo celular e incluso en la síntesis de MEC ^{23,25}. Tomando en cuenta la amplia gama de procesos en los que estos factores se ven involucrados es de suponer que un desequilibrio en su expresión o función podría tener como consecuencia deficiencias en los procesos mencionados, lo cual podría derivar en el desarrollo de procesos patológicos, por tal motivo estos factores han sido blanco de estudio en enfermedades de origen multifactorial, tales como cáncer, esquizofrenia, fibrosis renal, aterosclerosis, por mencionar algunos ejemplos ²⁵.

3.7. Scleraxis

SCX es un factor transcripcional perteneciente a la familia bHLH. Fue descubierto en 1995 formando heterodímeros con el factor transcripcional E12 ²⁶. Los primeros estudios realizados sobre este factor lo describían como una proteína primordial durante el desarrollo embrionario ^{26,27}, sin embargo, más recientemente se ha reportado que SCX participa de manera activa en procesos de regeneración, promoviendo la síntesis de componentes de MEC ^{28,29}. Con base en estos últimos hallazgos se ha reportado que una deficiencia en su función reguladora puede llevar al desarrollo de fibrosis en diferentes órganos ^{30,31}.

4. ANTECEDENTES

4.1. Estructura de SCX

SCX cuenta con el dominio bHLH característico de la familia a la que pertenece (Figura 3). El dominio bHLH está conformado por dos regiones denominadas básica y HLH. La región básica es la encargada de mediar la unión del factor transcripcional con la secuencia de DNA a través de regiones específicas del promotor denominadas Ebox. Por su parte la región HLH está conformada por dos α hélices separadas por una secuencia que constituye el bucle. Una de sus hélices posee una longitud menor, lo cual le proporciona flexibilidad y facilita la dimerización con diferentes proteínas reguladoras, principalmente miembros de la misma familia, por otra parte, la hélice de mayor longitud contribuye en la interacción del dominio básico con el DNA. Cerca del carboxilo terminal posee una región rica en residuos de prolina, la cual es similar al dominio de transactivación encontrado en diferentes factores transcripcionales ²⁶.

Estudios recientes han demostrado que SCX es fosforilada en los residuos de Serina 31 y 34 por medio de la proteína CK2. Esta modificación resulta fundamental en la actividad de SCX ya que su función se ve severamente disminuida en ensayos que impiden dicha modificación ³².

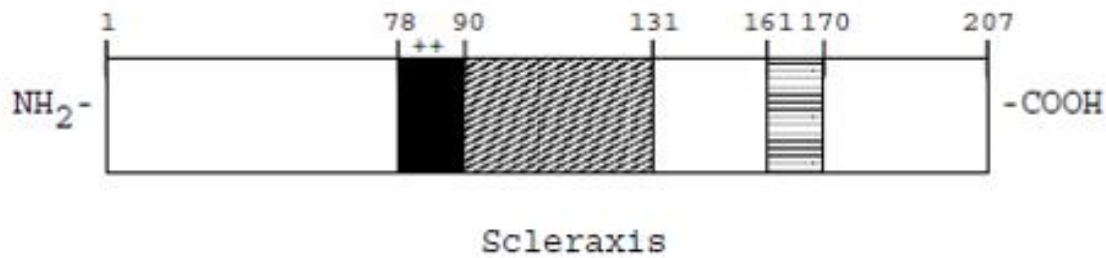


Figura 3. Esquema de la estructura de SCX. SCX cuenta con las estructuras básicas de los factores bHLH. La región básica de unión a DNA se encuentra entre los residuos 78-90. La región de heterodimerización HLH está comprendida por los residuos de aminoácidos 90-131. Una región rica en prolina se encuentra entre los residuos 161-170. Se cree que esta zona funciona como un dominio de transactivación. Imagen modificada de: Cserjesi, P. et al. Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development* (1995).

4.2. Mecanismo de acción

El mecanismo a través del cual SCX es activado no se conoce en su totalidad, sin embargo, diversos estudios han señalado diferentes rutas por las cuales actúa este factor transcripcional.

La principal ruta de activación que se ha descrito para SCX es la señalización activada por TGF β . Se ha reportado que la expresión de SCX se ve incrementada tras estímulos de TGF β en diferentes tipos de células ^{28-30,33}. Además se ha observado una función sinérgica entre SCX y las proteínas Smad en la regulación de sus genes blanco ^{29,33}. Sin embargo, existe evidencia que sugiere que el mecanismo de activación de SCX es a través de la ruta no canónica del TGF β y de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) ³⁴⁻³⁶.

Otras rutas por las cuales actúa SCX han sido descritas en diferentes órganos y contextos fisiológicos. En el desarrollo embrionario se ha descrito que SCX regula la transcripción dependiente de SOX9 ³⁷ y que los niveles de SCX son regulados por el factor de crecimiento de Fibroblastos 4 (FGF4) ³⁸. En tejido adulto se ha reportado la existencia de una regulación de SCX a través de la hormona aldosterona ³⁹.

Otro mecanismo de activación de SCX involucra un contexto físico, ya que las fuerzas físicas ejercidas durante el estiramiento o la carga de trabajo en diferentes tejidos son capaces de inducir la expresión de SCX ^{30,40-42}. Incluso, hay evidencia que señala la existencia de una interacción sinérgica entre fuerza física y SCX, la cual es capaz de promover la diferenciación de células troncales humanas en tenocitos ⁴³. Por otra parte, se ha reportado que la expresión de SCX se ve disminuida en células troncales mesenquimales a medida que la rigidez de la superficie de cultivo se ve incrementada ⁴⁴, lo cual podría ser indicativo de una asociación entre la expresión de SCX y la flexibilidad y/o estiramiento de los tejidos. En este contexto, es importante mencionar que los pulmones de pacientes con FPI presentan mayor rigidez que el tejido pulmonar normal ⁴⁵.

Considerando la evidencia existente, se puede resumir que SCX trabaja a través de diversos mecanismos de activación, los cuales serán operados según el contexto celular y fisiológico en que se encuentre el organismo.

4.3. Funciones fisiológicas de Scleraxis

4.3.1. Scleraxis en desarrollo embrionario

El factor transcripcional SCX fue inicialmente reportado como un compañero de dimerización del factor transcripcional E12. Debido a que se encuentra ampliamente conservado entre especies, se llegó a considerar que la función de SCX podría ser primordial en el desarrollo embrionario. Los primeros hallazgos de SCX reportaron que su expresión comienza a ser detectable en la región ventrolateral del esclerotomo y en las células mesenquimales de las extremidades entre los días 9.5 y 10.5 postcoitum en el desarrollo embrionario del ratón, así como en precursores mesenquimales de los esqueletos axial y apendicular, disminuyendo su expresión antes de la formación del esqueleto cartilaginoso, para posteriormente tener un patrón de expresión restringido a zonas con gran cantidad de tejido conectivo como tendones ligamentos y cartílago ²⁶.

Tras el descubrimiento de SCX y su función en desarrollo embrionario, surgieron nuevas investigaciones con la finalidad de ampliar el panorama y el conocimiento sobre el recién reportado factor transcripcional. Estas investigaciones reportaron que la función de SCX era imprescindible para el desarrollo embrionario, ya que se observó un efecto letal en ratones knock out para esta proteína. Se encontró que la ausencia de SCX durante la etapa de nódulo primitivo evita que se lleve a cabo el proceso de gastrulación, teniendo como consecuencia una deficiencia en la formación del mesodermo. Esto es debido a que SCX se expresa durante la etapa de blastocito, manteniéndose hasta el epiblasto, para posteriormente restringirse al mesodermo. En estadios posteriores se demostró que SCX se expresa débilmente en los arcos branquiales y la región frontonasal, para finalmente limitar su expresión a precursores condrogénicos de los esqueletos axiales y apendiculares, así como a tejidos conectivos, específicamente, tendones y ligamentos ^{27,46}.

Entre otras funciones de SCX durante el desarrollo embrionario se encuentra su sobreexpresión en el sindetomo, una somita derivado del esclerotomo, con la característica de expresar este factor transcripcional en sus células, el cual dará origen a los tendones ⁴⁷. Aunque la ruta de señalización que da origen al sindetomo no es del todo clara, se cree que ocurre a través de señales enviadas a través del miotomo, en el que factores de crecimiento de fibroblastos, específicamente FGF4 y FGF8, junto con el TGF β , regulan la expresión de SCX en el esclerotomo, dando lugar a la formación del sindetomo ^{36,38,46,48,49}.

El desarrollo de nuevas estrategias experimentales trajo consigo la implementación de un modelo murino de SCX knock out *in vivo*, en el que los individuos llegaban a término del desarrollo. Bajo este modelo se reportó la actividad específica de SCX en la formación de tendones. En él se observó que los individuos carentes de SCX mostraban un defecto dramático en la diferenciación de tendones, lo que dio como resultado la pérdida de los tendones intermusculares y de los tendones responsables de transmitir la fuerza músculoesquelética en las extremidades, cola y tronco ⁵⁰.

Con la generación del modelo murino knock out de SCX in vivo, surgió la posibilidad de evaluar la función de SCX en el desarrollo de tejidos y órganos distintos a los tendones y ligamentos. Tomando como base los antecedentes que sitúan a SCX como un regulador transcripcional de importancia, presente en el desarrollo de tejidos derivados de precursores mesenquimales y con gran cantidad de MEC, se investigó la posibilidad de que SCX fuera participante en la formación de las válvulas cardíacas, debido a que su desarrollo y estructura comparten similitudes con los órganos en los que se había reportado con antelación ⁵¹.

Los hallazgos reportados por esta investigación describieron que SCX participa en las etapas de remodelamiento y maduración de la valvulogénesis, expresándose en células precursoras de válvulas dentro de los cojines endocárdicos, para posteriormente expresarse de manera predominante en la remodelación de las válvulas tricúspide y mitral. El modelo evidenció que los especímenes carentes de SCX mostraban un adelgazamiento en la estructura de las válvulas cardíacas, además de diferir en la estructura general del corazón, en donde se observó una forma globular diferente de la estructura cardíaca normal característica de los especímenes control ⁵¹.

La presencia de este fenotipo sugiere que la ausencia de SCX altera los procesos de deposición de MEC y diferenciación celular, generando una disminución de la colágena tipo XIV importante para la estructura de las válvulas cardíacas, así como un incremento en la expresión de proteínas como Sox9 y marcadores mesenquimales como Snail, MSX1 y TBX20, lo cual indica una diferenciación preferencial por la vía de los condrocitos y la presencia de células indiferenciadas respectivamente ⁵¹. El uso de las tecnologías de secuenciación masiva permitió identificar el perfil transcriptómico de individuos knock out a SCX durante la formación de las válvulas cardíacas. En este perfil se identificaron diversos ácidos ribonucleicos mensajeros (mRNA [*messenger ribonucleic acid*], por sus siglas en inglés) dependientes de la función de SCX, asociados a procesos de importancia celular como regulación génica, metabolismo de vitamina A y desarrollo celular, además de sugerir una participación de SCX en la generación de modificaciones postranscripcionales ⁵².

Otros procesos que ocurren durante el desarrollo embrionario en los que se ha relacionado a SCX, son el desarrollo del sistema auditivo ^{53,54} y el desarrollo de los testículos ^{55,56}. En lo que respecta al desarrollo del sistema auditivo, se sabe que la expresión de SCX aparece justo antes del proceso de diferenciación de las células hair, las cuales funcionan como receptores sensoriales del sistema auditivo, y las células de soporte del oído interno, localizándose en el epitelio del conducto coclear y en el mesénquima ótica ⁵⁴, además de participar en la diferenciación del tendón estapedio y los tendones tensores del tímpano en el oído medio. Evidencia obtenida a partir de especímenes knock out de SCX sugiere que la falta de este factor durante el desarrollo tiene como consecuencia discapacidad auditiva ⁵³.

Por otra parte, la evidencia que asocia a SCX con el desarrollo de los testículos señala que la presencia de SCX es exclusiva de las células de Sertoli en este tejido ⁵⁷ y que su expresión se ve incrementada en el desarrollo de los testículos durante la diferenciación y proliferación de las células de Sertoli, disminuyendo con el incremento de las células germinales. En modelos *in vivo* se ha observado que los especímenes knock out de SCX presentan una reducción de tamaño en los testículos, defectos en los conductos seminíferos, así como baja espermatogénesis ⁵⁵. Otras investigaciones señalan que SCX es un gen blanco del factor transcripcional TCF21, el cual a su vez es blanco del gen SRY, encargado de la diferenciación sexual masculina. Mediante experimentación *in vitro* se logró la inversión sexual de células ováricas fetales, induciendo la diferenciación de células de Sertoli mediante la sobreexpresión de SCX ⁵⁶. Esto sugiere un papel fundamental de SCX en el desarrollo de los testículos, sin embargo, debido a los pocos trabajos sobre la función de SCX en esta línea de investigación, aún resulta arriesgado asumir una vía específica de señalización mediante la cual SCX podría actuar durante la diferenciación y determinación sexual.

4.3.2. *Scleraxis en tejido adulto*

A pesar de que gran parte de la evidencia existente sobre SCX se relaciona con la función que desempeña en el desarrollo embrionario, existen reportes que describen su participación en el mantenimiento y reparación del tejido adulto.

Entre los tejidos que se ha reportado la expresión de SCX después del desarrollo embrionario se encuentran cerebro, corazón, riñones, pulmón, testículos, músculo y tendones ^{57,58}, siendo este último el más estudiado por la estrecha asociación que se ha encontrado entre SCX y este tejido desde el desarrollo embrionario.

La función que desempeña SCX en el tendón adulto consiste principalmente en el mantenimiento y la adaptación a la carga física. Para el cumplimiento de estas funciones, SCX regula la síntesis de moléculas de MEC, las cuales resultan de gran importancia para la estructura y organización de los tendones ^{29,30}. Entre los genes de MEC que son regulados por SCX en este tejido se encuentran colágena I, la cual es regulada por SCX mediante la formación de un heterodímero con el factor E47, que se une a la región Ebox del promotor de colágena I, situada en el elemento TSE2, cuya activación resulta indispensable para la expresión de colágena ⁵⁹. Esta regulación de colágena I mediada por SCX en tendones ha sido reportada en diferentes contextos fisiológicos, uno de ellos es el proceso de adaptación a cargas físicas, ya que se ha descrito la sobre-expresión de ambas proteínas en ratones que fueron sometidos a entrenamiento físico constante diseñado específicamente para proporcionar un esfuerzo a los tendones ³⁰. Evidencia relacionada, señala que el incremento en la expresión de SCX, así como de sus genes blanco, derivado del esfuerzo físico al que son sometidos los tendones, está dirigido por la ruta de señalización del TGF β ⁴⁰. SCX es regulado mediante la ruta canónica del TGF β , específicamente mediante la proteína SMAD3, incluso se ha reportado en especímenes knock out de SMAD3 una disminución en la expresión de los genes de SCX y Colágena I, además de observarse un fenotipo deficiente en la organización de MEC en tendones ²⁹. A SCX también se le ha atribuido relevancia en la formación del tejido denominado entesis, el cual funciona como tejido conectivo entre tendones y hueso, ya que se observó que la delección de este factor en ratones, provoca una deficiencia en la estructura de este tejido, lo que lleva al deterioro de las funciones mecánicas del individuo ⁶⁰.

En tejido cardíaco SCX es un regulador fundamental para el mantenimiento de MEC, siguiendo la línea de hallazgos previamente reportados en tendones, se ha

descrito que SCX regula de manera directa la síntesis de colágena I cardíaca, además de verse incrementada su expresión en regiones ricas en miofibroblastos y colágena I resultado del proceso natural de cicatrización después un infarto ²⁸. Además, SCX regula la síntesis de proteoglicanos, particularmente los que presentan condroitin sulfato en su estructura, observándose un incremento o disminución de éstos como consecuencia de la sobreexpresión o inhibición de SCX en válvulas cardíacas respectivamente ³⁵. Bajo esa misma línea de investigación se ha reportado que SCX es un factor de importancia crítica para el mantenimiento del fenotipo de fibroblasto cardíaco, ya que regula de manera directa la transcripción de marcadores específicos de este tipo de células como α actina de músculo liso, (α SMA), vimentina (Vim) y fibronectina (Fn1), observándose una pérdida, tanto en la expresión de estos marcadores, como en la estructura y abundancia de MEC cardíaca, al igual que una disfunción en el fenotipo de los fibroblastos de corazón tras la inhibición de SCX ^{31,61}.

SCX regula la fenoconversión de fibroblastos a miofibroblastos a través del estiramiento mecánico, ya que se ha observado que una sobreexpresión de este factor causa cambios fenotípicos similares a los inducidos por el estiramiento, los cuales se ven disminuidos en especímenes carentes de SCX. Sumado a esto, la simple sobreexpresión de SCX promueve la adhesión focal e incrementa la adhesión de la células al sustrato, reduciendo la migración celular y la proliferación, lo cual resulta indicativo de la conversión a miofibroblastos ⁴².

El mecanismo mediante el cual SCX realiza las funciones antes mencionadas, es a través de la ruta canónica del TGF β , tras una interacción con la proteína SMAD3, la cual regula directamente la expresión de SCX, para después actuar de manera sinérgica con SCX en la transcripción de sus genes blanco ³³. Sin embargo, una línea de investigación difiere con este hallazgo, ya que propone un mecanismo de regulación por la vía no canónica del TGF β , sugiriendo que la proteína SMAD3 promueve la expresión de SCX de manera indirecta promoviendo a su vez la expresión de un regulador positivo para SCX, por lo que proponen que SCX es regulado por la ruta de las MAPK a través de Erk1/2 ³⁴. Esto último deja ver que, aunque el conocimiento

sobre las funciones de SCX en corazón se ha visto incrementado en fechas recientes, el mecanismo por el cual lleva a cabo estas funciones aún falta por ser dilucidado.

Sobre la función que desempeña SCX en otros órganos existe poca o nula información. Un caso es el de SCX en testículo, donde se ha reportado que se expresa en células de Sertoli maduras y es estimulado por la hormona foliculoestimulante (FSH [*follicle stimulating hormone*], por sus siglas en inglés) lo que promueve la expresión de transferrina y la proteína de unión a andrógeno (ABP [*androgen binding protein*], por sus siglas en inglés), las cuales son expresadas de manera abundante durante la pubertad, hasta la etapa adulta y se encargan de mantener la función testicular ⁵⁷.

Respecto a la función de SCX en órganos como riñones y cerebro se ha encontrado una posible asociación con patologías como nefropatía diabética⁶² y Síndrome de Down ⁶³, sin llegar a resultados concluyentes. Por su parte, a pesar de conocerse la presencia de este factor transcripcional en el pulmón ^{57,58}, no existe ningún tipo de reporte que haya explorado más a fondo la función de SCX en este órgano y su relación con las patologías que lo afectan.

4.4. Funciones patológicas de Scleraxis

Uno de los primeros trabajos en que se relacionó a SCX en procesos patológicos, fue realizado en pacientes con Síndrome de Down y Alzheimer. En este trabajo se reportó la disminución en la expresión génica de este factor transcripcional en ambas patologías ⁶³, por lo que sugirieron una función tentativa de SCX en procesos neurodegenerativos, específicamente alterando la plasticidad neuronal. Sin embargo, esto último no fue explorado con mayor detalle y la asociación entre las enfermedades mencionadas y SCX sigue sin ser esclarecida.

En patologías cuya característica es la acumulación de MEC, como es el caso de nefropatía diabética, se ha encontrado que SCX participa modulando la expresión de proteínas como α SMA y la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4), lo que genera

cambios fenotípicos en las células mesangiales bajo un contexto fisiopatológico de diabetes ⁶².

En lo que respecta a patologías cardíacas, se ha reportado la participación de SCX en dos procesos patológicos distintos: prolapso de la válvula mitral y fibrosis cardíaca. La evidencia existente que asocia SCX con la primera patología señalada, indica un incremento de esta proteína en células de la válvula mitral provenientes de pacientes con prolapso de la válvula mitral mixomatosa, por lo que se sugiere que SCX promueve un incremento en la expresión y síntesis de proteoglicanos en esta válvula cardíaca, lo cual conduce a la presencia del fenotipo característico de esta enfermedad ³⁵. Por otra parte, se ha señalado a SCX como uno de los principales efectores de la fibrosis cardíaca, quedando demostrado que la desregulación de SCX en las células cardíacas promueve los signos característicos de la patología, como son la síntesis de colágena, formación de adherencias focales y fibras de tensión, así como reducción en la migración y proliferación ^{28,31,42}.

Una línea de investigación distinta, reporta evidencia que muestra una asociación entre el incremento de SCX y el endurecimiento de las arterias, esto derivado de un incremento en los niveles de la hormona aldosterona, que lleva a la sobreexpresión de SCX, produciendo un incremento en la síntesis de colágena y una disminución en los niveles de elastina ³⁹.

Un estudio reciente demuestra que SCX contribuye en el proceso de osificación heterópica, patología cuya característica es el crecimiento de estructuras óseas. La evidencia reportada en este modelo señala que esta patología puede tener su origen a partir de células mesenquimales residentes de tendón y músculo, en las cuales existe una expresión constante de SCX bajo condiciones de trauma, y de hiperactividad del receptor de BMP ⁶⁴.

Considerando la evidencia expuesta en párrafos anteriores, es notable que SCX desempeña funciones que resultan de vital importancia para el mantenimiento de las condiciones fisiológicas, y podría ser crucial en el desarrollo de algunas patologías. Sin

embargo, el conocimiento sobre este factor aún resulta limitado a pesar de la importancia que se le ha atribuido en distintos trabajos.

Si bien la investigación sobre SCX en corazón ha evidenciado su relevancia durante el proceso fibrótico, en otros órganos como el pulmón en los cuales ocurren enfermedades de tipo fibrosante, su función y presencia han sido totalmente ignorados o no se han estudiado a profundidad.

Por tal motivo, considerando que la evidencia existente muestra que varios de los procesos que se desarrollan en la FPI son regulados por SCX en diferentes órganos, y tomando en cuenta que SCX ha sido señalado como uno de los principales reguladores de la síntesis de matriz extracelular y el proceso fibrótico, se cree que el factor transcripcional SCX podría tener una función importante en el desarrollo de la FPI y otras enfermedades fibrosantes.

5. HIPÓTESIS

El factor transcripcional Scleraxis desempeña un papel relevante activando la cascada de señalización que conduce al aumento en la síntesis de proteínas de matriz extracelular características de los procesos fibróticos como la fibrosis pulmonar idiopática.

6. OBJETIVOS

General

Evaluar la participación del factor transcripcional Scleraxis en la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática a través de su sobreexpresión en un modelo *in vitro* de fibroblastos humanos; además de explorar la posibilidad de usar este factor de transcripción como biomarcador de diagnóstico y pronóstico para la identificación temprana de signos de fibrosis pulmonar.

Particulares

- 1) Evaluar la expresión basal de SCX, así como de sus genes blanco Colágena1 α 1 (COL1A1), Colágena1 α 2 (COL1A2) y α actina de músculo liso (ACTA2) en fibroblastos pulmonares, así como el efecto de su sobreexpresión.
- 2) Determinar las diferencias en la expresión de SCX en células y tejidos provenientes de pacientes con FPI e individuos sanos.
- 3) Determinar la localización de SCX en tejido pulmonar de pacientes con FPI e individuos sanos.
- 4) Medir los niveles de SCX en suero de pacientes con FPI, Neumonitis por hipersensibilidad y esclerosis sistémica y compararlos con los de sujetos sanos.

7. METODOLOGÍA

7.1. Población de estudio

La población de estudio incluyó varones y mujeres mayores de 25 años con un diagnóstico previo de FPI (n=57) y neumonitis por hipersensibilidad (n=40) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), México. Los pacientes no mostraban sintomatología aguda de FPI, NH o alguna otra enfermedad respiratoria al momento de la toma de muestra sanguínea. El diagnóstico se realizó con base en los parámetros establecidos por *The American Thoracic Society* (ATS), *European Respiratory Society* y *The Latin America Thoracic Association* ⁶⁵.

Los pacientes con esclerosis sistémica (n=100) fueron reclutados por el departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Los pacientes fueron diagnosticados según los criterios *ACR Systemic Sclerosis* ⁶⁶.

El grupo control estuvo conformado por varones y mujeres mayores de 40 años (n=56), voluntarios, sin síntomas o signos de enfermedades respiratorias. Este proyecto de investigación fue aprobado por los comités de Bioética del INER e INCMNSZ. Todos los individuos participantes fueron informados acerca del estudio y firmaron un consentimiento para aprobar su participación. En la tabla 1 se detallan las características de cada población en estudio.

Tabla 1. Características de las poblaciones en estudio.

	<i>Control</i>	<i>FPI</i>	<i>NH</i>	<i>ES</i>
<i>Género (V/M)</i>	15/42	46/11	8/31	10/90
<i>Edad promedio (años)</i>	62 ± 7	66 ± 8	58 ± 12	45 ± 12
<i>Rango de edad</i>	41-78	38-78	30-78	26-72

7.1.1. Categorización de pacientes según su capacidad pulmonar

Con el fin de determinar si existe alguna relación importante entre los niveles circulantes de SCX y el grado de daño pulmonar de los pacientes con FPI, se categorizaron los pacientes en diferentes grupos según sus capacidades pulmonares. Para esto se midió la capacidad pulmonar total (CPT) y la capacidad vital forzada de (CVF) de cada uno de los pacientes. Los criterios de clasificación para cada prueba fueron los siguientes: para CPT se determinó que los pacientes con una capacidad inferior al 60% presentaban una disminución severa, para el grupo de pacientes en un rango de 61 a 69% se determinó que tenían una disminución moderada, mientras que los individuos con un porcentaje superior al 70% fueron clasificados con una capacidad aceptable.

Para el caso de CVF, los pacientes se categorizaron en solo dos grupos tomando como referencia si presentaban una capacidad superior o inferior al 80%.

7.2. Toma de muestras sanguíneas

Las muestras sanguíneas de pacientes de FPI o NH fueron colectadas en tubos separadores de suero de la marca BD al momento de realizar el diagnóstico. Las muestras de pacientes con ES se obtuvieron en diferentes etapas de la enfermedad. El suero fue separado por centrifugación a 2000g x 10 minutos. Posteriormente las muestras fueron alicuotadas y debidamente etiquetadas. Se almacenaron a -80°C hasta su uso.

7.3. Cuantificación de SCX en suero

La concentración de SCX en suero se determinó mediante un ensayo de ELISA específico para la proteína Scleraxis Homólogo A humana (SCXA) (Cloud-Clone Corp SEN 330Hu). Se utilizaron 100 µl de suero por duplicado para la cuantificación, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras y reactivos fueron colocados en una microplaca previamente revestida con un anticuerpo específico para SCXA conjugado con biotina. Posteriormente, se incubaron con peroxidasa de rábano picante (HRP, [*horseradish peroxidase*], por sus siglas en inglés) conjugada con avidina, para posteriormente adicionar tetrametilbenzidina (TMB) como sustrato. Sólo los pozos que contenían SCXA unido al anticuerpo conjugado exhibieron un cambio de color. La reacción enzimática se terminó con una solución de ácido sulfúrico incluida en el estuche y el cambio de color fue medido con un lector de placas de ELISA (Synergy HT, Biotek) a una longitud de onda de 450 nm. La concentración de SCXA en las muestras se determinó comparando sus densidades ópticas con la curva estándar.

7.4. Plásmidos utilizados

Los plásmidos usados para llevar a cabo la sobreexpresión de SCX fueron los siguientes:

- HA-SCX:pECE-FLAG que contiene la secuencia codificante de SCX murina (Figura 4a). Este plásmido fue donado por el grupo de trabajo del Dr. Michael Czubyrt de la universidad de Manitoba, Canadá. Cabe mencionar que la secuencia de este plásmido corresponde al gen de ratón, sin embargo, este gen es ampliamente conservado entre especies y presenta una homología del 89% entre humano y ratón, con ligeros cambios en la secuencia de la proteína que no modifican las estructuras principales de SCX.
- pAdenoX-PRLS-DsRedExpress (632265 Clontech). Este plásmido contiene la secuencia del genoma adenoviral para la producción de partículas adenovirales (Figura 4b).

7.5. *Sub-clonación de SCX*

Se utilizó el plásmido HA-SCX:pECE-FLAG para obtener la secuencia de SCX. Se diseñó un par de primers que flanquearan la secuencia por completo, incluyendo el promotor. La secuencia de los primers utilizados es la siguiente:

GTAACTATAACGGTCGCTGTGGAATGTGTGTCAGT – Forward

ATTACCTCTTTCTCCGGATCCAGACATGATAAGCA – Reverse

Se amplificó la secuencia de SCX mediante PCR de punto final. El producto fue separado en un gel de agarosa al 1.3% por electroforesis durante 60 minutos a 100 volts. La banda observada fue purificada utilizando el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Clontech Cat. 740410.10). El fragmento purificado fue subsecuentemente insertado en el plásmido pAdenoX-PRLS-DsRedExpress utilizando el estuche comercial In-Fusion HD Cloning (Clontech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción de ligación se llevó a cabo a 50°C por 15 minutos. Pasado ese tiempo el producto de la reacción fue almacenado a -20°C hasta su uso.

Para la clonación se utilizaron 1.5 µl de la reacción de ligación en células Stellar Competent Cells (Cat. 636763) mediante transformación por choque térmico. Las células con el producto de la ligación fueron incubadas en hielo durante 30 minutos para posteriormente incubarlas durante 45 segundos a una temperatura de 42°C. Pasado este tiempo se añadió 1 ml de medio LB a las células que se incubaron durante 3 horas a 37°C con agitación constante. Terminada la incubación se sembraron 100 µl del medio con células en placas de agar LB suplementadas con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml. El medio restante fue centrifugado a 6000 g x 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el botón obtenido se sembró en placas de agar LB con ampicilina. Las placas se dejaron en incubación a 37°C durante toda la noche esperando se diera el crecimiento de colonias.

Las colonias observadas fueron picadas con palillos esterilizados y aisladas para determinar si contaban con la secuencia de SCX. Para este fin se realizó una PCR utilizando los primers diseñados para la clonación. Por otro lado, el plásmido dentro de las colonias fue purificado y digerido con la enzima XhoI Fastdigest (Thermo

FD0695). La reacción de digestión se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos. Tanto el producto de la PCR como el de la digestión fue separado en geles de agarosa al 1.3% por electroforesis durante 90 minutos a 90 volts. El patrón de restricción obtenido fue comparado con el que marca el fabricante para determinar si el plásmido clonado corresponde al de interés.

7.6. Purificación de plásmido

Para la purificación del plásmido se generó un cultivo de 500 ml de medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/ml en el que se sembraron las bacterias que clonaron de manera exitosa el plásmido con SCX. Este cultivo se dejó en incubación a 37°C toda la noche con agitación constante. Transcurrido ese tiempo el cultivo fue centrifugado a 6000g x 15 minutos a 4°C. A partir del botón de células obtenido se purificó el plásmido utilizando el kit QIAGEN Plasmid Midi kit (Cat. 12143) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. El producto purificado fue nuevamente suspendido en buffer TE 1X y cuantificado. Posteriormente fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

7.7. Generación de partículas virales

Para la generación de partículas virales se utilizaron células empaquetadoras de la línea celular AdenoX293. Estas células fueron sembradas en una densidad de cien mil células por cm² para su posterior transfección.

El plásmido purificado fue digerido con la enzima PacI Fastdigest (Thermo FD2204) durante 2 horas a 37°C. Pasado ese tiempo el producto de la digestión fue purificado con fenol cloroformo para su posterior transfección.

La transfección del plásmido a las células AdenoX293 fue por medio de fosfato de calcio utilizando el kit CalPhos Mammalian Transfection Kit (Cat. No. 631312). Se transfectaron 5 µg del plásmido digerido para cada reacción de transfección. Se utilizó como control el plásmido vacío sin la secuencia de SCX. Las células permanecieron en

incubación a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de dióxido de carbono durante 48 horas después de la transfección. Pasado ese tiempo se les cambió el medio por medio DMEM suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB). Las células se mantuvieron en monitoreo constante para observar el efecto citopático generado por las partículas virales. Cuando dicho efecto fue evidente en el cultivo las células fueron cosechadas para la purificación del adenovirus.

7.8. Purificación de partículas virales

Tras la infección y cosecha de las células, estas fueron lisadas por medio de ciclos de congelamiento y descongelamiento. El botón de células obtenido fue nuevamente suspendido en 500 µl de PBS estéril. Posteriormente las células fueron congeladas mediante un baño de hielo seco/etanol. Una vez congeladas las células fueron incubadas a 37°C hasta el deshielo. Es importante no permitir que las células alcancen la temperatura de 37°C. Este ciclo de congelamiento se repitió 3 veces. Terminado el lisado, la suspensión fue centrifugada a 1500g x 10 minutos para remover los restos celulares. La suspensión viral fue tratada posteriormente con la finalidad de incrementar su pureza. Para esto se utilizó el kit Adeno-X Maxi Purification Kit (631533 Clontech) siguiendo las instrucciones establecidas por el fabricante. El producto purificado fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

7.9. Titulación de partículas virales

Los adenovirus generados fueron titulados para determinar la cantidad de partículas existentes en los cultivos. Para la titulación se siguió el protocolo incluido en el producto Adeno-X Rapid Titer Kit (632250 Clontech). Se sembraron células AdenoX293 a una densidad de 2.5×10^6 células en placas de 24 pozos con medio DMEM. Se tomaron 10 µl de la solución purificada de partículas virales para diluirla en 990 µl de PBS estéril. Esta dilución se tomó como base para generar diluciones seriadas, desde 10^{-2} , hasta 10^{-6} . Las células sembradas fueron infectadas por triplicado con estas diluciones colocando 100 µl de la dilución por cada ml de medio de cultivo.

Las células infectadas se incubaron por 48 horas 37°C en 5% CO₂. Pasado este tiempo las células fueron fijadas con metanol frío al 100%, incubándolas a -20°C por 10 minutos. Una vez fijadas las células fueron incubadas con el anticuerpo primario Mouse Anti-Hexon Antibody (1:1000 en PBS + 1% BSA) durante 60 minutos a 37°C. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario Rat Anti-Mouse Antibody conjugado con HRP (1:500 en PBS + 1% BSA) durante 60 minutos a 37°C. La reacción fue revelada utilizando Diaminobencidina (DAB) como sustrato, ésta se dejó incubando 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se contaron las células marcadas en cada pozo y se calculó el título viral utilizando la siguiente formula:

$$\frac{(Células infectadas por pozo)}{Volumen del virus (ml) \times (Factor de dilución)}$$

Una vez calculado el título viral, las soluciones virales fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

7.10. *Cultivo celular*

Los cultivos primarios de fibroblastos humanos fueron obtenidos del banco de células perteneciente al laboratorio de biología celular del INER. Los fibroblastos de pacientes con FPI fueron obtenidos bajo consentimiento informado a partir de biopsias realizadas por indicación médica en la clínica de enfermedades intersticiales del instituto. Los cultivos de fibroblastos de individuos sanos fueron obtenidos a partir de tejidos provenientes de donadores cadavéricos en la escuela de medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y fueron una donación del Dr. Luis Vázquez de Lara.

Para la obtención de células a partir de las biopsias fue necesario disgregar el tejido con tijeras quirúrgicas, posteriormente se incubó con 1 ml de tripsina a 37°C manteniendo una agitación constante. Transcurrido ese tiempo, se inactivó la tripsina con 3 ml de medio Ham-F12 con 10% SFB y se filtró a través de una gasa estéril. El producto filtrado fue centrifugado a 650g x 10 minutos.

El botón de células obtenido se sembró en placas de 12 pozos con 2 ml de medio Ham-F12 suplementado con 10% SFB, penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100µg/ml). Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de dióxido de carbono. La línea celular denominada NOVA se obtuvo de un individuo sano, mientras que las obtenidas de pacientes con FPI recibieron el prefijo HIPF más su número de registro, quedando las líneas HIPF231, HIPF375, HIPF397, HIPF286, HIPF 304 y HIPF 339. Las líneas celulares de fibroblastos normales CCD25Lu y CCD8Lu fueron adquiridas en *American Type Culture Collection* (ATCC). Estas células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado de la misma forma que el medio Ham-F12. Todos los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de dióxido de carbono. Las células AdenoX293 fueron adquiridas de Clontech (Cat. 632271) y fueron sembradas utilizando medio DMEM suplementado con 10% de SFB.

7.11. *Infección y tratamiento de células en cultivo*

Para cada experimento realizado se sembraron los fibroblastos pulmonares a una densidad de 3×10^5 por pozo en placas de 6 pozos. Se infectaron estas células con una multiplicidad de infección (M.O.I.) de 100. Las partículas virales correspondientes fueron diluidas en medio de cultivo (DMEM o Ham-F12) sin suero. Después de su infección las células fueron incubadas el tiempo necesario, de acuerdo con el protocolo a seguir.

Para el estímulo de TGFβ, se diluyó este factor de crecimiento en el medio de cultivo correspondiente (DMEM, Ham-F12 10% SFB) a una concentración de 5ng/ml. Este medio fue añadido a las células, para después ser puestas en incubación durante 48 horas. Pasado ese tiempo las células fueron lisadas ya sea para PCR o Western Blot. Es importante señalar que para los experimentos que involucraron ambos tratamientos, las células fueron sometidas primero a la infección y transcurrido el tiempo marcado se estimularon con TGFβ. Nunca se realizaron al mismo tiempo.

7.12. *PCR en tiempo real (qPCR)*

El ácido ribonucleico (RNA [*ribonucleic acid*], por sus siglas en inglés) total de los tejidos y células en cultivos fue extraído utilizando el reactivo de TRIzol™ (Invitrogen Life Technologies) siguiendo el protocolo marcado por el fabricante. Como RNA control se adquirieron dos RNAs de individuos sanos (Ambion AM7968, Origene HT1009) con la finalidad de utilizarlos como punto de comparación para los RNA provenientes de tejidos de pacientes con FPI.

Las muestras de RNA fueron sometidas a una reacción de transcriptasa reversa (RT) para la obtención de cDNA. El kit utilizado para esta técnica fue RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific), se utilizaron de 250 a 500 ng de cada muestra para la reacción, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de qPCR fueron llevadas a cabo en el equipo LightCycler® 480 System (Roche) utilizando sondas TaqMan (Thermo Scientific) para SCX (Hs03054634_g1) COL1A1 (Hs00164004_m1), COL1A2 (Hs01028970_m1), ACTA2 (Hs00426835_g1) y TCF3 (Hs01012685_m1), todas estas sondas tienen FAM como fluoróforo. Como controles de expresión endógena utilizamos las sondas de GAPDH (Hs02786624_g1) y HPRT (Hs0280069S_m1), estas dos fueron adquiridas con marcaje VIC como fluoróforo.

7.13. *Western Blot*

Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos a una densidad de 70%, 24 horas antes de lisar con 70 µl de buffer RIPA (Sigma Aldrich) adicionado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Calbiochem, Set V) y PMSF. Los lisados celulares fueron incubados en RIPA durante 60 minutos en hielo, posteriormente fueron sonicados durante 3 ciclos de 10 segundos, con una espera en hielo de 2 minutos entre cada ciclo. Tras la sonicación los lisados fueron centrifugados con el fin de remover los restos celulares a una velocidad de 20000 g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recolectado en un tubo estéril. La concentración de proteína fue cuantificada mediante el método colorimétrico de Bradford. Se separaron mediante

electroforesis 40µg de los extractos de proteína en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%.

La electroforesis transcurrió durante 120 minutos a una potencia de 120 volts. Posteriormente las muestras fueron electrotransferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Bio-Rad) en cámara húmeda a 100 volts por 60 minutos. Los sitios inespecíficos se bloquearon con leche libre de grasa al 5% en TBS-Tween 0.05% durante 60 minutos a temperatura ambiente. Tras el bloqueo la membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-SCX (1:600; Thermo Scientific PA5-23943) o anti-β-actina (1:200; Santa Cruz Biotechnology Inc. Sc-47778) durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Transcurrida la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas 4 veces con TBS-Tween 0.05%, cada lavado fue de 10 minutos. Tras los lavados se incubó la membrana con anticuerpo secundario acoplado a HRP (anti-ratón y anti-conejo IgG; Invitrogen Life Technologies) por una hora a temperatura ambiente. La señal fue detectada por quimioluminiscencia utilizando el substrato Super Signal West Pico Enhanced Chemiluminescence detection system (Thermo Scientific). Todas las membranas fueron sometidas a densitometría utilizando el software ImageLab v6.1(BioRad Hércules, California, EUA). Las muestras fueron normalizadas contra β-actina.

7.14. *Inmunohistoquímica (IHC)*

Se evaluó la localización de SCX en tejido pulmonar obtenido de individuos sanos (n=3) y pacientes con FPI (n=3). El análisis de Inmunohistoquímica se realizó como se ha reportado anteriormente ⁶⁷. Las muestras de tejido fueron fijadas con formol amortiguado y colocadas en bloques de parafina. Se realizaron cortes de 3 µm de grosor que fueron montados en laminillas silanizadas. Los cortes se desparafinaron en xilol por 30 minutos y después fueron rehidratados con etanol al 100%, 90%, 50% y agua durante 5 minutos cada uno. Posteriormente los tejidos fueron incubados con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 30 minutos. Posteriormente se realizó la recuperación de antígenos con buffer de citratos seguido de bloqueo de los sitios inespecíficos con suero normal de cabra al 2% en PBS. Los tejidos permanecieron en

incubación con el anticuerpo primario “anti-human SCX rabbit polyclonal antibody” (1:25; Antibodies online ABIN9670006) durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Transcurrido ese tiempo las laminillas fueron lavadas con PBS 0.1% Tween 2.0.

Tras el lavado los tejidos fueron incubados con un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina acoplado a biotina, seguido de estreptavidina conjugada con HRP (DAKO LSAB®2 System-HRP, Dako North America, Inc. K0609). Como sustrato se utilizó 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (BioGenex, HK129-5K). Los cortes histológicos fueron contrateñidos utilizando hematoxilina y montadas utilizando medio de montaje. El anticuerpo primario fue reemplazado por suero normal de cabra para los controles negativos. Las laminillas fueron observadas utilizando un microscopio Nikon.

7.15. Análisis estadístico

Los resultados son presentados como promedio \pm desviación estándar (DE). Todos los experimentos fueron realizados por duplicado al menos tres veces. Las diferencias estadísticas fueron calculadas utilizando un ANOVA de una vía con comparación de Tukey. Valores de <0.05 fueron considerados estadísticamente significativas. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico GraphPad 5.0 para Windows.

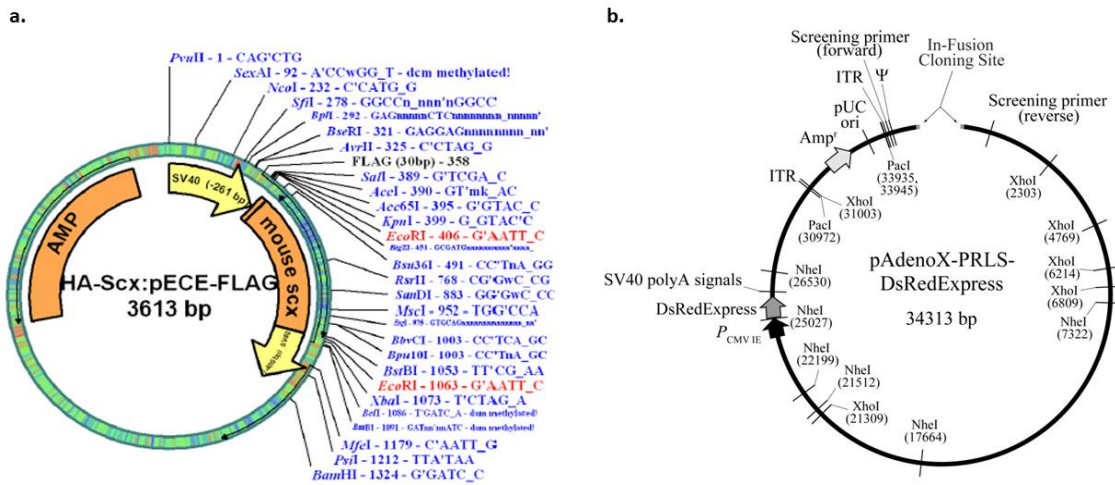


Figura 4. Esquema de los plásmidos utilizados para el proceso de clonación. a) Plásmido HA-SCX:pECE-FLAG contiene la secuencia codificante de SCX murina. Este plásmido fue donado por el grupo de trabajo del Dr. Michael Czubryt de la universidad de Manitoba, Canadá. b) Plásmido pAdenoX-PRLS-DsRedExpress. Este plásmido contiene la secuencia del genoma adenoviral para la producción de partículas adenovirales.

8. RESULTADOS

8.1. El aumento en la expresión de SCX se relaciona con mayor expresión de los genes de MEC en fibroblastos pulmonares

Para determinar si existe una posible relación entre la expresión de SCX y la regulación de diferentes genes de MEC en células pulmonares, se midieron mediante qPCR, los niveles de expresión basal de SCX en las líneas celulares de fibroblastos pulmonares CCD25Lu y CCD8Lu, así como la expresión de los genes COL1A1, COL1A2, ACTA2. Para corroborar que los niveles de proteína SCX correspondieran con los niveles de RNA mensajero se evaluó la presencia de la proteína por medio de Western Blot en las dos líneas celulares.

La expresión de SCX a nivel mensajero mostró una mayor expresión en las células CCD8Lu (1.023 ± 0.08195 , n=9, 2.445 ± 0.1813 , n=9 para CCD25Lu y CCD8Lu respectivamente), lo cual correlaciona con la apreciación de niveles de proteína mayores (Figura 5a). Al evaluar la expresión de los genes de MEC, COL1A1 (1.01 ± 0.05057 , n=9, 2.381 ± 0.2854 , n=9), COL1A2 (1.011 ± 0.05285 , n=9, 2.175 ± 0.1837 , n=9) y ACTA2 (1.007 ± 0.0433 , n=9, 11.01 ± 1.567 , n=9) se observó que, de manera similar a lo que ocurre con SCX, la expresión de estos genes es mayor en las células CCD8Lu al ser comparadas con los de las células CCD25Lu (Figura 5b-d). Estos datos sugieren una posible relación entre la expresión de SCX y la expresión de los genes de MEC, lo cual coincide con lo reportado en diferentes órganos: SCX regula la expresión de los genes de MEC, principalmente colágena ^{28,29,33,37,50}.

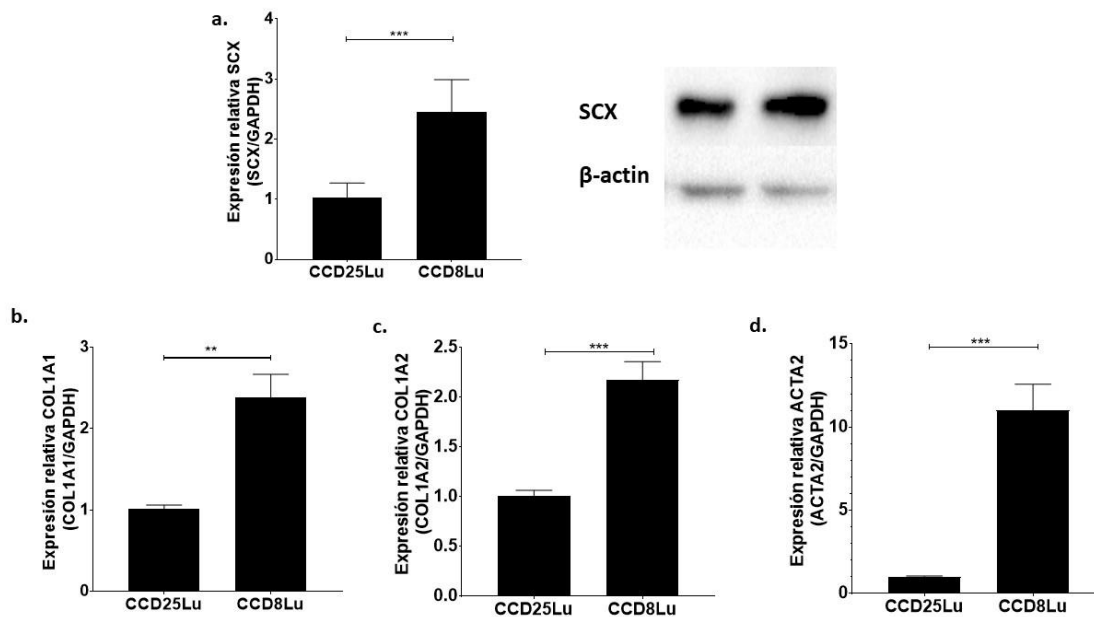


Figura 5. Expresión de SCX en fibroblastos pulmonares correlaciona con la expresión de genes de MEC. Se midió la expresión de SCX (a) en fibroblastos pulmonares CCD25Lu y CCD8Lu, se observa que esta última presenta una mayor expresión de este factor. Esto se relaciona con la expresión de los genes de MEC COL1A1 (b), COL1A2 (c), ACTA2 (d), donde igualmente se observa una mayor expresión de estos genes. **= $p < 0.01$ and ***= $p < 0.001$.

Con el propósito de evaluar si las células provenientes de pacientes presentaban una mayor expresión de estos genes al ser comparados con células de individuos sanos y tras observar una posible asociación entre la expresión de SCX y la de los genes de MEC en las líneas celulares de fibroblastos pulmonares, se decidió realizar la misma evaluación en líneas celulares primarias de fibroblastos provenientes de pacientes con FPI (HIPF 231, 375 y 397) e individuo sano (Nova).

El análisis de los datos obtenidos mostró que la expresión de SCX entre las líneas es variable, sin embargo, todas las líneas provenientes de pacientes de FPI presentaron una mayor expresión de SCX en comparación con la línea control (Figura 6 a, Tabla 2). De manera similar a la expresión de SCX, los genes de MEC mostraron variabilidad en su expresión entre las líneas de FPI, pero en todos los casos se mostró un incremento cuando la expresión fue comparada con la línea celular control (Figura 6b-d, Tabla 2).

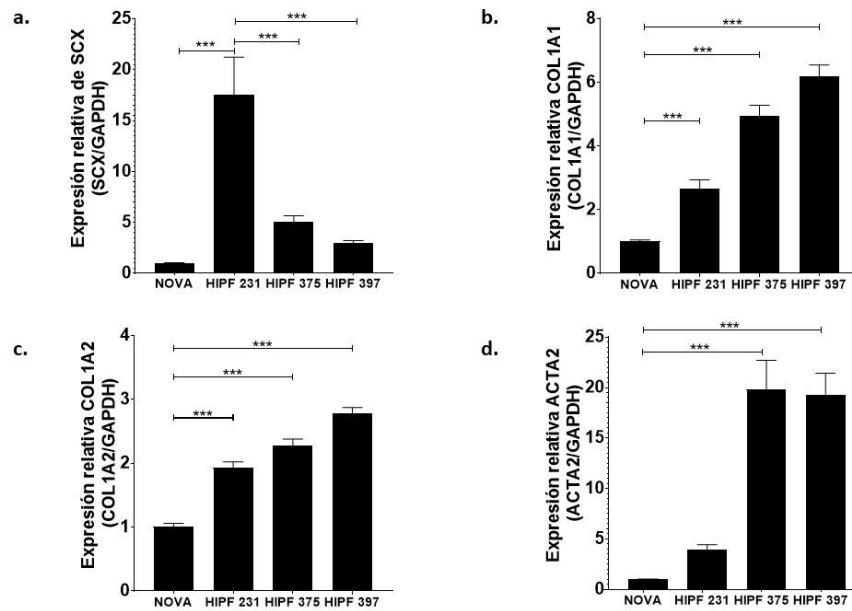


Figura 6. La expresión de SCX y sus genes blancos es mayor en fibroblastos provenientes de pacientes con FPI. a) La expresión de SCX está incrementada en las células de pacientes con FPI (HIPF 231, 376, 397) en comparación con células normales (NOVA). Aunque se presentó variabilidad en la expresión COL1A1 (b), COL1A2 (c) y ACTA2 (d), esta se encuentra incrementada en comparación con las células control. ***= $p < 0.001$.

Tabla 2. Expresión de SCX y sus genes blancos en cultivos de fibroblastos primarios.

	<i>Control</i>	<i>HIPF 231</i>	<i>HIPF 376</i>	<i>HIPF 397</i>
<i>Scleraxis</i>	1.008±0.0463	17.57±3.662	5.028±0.6391	2.956±0.2641
<i>COL1A1</i>	1.008±0.0443	2.676±0.263	4.962±0.322	6.185±0.3646
<i>COL1A2</i>	1.01±0.051	1.93±0.091	2.273±0.106	2.789±0.083
<i>ACTA2</i>	1.004±0.032	3,926±0.506	19.8±2.904	19.32±2.116

El conjunto de estos datos nos indica que SCX se comporta de manera similar a lo reportado en otros modelos experimentales, donde SCX tiene como blanco a genes de MEC, regulándolos de manera directa e incrementando su expresión; pero además podemos determinar que las células pulmonares de pacientes con FPI muestran una mayor expresión de SCX, así como un correspondiente incremento de los genes blanco característicos de dicha enfermedad. Esto sugiere que SCX se encuentra expresado en mayor medida en las células pulmonares de pacientes con FPI y que dicha

sobreexpresión puede ser resultado de la participación de este factor en la patogénesis de la FPI.

8.2. La expresión de SCX se incrementa en el tejido pulmonar de pacientes con FPI

Para evaluar si existen diferencias en la expresión de SCX entre los pacientes con FPI e individuos sanos, se procedió a medir este factor transcripcional en tejido pulmonar obtenido mediante biopsia de pacientes con FPI. Como controles se utilizaron mRNA comerciales provenientes de pulmón sano.

La expresión de SCX a nivel mensajero mostró una diferencia significativa al comparar los datos de pacientes con el grupo control, observándose que el grupo de pacientes de FPI muestra una mayor expresión de SCX (Figura 7a). Dicho resultado correlaciona con lo observado en los cultivos celulares.

Para determinar la localización de SCX dentro del tejido pulmonar se procedió a realizar inmunohistoquímica en tejido pulmonar. Para este fin se utilizaron tejidos de dos individuos sanos (573-11 860-05) y tres pacientes de FPI (425-05, 428-16, 442-16).

El análisis de las inmunohistoquímicas mostró que existe una diferencia en la localización de SCX entre pacientes y controles. Mientras en los individuos sanos SCX se encuentra presente en epitelio bronquiolar (Figura 7b), en los pacientes con FPI se puede encontrar la presencia de esta molécula en los espacios alveolares que han sido sustituidos por focos de fibroblastos y células mesenquimales. En concordancia con este hallazgo, la presencia de SCX fue notoria en células inflamatorias y musculares que conforman el tejido pulmonar (Figura 7b).

Por otra parte, se pudieron observar diferencias en la composición del tejido entre los individuos sanos y los pacientes con FPI, principalmente a nivel de los espacios alveolares que son reemplazados por MEC y fibroblasto. Tomando en cuenta esto último, podemos asumir que la expresión de SCX en los tejidos de pacientes con FPI se ve incrementada debido a la acumulación de células mesenquimales en los

espacios alveolares, con lo cual, al relacionarlo con los diferentes niveles de expresión que muestran los fibroblastos de pacientes con FPI, podemos asumir que SCX es un factor transcripcional que se encuentra en el tejido pulmonar de manera basal y que durante la patogénesis de la FPI éste se ve incrementado en el tejido por el reclutamiento de células mesenquimales en los espacios alveolares, lo que nos lleva a sugerir que es posible que la presencia de este factor pueda ser utilizada como un marcador del grado de fibrosis en los pacientes.

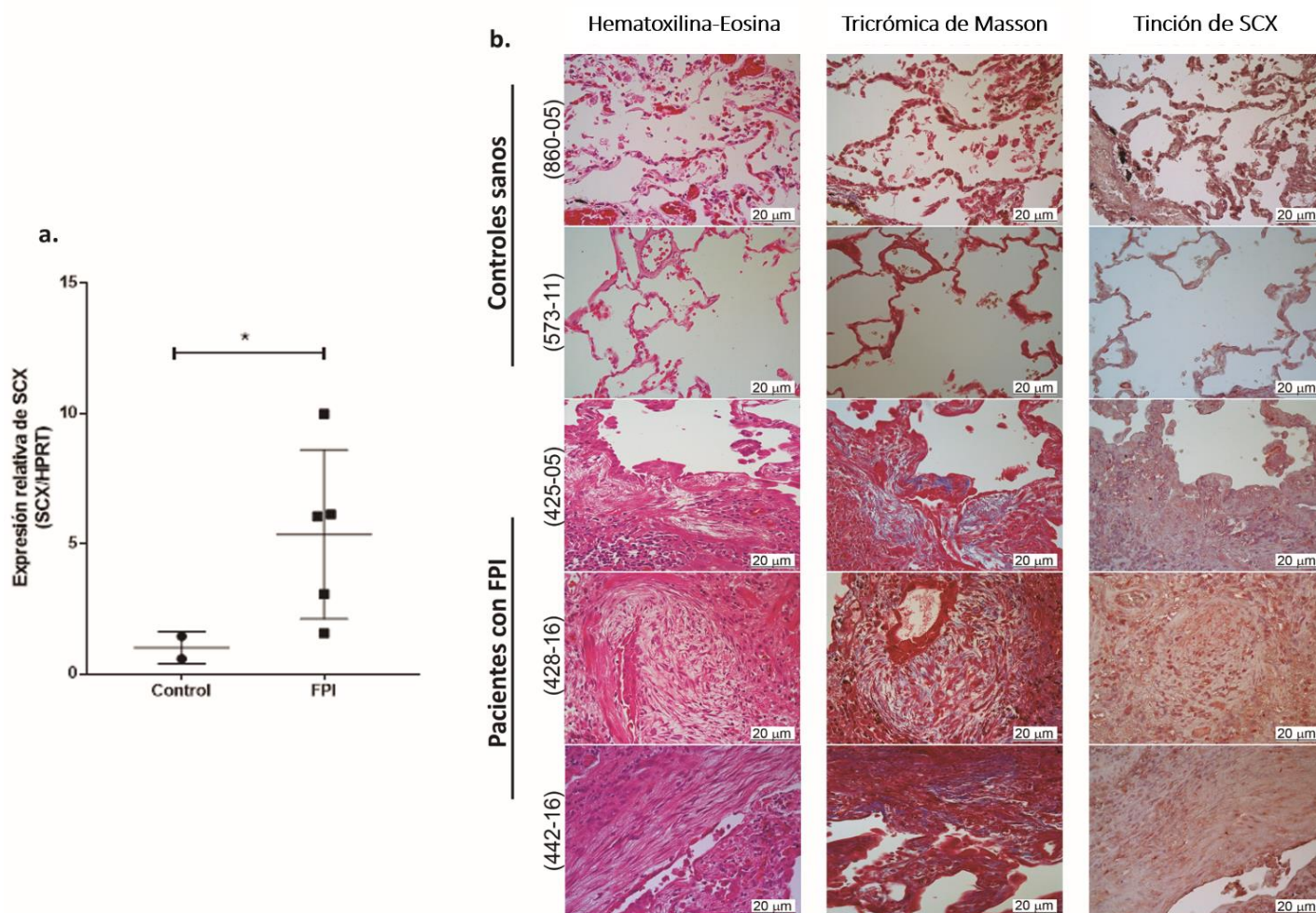


Figura 7. Expresión de SCX se encuentra elevada en tejidos pulmonares provenientes de pacientes con FPI. a) El tejido pulmonar derivado de pacientes con FPI mostró una alta expresión de SCX a nivel mensajero en comparación con los tejidos control. b) El análisis de inmunohistoquímica muestra una mayor presencia de SCX en los tejidos de FPI. Las muestras fueron sometidas a las tinciones de hematoxilina eosina y tricrómica de Masson con el fin de determinar el tipo de células positivas a SCX. Se realizaron controles negativos para cada tinción en lo cuales no se observa señal, imágenes no mostradas.

8.3. SCX aumenta en suero de pacientes con FPI comparado con individuos sanos

Con el fin de determinar si la detección en suero podría ser útil como un posible biomarcador de la FPI y tras observar que la expresión de SCX está incrementada tanto en células como en tejido de pacientes con FPI, se evaluaron los niveles circulantes de este factor transcripcional utilizando para ello muestras de suero.

Para la detección de SCX en suero se utilizó un ELISA anti-SCX. Nuestros resultados demostraron que existe un incremento de SCX circulante en los pacientes con FPI (0.663 ± 0.559 ng/mL, $p < 0.001$), así como en los pacientes con esclerosis (0.611 ± 0.296 ng/mL, $p < 0.001$) comparando con los niveles encontrados en el grupo control (0.351 ± 0.207 ng/mL) (Figura 8). En lo que respecta a NH (0.323 ± 0.323 ng/mL), no se encontró diferencia significativa al ser comparada con el grupo control, sin embargo, sí se observa una disminución significativa cuando se compara con FPI y esclerosis sistémica. No se encontraron diferencias en los niveles de SCX entre FPI y esclerosis.

Estos resultados nos indican que SCX presenta mayores niveles circulantes en enfermedades de tipo fibrosante como la FPI y la esclerosis sistémica. La causa por la que los datos de NH difieren con las patologías anteriores, podría ser el origen inflamatorio de esta, sugiriendo que SCX no participa en el proceso inflamatorio y su presencia está relacionada con el desarrollo del proceso fibrótico.

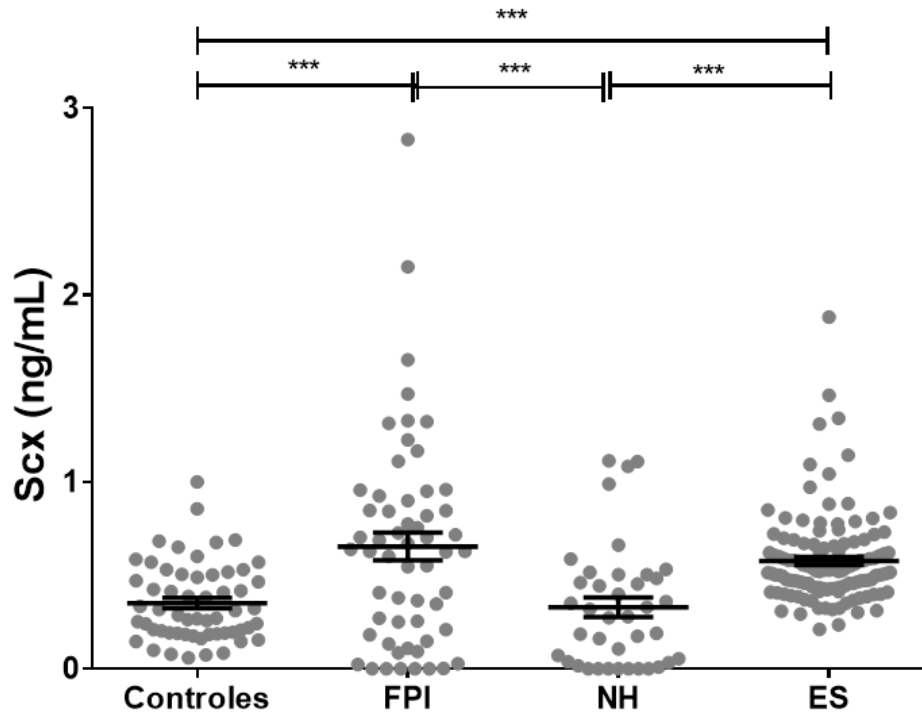


Figura 8. Concentración circulante de SCX es mayor en pacientes de FPI y ES en comparación con los controles. Se observó una diferencia significativa en la concentración de SCX en los pacientes con enfermedades fibróticas. De manera interesante la concentración en NH no mostró diferencia al ser comparada con la de los individuos control, sin embargo, es significativamente menor a la encontrada en los pacientes con FPI. ***= $p < 0.001$.

La correlación entre los niveles circulantes de SCX y la capacidad pulmonar de los pacientes, mostró que hay una diferencia significativa entre el grupo control (0.4037 ± 0.03287 ng/mL) y los individuos que presentan CPT $< 60\%$ (0.9928 ± 0.1498 ng/mL) y CVF $< 80\%$ (0.7618 ± 0.1207 ng/mL) (Figura 9). Esto nos indica que, de los pacientes con FPI, los que presentan un mayor nivel de SCX circulante son aquellos cuyas capacidades pulmonares se han visto muy reducidas. Esto puede ser indicativo de un grado avanzado de fibrosis. Lo que nos lleva a especular que los niveles de SCX se van incrementado en suero a medida que la fibrosis avanza, encontrando sus mayores niveles en las etapas más desarrolladas de la enfermedad. Con estos resultados podemos sugerir que existe una asociación entre SCX y el deterioro de la capacidad pulmonar característico de los pacientes con FPI.

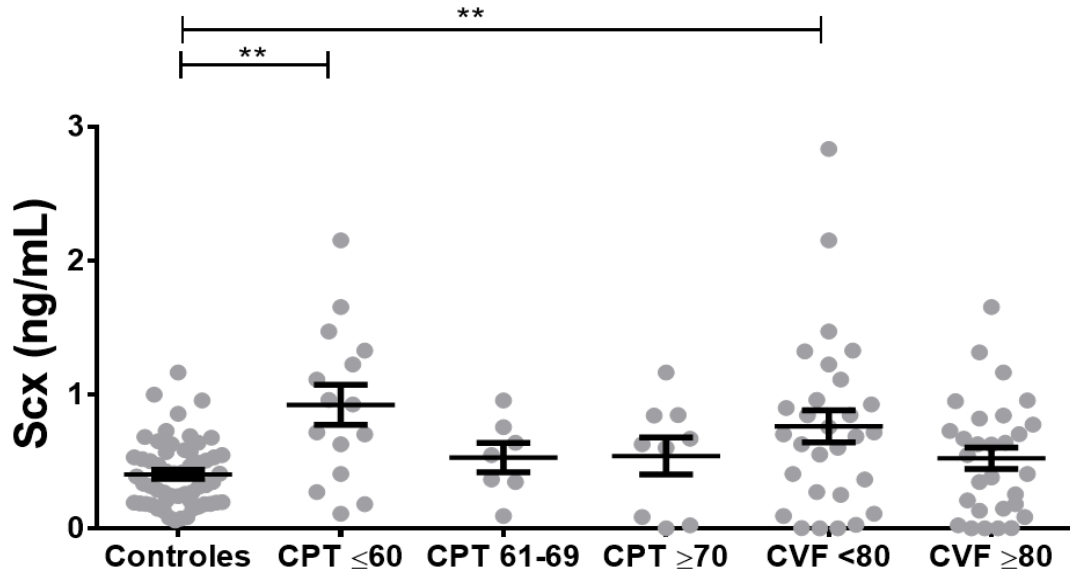


Figura 9. Los pacientes con afecciones en su función pulmonar muestra mayores concentraciones de SCX. Se encontró una mayor concentración de SCX en los pacientes que presentaban una afección severa de su CPT ($\leq 60\%$) y una CVF menor al 80%. **= $p < 0.01$. Capacidad pulmonar total (CPT): Volumen máximo de aire presente en los pulmones. Una persona sana puede inhalar aproximadamente 6 litros. Capacidad Vital Forzada (CVF): Volumen de aire que puede ser exhalado de manera forzada después de una inspiración. Los valores normales oscilan entre los 4.6 litros ⁶⁸.

El análisis de estos resultados nos permite afirmar que la expresión de SCX en células pulmonares está asociada con la expresión de genes de MEC como colágena y alfa actina de músculo liso. Al ser evaluada en pacientes con FPI, se observó que las células de estos pacientes presentan una mayor expresión de SCX con su respectivo incremento en la expresión de genes de MEC en comparación con células de individuos sanos.

De manera similar se encontró que el tejido pulmonar de los pacientes con FPI presentan una mayor expresión de SCX al ser comparado con individuos sanos y que este incremento se debe al reclutamiento de fibroblastos y diferentes precursores de células mesenquimales en los espacios alveolares, lo que nos sugiere que el incremento en la expresión de SCX en tejido puede ser indicador de una etapa avanzada de fibrosis. Finalmente, al medir los niveles circulantes de SCX en pacientes con FPI se observó que éstos se ven incrementados en comparación con los niveles de

individuos sanos y de pacientes de otras enfermedades pulmonares como NH, además de observar que el incremento de SCX es mayor precisamente en los pacientes que muestran menor capacidad pulmonar.

Tomando en cuenta que SCX es un factor transcripcional de fácil detección, asociado con enfermedades fibróticas y que presenta una posible asociación con las etapas más avanzadas de FPI, se puede sugerir que SCX es una molécula candidata para ser utilizada como biomarcador auxiliar en la determinación del grado de severidad de la FPI.

8.4. Sobre expresión de SCX en fibroblastos pulmonares mediante vectores adenovirales

Utilizando los vectores adenovirales generados se procedió a sobre expresar SCX en cultivos celulares de fibroblastos pulmonares. Inicialmente se infectaron células CCD25Lu con una M.O.I. 100 durante 24 y 48 horas, con el fin de establecer el momento en el que hay un pico en la sobre expresión de SCX.

La expresión se midió a nivel mensajero, así como de proteína. Se observó un incremento en la expresión del gen a partir de las 24 horas postinfección (130.522 ± 7.278) que aumenta aún más a las 48 horas (1002.75 ± 113.51) (Figura 10a). Sin embargo, los niveles de proteína no mostraron el mismo comportamiento, razón por la cual decidimos usar 48 horas como el estándar de infección para experimentos subsecuentes.

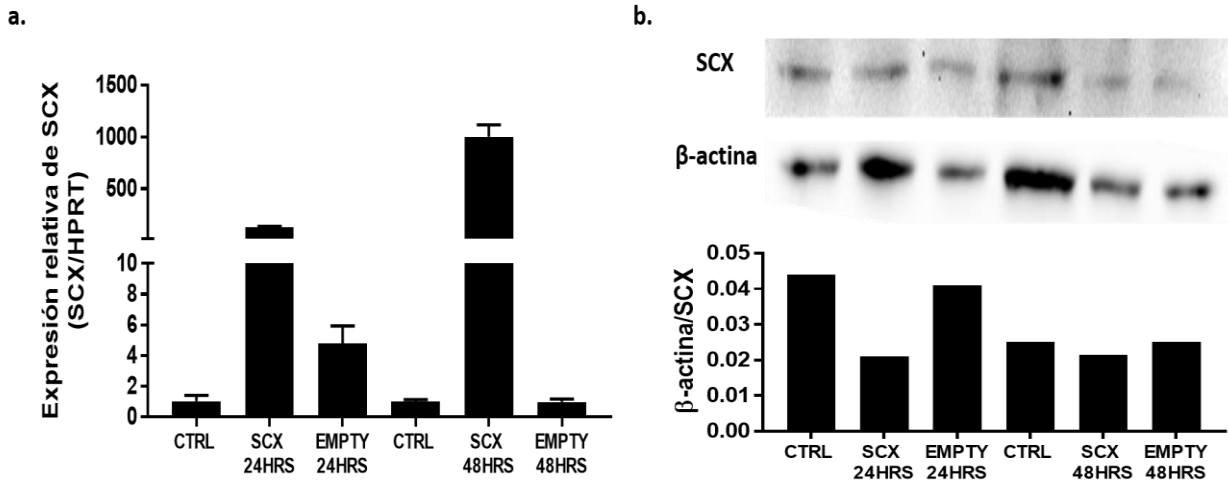


Figura 10. La sobreexpresión de SCX se manifiesta en mayor proporción 48 horas posinfección en células CCD25Lu. a) Expresión de SCX en células CCD25Lu infectadas con el vector adenoviral de SCX a una M.O.I. de 100 24 y 48 horas después de la infección. Se observa una mayor sobreexpresión a las 48 horas. Contrario a lo observado a nivel mensajero los niveles de proteína SCX no se vieron incrementados (b).

8.5. La sobre expresión de SCX no causa un incremento significativo de COL1A2 en fibroblastos pulmonares

Para determinar si únicamente la expresión de SCX en fibroblastos pulmonares puede generar un incremento en la expresión del gen COL1A2, el cual ha sido reportado como uno de los principales blancos de SCX ^{28,31,69}, se infectaron fibroblastos normales CCD25Lu con vectores adenovirales para posteriormente medir los niveles de expresión de los genes SCX y COL1A2 mediante qPCR.

Se observó que a pesar de tener una sólida sobre expresión de SCX (1.001 ± 0.070 vs 65.54 ± 10.95), las células infectadas no mostraron un incremento en el gen COL1A2 (1.005 ± 0.134 vs 1.071 ± 0.081) (Figura 11a-b), lo cual es discordante con lo reportado en otros trabajos ^{28,31,33}. En otros trabajos se reporta que la sobre expresión de SCX es suficiente para generar un incremento en el gen COL1A2. Se repitió el mismo experimento utilizando cultivos primarios de fibroblastos provenientes de individuos sanos (NOVA) y pacientes de FPI (HIPF286, 304, 339),

observándose al igual que con las líneas celulares comerciales, que la sobre expresión de SCX no incrementa la expresión de COL1A2 (Figura 11c-d, Tabla 3 y 4).

Esta información sugiere que únicamente la expresión de SCX no es suficiente para promover un aumento de expresión de genes como COL1A2 en fibroblastos pulmonares, razón por la cual es posible que su función sea dependiente de la activación de una cascada de señalización que involucre la participación de otros elementos.

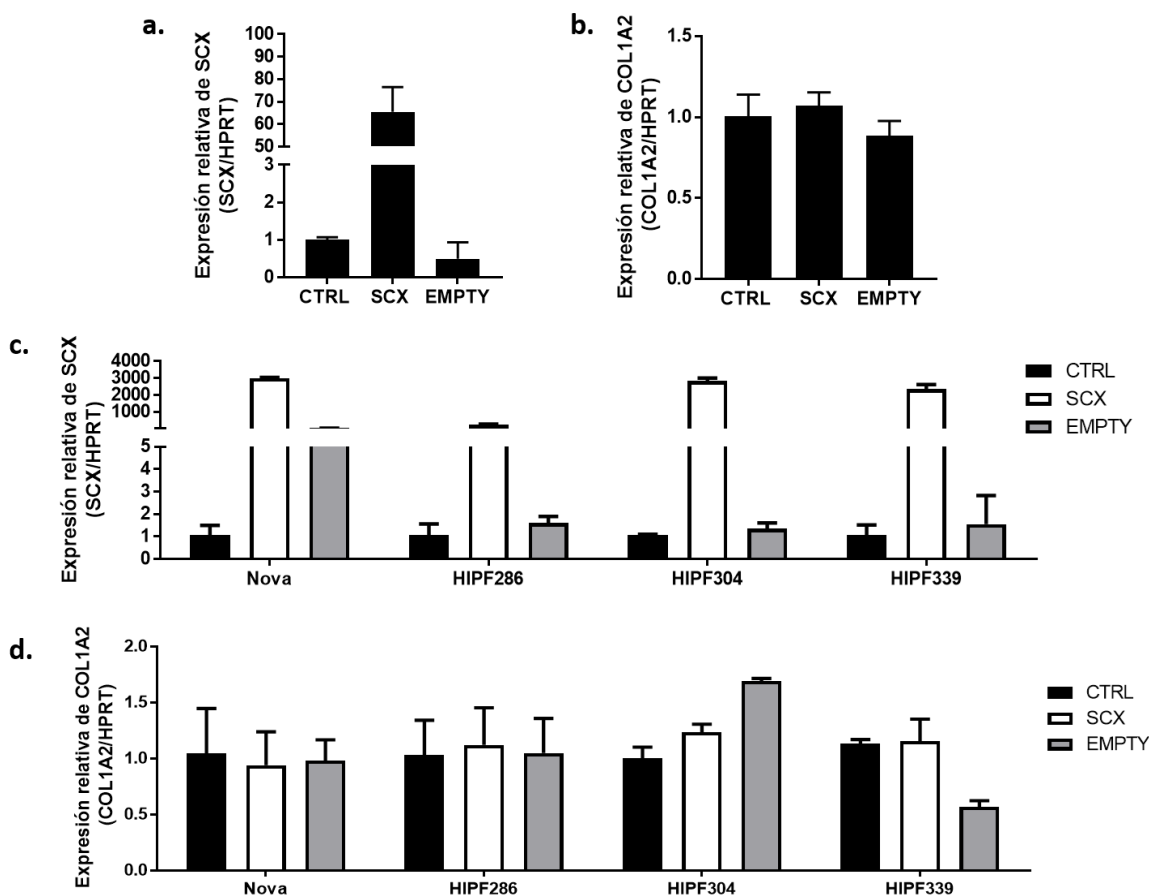


Figura 11. El gen COL1A2 no se ve afectado por la sobreexpresión adenoviral de SCX en fibroblastos pulmonares. Células CCD25Lu fueron infectadas con el vector adenoviral de SCX por 48 horas. A pesar de tener un claro incremento de SCX (a) este no parece afectar la expresión de su gen blanco COL1A2 (b). De forma similar la sobreexpresión de SCX en cultivos primarios de fibroblastos de individuos sanos (NOVA) y pacientes con FPI (HIPF 286, 304 y 339) (c) no generó un incremento en la expresión de COL1A2 (d).

Tabla 3. Sobreexpresión de SCX en cultivos primarios de fibroblastos

	CTRL		SCX		EMPTY	
<i>Nova</i>	1.063	±0.437	2991.81	±58.651	24.478	±3.3488
<i>HIPF286</i>	1.069	±0.490	230.893	±37.183	1.6011	±0.2965
<i>HIPF304</i>	1.084	±0.021	2823.22	±179.76	1.3598	±0.2452
<i>HIPF339</i>	1.075	±0.444	2357.28	±265.17	1.5584	±1.2622

Tabla 4 Expresión de COL1A2 tras la sobre expresión de SCX en cultivos primarios de fibroblastos

	CTRL		SCX		EMPTY	
<i>Nova</i>	1.048	±0.399	0.940	±0.298	0.980	±0.186
<i>HIPF286</i>	1.034	±0.307	1.123	±0.330	1.049	±0.309
<i>HIPF304</i>	1.003	±0.099	1.235	±0.072	1.691	±0.024
<i>HIPF339</i>	1.131	±0.038	1.157	±0.195	0.569	±0.055

8.6. TGFβ no contribuye a que la sobreexpresión inducida de SCX tenga efecto sobre sus genes blanco

Evidencia aportada por trabajos previos ^{28,29,33} indica que SCX es activado por medio de la vía de señalización canónica del TGFβ, por tal motivo se decidió evaluar si el estímulo con esta citocina tiene efecto sobre la actividad reguladora de SCX. Para este fin se infectaron células CCD25Lu por 48 horas con el vector adenoviral, posteriormente se les administró un estímulo de TGFβ (5ng/ml) por 48 horas más, pasado este tiempo se midió la expresión de SCX y COL1A2 mediante qPCR.

El análisis de datos nos muestra que TGFβ tiene efecto sobre el gen SCX promoviendo su expresión y la del gen COL1A2, cuando se compara el grupo control (Figura 12, Tabla 5). Al comparar el grupo de células que fueron infectadas por el vector adenoviral, podemos observar que estas presentan la mayor sobreexpresión de SCX. Sin embargo, esta sobreexpresión no se ve afectada por el estímulo de TGFβ, lo cual indica que la molécula usada para la sobre expresión no es regulada por los mecanismos de señalización propios de la célula. En lo que respecta a la expresión de

COL1A2, la sobreexpresión de SCX por sí sola no generó un incremento significativo con respecto al grupo control, de igual forma el grupo de células infectadas y estimuladas con TGFβ no reflejaron un incremento significativo en la expresión de COL1A2. Esto nos indica que incluso en presencia de TGFβ, la sobreexpresión inducida de SCX no tiene un efecto funcional en los fibroblastos pulmonares.

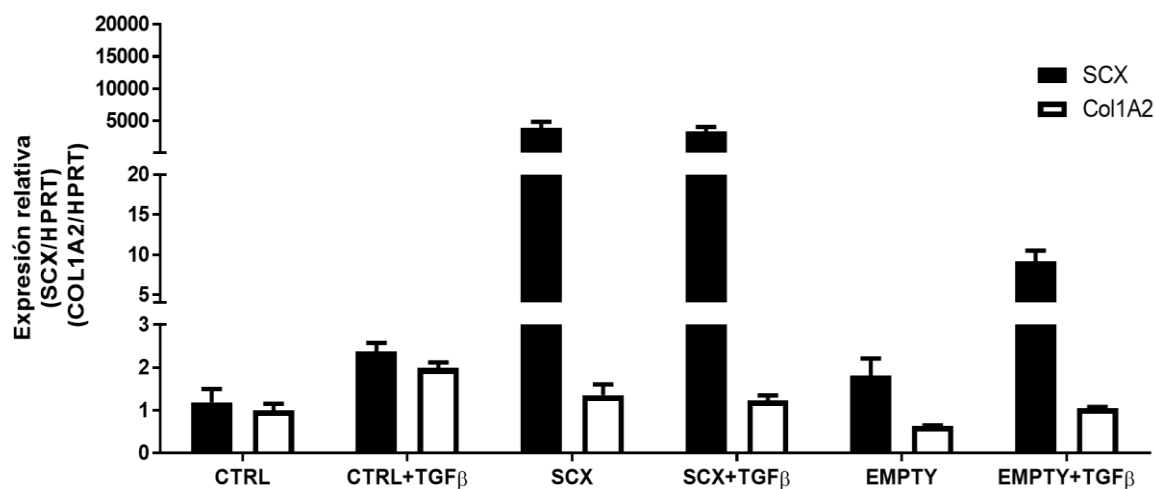


Figura 12. En fibroblastos pulmonares el factor de crecimiento TGFβ no contribuye con la sobreexpresión adenoviral de SCX en la regulación de sus genes blanco. Se infectaron células CCD25Lu con el vector adenoviral de SCX a una M.O.I. de 100 por 48 horas, transcurrido ese tiempo de estimularon las células con 5ng/ml de TGFβ por 48 horas más. Las células control mostraron una respuesta al TGFβ incrementado la expresión de SCX y COL1A2, sin embargo, las células infectadas con SCX no mostraron ningún cambio con relación al TGFβ.

Tabla 5. Expresión de SCX y COL1A2 tras la sobreexpresión de SCX y el estímulo de TGFβ en fibroblastos CCD25Lu

	SCX	COL1A2
CTRL	1.189 ± 0.305	1.007 ± 0.148
CTRL+TGFβ	2.378 ± 0.200	1.989 ± 0.131
SCX	3870.194 ± 985.8	1.352 ± 0.250
SCX+TGFβ	3347.712 ± 738.4	1.232 ± 0.114
EMPTY	1.810 ± 0.404	0.632 ± 0.015
EMPTY+TGFβ	9.175 ± 1.344	1.055 ± 0.025

Dado que no se observó ningún efecto funcional debido a la sobreexpresión de SCX, se realizó un curso temporal con tiempos de medición cortos con el fin de determinar si SCX es una proteína de reacción rápida y su efecto es evidente a corto plazo. La infección por medio de adenovirus mostró una sobreexpresión desde las 2 horas (Figura 13 a, Tabla 6). A pesar de que el incremento de SCX se ve reflejado en su expresión a partir de 2 horas después de la transfección, los niveles de proteína no ven afectados (Figura 13c) e incluso la expresión de sus genes blanco tampoco se vio afectada por la sobreexpresión del factor (Figura 13b, Tabla 7).

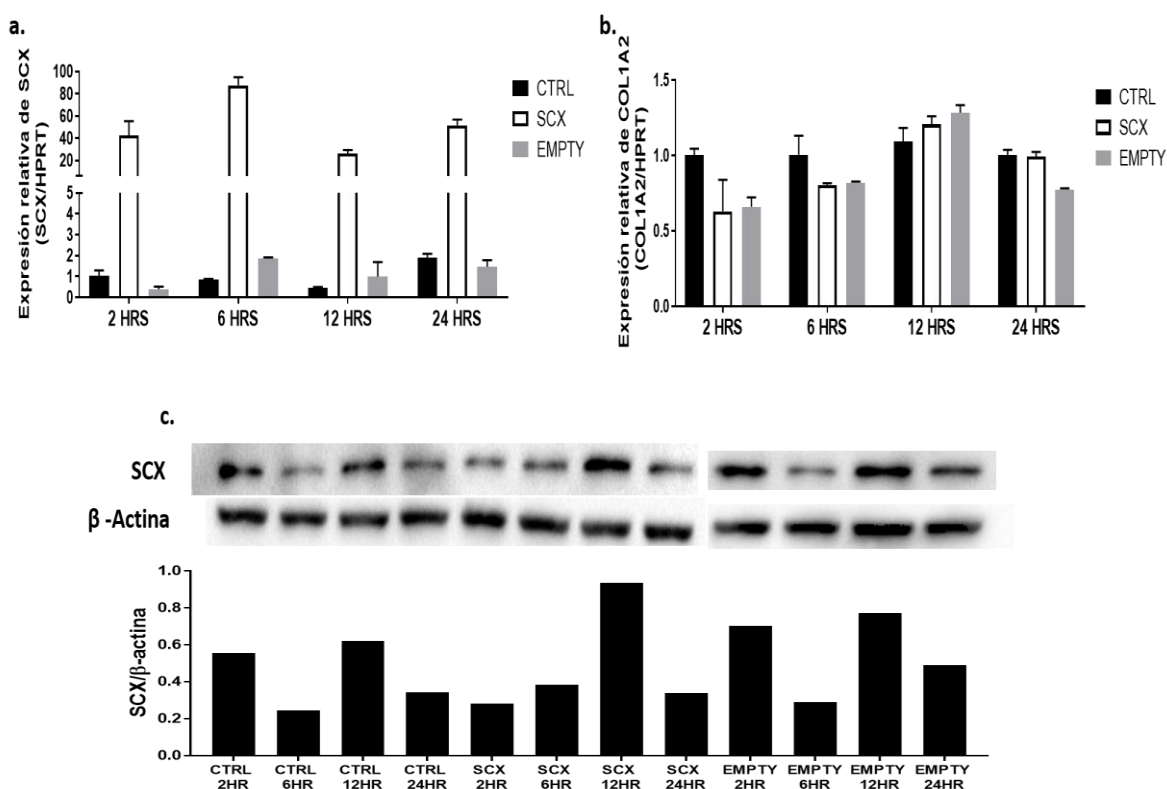


Figura 13. La sobreexpresión de SCX por medio de partículas virales no afecta la expresión del COL1A2 a corto plazo. Se infectó con las partículas adenovirales de SCX a fibroblastos pulmonares CCD25Lu. Se evaluó la expresión de SCX (a), COL1A2 (b) y la proteína SCX (c) a las 2, 6, 12 y 24 horas post infección. De manera similar a la sobreexpresión de SCX por transfección, la expresión de SCX se ve incrementada desde las 2 horas post infección, sin embargo, esta sobreexpresión no fue suficiente para incrementar la expresión de COL1A2.

Tabla 6. Expresión de SCX en curso temporal de 2 a 24 horas después de su sobreexpresión.

	<i>CTRL</i>	<i>SCX</i>	<i>EMPTY</i>
<i>2 HRS</i>	1.000 ±0.024	14608.04 ±1118.36	6.6897 ±0.491
<i>6 HRS</i>	1.164 ±0.178	7258.067 ±201.217	4.3031 ±0.525
<i>12 HRS</i>	1.879 ±0.220	56597.88 ±10425.2	2.7636 ±0.670
<i>24 HRS</i>	1.965 ±0.019	20836.73 ±1300.69	3.0856 ±0.668

Tabla 7. Expresión de COL1A2 en curso temporal de 2 a 24 horas después de la sobreexpresión de SCX.

	<i>CTRL</i>	<i>SCX</i>	<i>EMPTY</i>
<i>2 HRS</i>	1.018 ±0.271	0.737 ±0.032	0.556 ±0.252
<i>6 HRS</i>	1.002 ±0.088	0.910 ±0.091	2.417 ±0.397
<i>12 HRS</i>	1.026 ±0.300	0.889 ±0.155	1.155 ±0.163
<i>24 HRS</i>	1.002 ±0.079	1.260 ±0.232	1.215 ±0.075

Estos resultados nos indican que la sobre expresión de SCX en fibroblastos pulmonares no refleja por sí misma un efecto en su funcionalidad, e incluso en presencia de otros factores como TGF β , dicha sobreexpresión no causa ningún tipo de impacto en la expresión de genes que han sido reportados con anterioridad como genes regulados por SCX^{28,29,31,61}. Lo que nos lleva a sugerir que debido a la naturaleza heterodimérica de SCX este requiere de otros factores con los que pueda asociarse para poder llevar a cabo su función reguladora.

8.7. E47 como compañero de transcripción de SCX

Tomando como base los resultados previos que muestran que únicamente la sobreexpresión de SCX no es suficiente para regular sus genes blancos y la evidencia que apunta a que SCX funciona como factor heterodimérico, proponemos que SCX necesita de alguna proteína asociada para poder realizar correctamente su función reguladora en nuestro modelo. Diversos estudios han señalado al factor bHLH E47 como uno de los principales compañeros de SCX en diferentes órganos^{37,59,70,71}. Por tal

motivo se decidió evaluar la expresión basal de su gen, TCF3, en diversas líneas celulares de fibroblastos pulmonares.

Las líneas utilizadas para este ensayo fueron las líneas celulares CCD25Lu y CCD8Lu, así como cultivos primarios derivados de individuos sanos (NOVA) y pacientes con FPI (HIPF 231, 375 y 397). La expresión basal de E47 se midió a través de qPCR evaluando el nivel de mRNA de su gen TCF3.

Al evaluar la expresión de dicho gen en las distintas líneas se observó variabilidad entre ellas. La línea CCD8Lu presenta una mayor expresión en comparación con las células CCD25Lu (1.706 ± 0.405 vs 1.030 ± 0.351) (Figura 14a). En los cultivos primarios observamos que las células provenientes de pacientes con FPI mostraron una mayor expresión de TCF3 en comparación con las células provenientes de individuos sanos. La expresión de TCF3 en los cultivos provenientes de pacientes mostró diferencias notorias entre ellos (Figura 14b, Tabla 8).

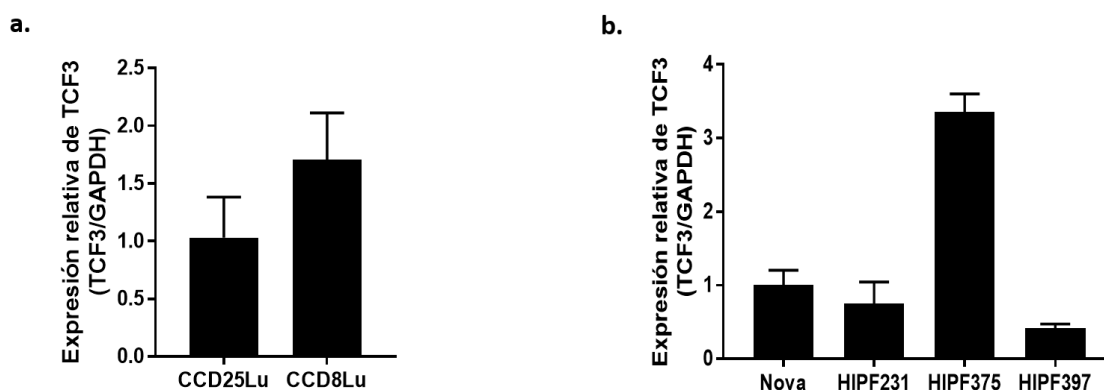


Figura 14. Expresión de TCF3 (E47) en fibroblastos pulmonares. Se observó que la expresión de TCF3 es variable entre los diferentes cultivos de fibroblastos pulmonares utilizados. a) Expresión en líneas celulares de fibroblastos normales (CCD25Lu, CCD8Lu). b) Expresión en cultivos primarios de individuos sanos (NOVA), y de pacientes con FPI (HIPF 231, 375, 397).

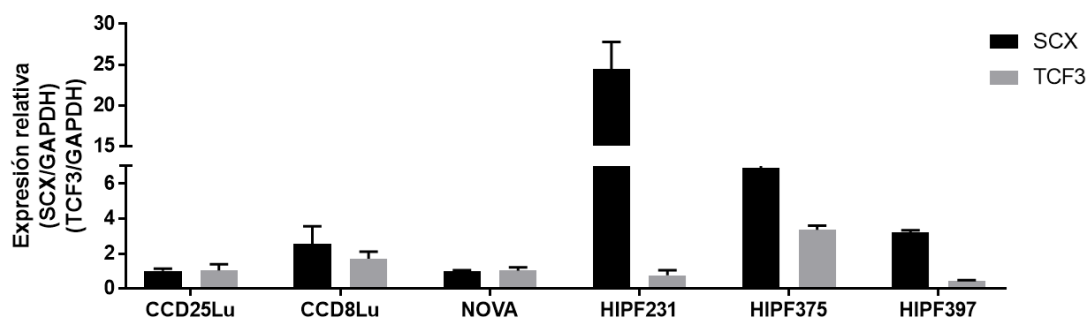
Tabla 8. Expresión de TCF3 en cultivos primarios de fibroblastos pulmonares

	<i>TCF3</i>
<i>Nova</i>	1.009 ± 0.196
<i>HIPF231</i>	0.753 ± 0.291
<i>HIPF375</i>	3.356 ± 0.246
<i>HIPF397</i>	0.416 ± 0.056

Al relacionar la expresión de TCF3 con la de SCX podemos observar que, en la mayoría de los casos, la expresión de ambos genes guarda una proporción similar entre ellos (Figura 15a, Tabla 9). Al asociar dichas proporciones con la expresión de los genes blanco (COL1A1, COL1A2, ACTA2) en estas células, podemos observar que en las células donde existe una proporción similar de ambos factores, los genes blanco se expresan en mayor medida (Figura 15b), mientras que aquellas donde la expresión de uno de estos factores es ampliamente superior, los genes de MEC no muestran un incremento tan notorio (véase HIPF 231).

Con base en estos datos podemos sugerir que para que SCX tenga una correcta función reguladora, en fibroblastos pulmonares, debe de estar acompañado del factor E47 en una proporción similar, lo cual explica por qué nuestro modelo de sobreexpresión no mostró los resultados que otros trabajos han reportado. Por tal motivo es necesario que en futuras investigaciones que involucren SCX debe de sobreexpresarse en igual medida a su compañero E47, lo cual nos permitirá profundizar en el estudio de los mecanismos en los que estos factores bHLH intervienen durante la patogénesis de la FPI.

a.



b.

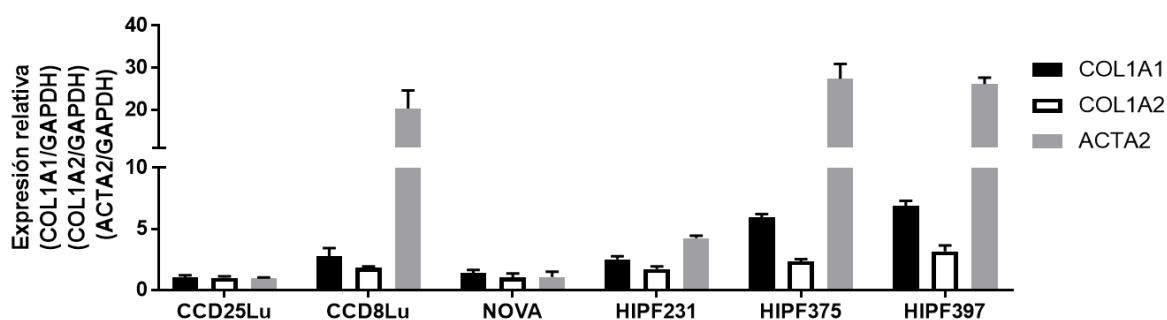


Figura 15. La proporción SCX/TCF3(E47) puede ser importante para la regulación efectuada por SCX. Al comparar la expresión de SCX y TCF3 (a) en diferentes líneas de fibroblastos pulmonares se observó que esta varía entre las distintas líneas, sin embargo, al revisar la expresión correspondiente de los genes COL1A1, COL1A2 y ACTA2 (b), se puede observar que existe una relación entre la expresión de estos genes y la proporción SCX/TCF3. Se puede apreciar que en los cultivos que mantienen una proporción similar de estos factores (CCD8Lu, HIPF376, HIPF397) presentan una mayor expresión de sus genes blanco, mientras que en los cultivos donde uno de los factores está incrementado de sobre manera (HIPF 231) la expresión de estos genes es menor.

Tabla 9. Expresión de SCX y TCF3 en diferentes cultivos de fibroblastos pulmonares

	SCX	TCF3
CCD25Lu	1.004 ±0.127	1.030 ±0.351
CCD8Lu	2.562 ±1.002	1.706 ±0.405
NOVA	1.000 ±0.044	1.009 ±0.196
HIPF231	24.450 ±3.344	0.753 ±0.291
HIPF375	6.898 ±0.405	3.356 ±0.246
HIPF397	3.202 ±0.139	0.416 ±0.056

9. DISCUSIÓN

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad que se caracteriza por la acumulación exacerbada de MEC ⁹⁻¹². Scleraxis ha sido descrito como un factor transcripcional que regula la expresión de genes de matriz extracelular ^{28,29,35,51,61} en corazón, piel y tendones ^{28,42,51,59,61,72,73}. La función que desempeña este factor en tejido pulmonar no había sido evaluada hasta la fecha, ya que solo existe evidencia que señala su presencia en este órgano durante el desarrollo embrionario ⁵⁸. En este trabajo evaluamos la presencia de SCX en tejido pulmonar adulto, tomando en consideración la evidencia que apunta a que este factor es un importante regulador de la expresión de MEC. Nosotros hipotetizamos que SCX puede participar activamente en la patogénesis de la FPI.

Evaluamos la expresión basal de SCX en fibroblastos pulmonares, así como de sus genes blanco y observamos que existe una relación entre SCX y sus genes. En las líneas celulares comerciales CCD25Lu y CCD8Lu observamos que una mayor expresión de SCX se asocia con una mayor expresión de los genes COL1A1, COL1A2 y ACTA2, tres genes codificantes de proteínas de MEC. Estos hallazgos se encuentran en concordancia con la evidencia existente respecto a este factor en órganos como corazón y tendones ^{28,29,31,51}. Esto podría indicar, que como en otros órganos, SCX es un regulador clave de genes de MEC y que por la existencia de deficiencias en su función reguladora SCX podría participar en el desarrollo de enfermedades asociadas a MEC como es el caso de FPI.

La participación de SCX en patologías fibróticas no es un campo inexplorado, ya que se ha reportado la participación de este factor en fibrosis cardíacas y nefropatía diabética ^{28,31,61,62}. En el primer caso se ha reportado a SCX como uno de los principales efectores de la fibrosis cardíaca, quedando demostrado que la desregulación de SCX en las células cardíacas promueve los signos característicos de la patología, como son la síntesis de colágena, formación de adherencias focales y fibras de tensión, así como reducción en la migración y proliferación ^{28,31,42}. Mientras que, en lo referente a nefropatía diabética se ha reportado que SCX modula la expresión de proteínas como α SMA y la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4), lo que

genera cambios fenotípicos en las células mesangiales, promoviendo su diferenciación a miofibroblastos, lo que lleva a una secreción anormal de colágena en el tejido renal⁶².

Los hallazgos de esta investigación muestran que SCX se expresa en mayor medida en los fibroblastos pulmonares provenientes de pacientes con FPI en comparación con las células de individuos sanos. Este incremento correlaciona con la expresión elevada de los genes de MEC (COL1A1, COL1A2 y ACTA2). Dicho incremento en la expresión de SCX se reafirmó al evaluar el tejido pulmonar de los pacientes con FPI, por lo que asumimos que en FPI SCX se encuentra incrementado y esto puede contribuir con la producción exacerbada de MEC que caracteriza a esta patología.

Al evaluar de manera histológica la presencia de SCX en tejidos pulmonares, se observó que este factor se presenta en mayor medida en los tejidos de pacientes con FPI. Esto puede explicarse debido a la diferente composición celular que presenta el tejido de los pacientes en comparación con el tejido sano. Mientras que el tejido sano presenta una estructura ramificada en la que pueden apreciarse los espacios alveolares revestidos por el epitelio alveolar, en el tejido de pacientes con FPI estos espacios han sido ocupados por MEC, fibroblastos, fibrocitos y precursores de células mesenquimales. Debido a que SCX es un factor que se ha reportado principalmente en células de tipo mesenquimal, la acumulación de éstas en el tejido fibrótico puede ser la causa de las diferencias de expresión que encontramos al comparar la expresión en tejido.

El incremento en la expresión de SCX que presentan las células en FPI sumado a la acumulación de estas mismas en el tejido pulmonar nos permite señalar que SCX se presenta de manera prominente en esta patología. Tomando en cuenta que el incremento de su expresión en el tejido es debido al reclutamiento de células mesenquimales en los espacios alveolares, podemos asumir que dicho aumento se va dando de manera gradual y puede ser monitoreado durante el desarrollo de la patología. Por lo que la expresión de SCX podría ser utilizada como un indicador de progresión y severidad de la FPI.

Debido a la importancia biológica que tiene la función de los factores bHLH en diversos órganos y en desarrollo embrionario, la posibilidad de utilizarlos como biomarcadores patológicos es amplia. Esto se ha visto reflejado principalmente en cáncer, donde estos factores son usados para determinar el pronóstico y supervivencia de los pacientes. Ejemplos de esto son TWIST ⁷⁴, ASCL2 ⁷⁵, HEY2 ⁷⁶ y HES1 ⁷⁷, de los cuales se ha reportado que un incremento o bien una disminución en el caso de HES1 puede ser indicador de un mal pronóstico, asociado con la agresividad y la alta capacidad invasiva del cáncer. La función principal de estos factores está asociada con la regulación durante el desarrollo embrionario, pero su presencia en altas concentraciones en condiciones patológicas ha llevado a su estudio.

De manera similar, la función primordial de SCX se desarrolla durante el desarrollo embrionario, en la formación del mesodermo ^{26,27}, sin embargo, los hallazgos demuestran un incremento en su expresión en pacientes con FPI, lo cual nos permiten proponerlo como candidato a biomarcador. Este estudio es el primero en destacar la importancia de SCX como un posible marcador patológico, ya que solo ha sido propuesto como un marcador de diferenciación de tendones y ligamentos ⁷⁸.

Con el fin de evaluar la capacidad de SCX como biomarcador se detectaron las concentraciones circulantes de este factor, además de evaluar si estas se presentaban acorde a los hallazgos encontrados en células y tejidos. Dado que las concentraciones circulantes de SCX en pacientes con FPI se encontraban elevadas en comparación con las del grupo control, podemos confirmar que el incremento de este factor está relacionado con el desarrollo de FPI. Al comparar estas mismas concentraciones con las encontradas en pacientes con NH, observamos una diferencia significativa, la cual puede atribuirse a la patogénesis de la enfermedad, ya que mientras la FPI se cree es resultado de una actividad aberrante y desregulada de las células del epitelio alveolar que desencadena la acumulación exacerbada de MEC ^{9,12}, la NH se caracteriza por una serie de reacciones inmunopatológicas en el parénquima pulmonar y su gravedad puede variar dependiendo tanto del tiempo de exposición al antígeno como de la susceptibilidad del individuo, por lo que no todos los pacientes desarrollan fibrosis pulmonar ⁶. Esta diferencia indicaría que el incremento de SCX está relacionado

específicamente con el desarrollo de fibrosis, por lo que medir la expresión de SCX podría resultar de apoyo para determinar la presencia de fibrosis pulmonar en los pacientes con NH.

Al evaluar las concentraciones de SCX con base en las funciones pulmonares se observó que los pacientes con mayor de las mismas, que muestran una capacidad pulmonar total menor al 60% y una capacidad vital forzada menor al 80%, presentaban las mayores concentraciones de SCX. Este hallazgo confirma lo encontrado en tejido pulmonar. Por lo que, en su conjunto, estos datos nos permiten asumir que el incremento en la expresión de SCX está asociado con el deterioro pulmonar, es decir, que las concentraciones de SCX se verán incrementadas a medida que la FPI se encuentre en etapas más avanzadas.

La suma de resultados observados nos indica que SCX es un factor transcripcional que se expresa de manera basal en células y tejido pulmonar, su expresión se ve incrementada en pacientes con FPI, observándose un mayor incremento en las formas más avanzadas de la enfermedad. Sumado a esto su detección puede realizarse de manera no invasiva a través de suero sanguíneo, lo cual indica que puede realizarse como un procedimiento de rutina. Estas características nos llevan a señalar a SCX como una opción para medir el grado de severidad de FPI en pacientes. Además, podría ser utilizado en combinación con otros biomarcadores de FPI reportados como son quimiocinas (CCL18, CXCL13), interleucinas (Il-6, Il-13, Il-8) y metaloproteinasas (MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP28)⁷⁹⁻⁸¹ con el fin de añadir nuevos datos a la información proporcionada por estos marcadores y obtener así un pronóstico más completo.

Es importante señalar que los datos encontrados nos indican que SCX también se encuentra incrementado en el suero de pacientes de ES, esto vendría a apoyar la relación de SCX con el desarrollo de fibrosis en diferentes órganos ^{31,42,62}, por lo que no hay que descartar la posibilidad de que SCX pueda ser utilizado no solo como biomarcador de FPI, sino como un marcador de fibrosis en general.

Para tratar de dilucidar los posibles mecanismos por los cuales SCX podría participar durante el desarrollo de la FPI, se optó por sobre expresar este factor a través de diferentes vectores. Aunque la sobreexpresión del gen SCX resulto ser satisfactoria, esta nunca tuvo efecto sobre sus genes blanco o bien en su forma proteica en las diferentes condiciones y tiempos en las que fue evaluada. Este hallazgo sugiere que la sola sobreexpresión de SCX en fibroblastos pulmonares es incapaz de tener un efecto sobre sus genes blanco, lo cual difiere con lo reportado en modelos similares ^{28,31,33}. Sin embargo, la diferencia de los órganos y especies utilizados entre el modelo murino utilizado en las referencias citadas y el nuestro, podrían explicar la discrepancia en los resultados obtenidos.

Una de las posibles causas de las diferencias encontradas en nuestros resultados con lo ya reportado, puede ser la incompatibilidad de especies en estudio, ya que la secuencia de SCX clonada y utilizada para ser transfectada es de origen murino, mientras que todas nuestras células en estudio son humanas. La diferencia existente entre la secuencia de las dos especies resulta ser solo de un 11% y al comparar la secuencia de aminoácidos que conforman cada una de las proteínas se observa que las diferencias resultan ser mínimas, conservando íntegramente los dominios de unión a DNA y heterodimerización ⁶⁹, aun así, es posible que esas mínimas diferencias sean cruciales para el correcto funcionamiento de SCX, sin embargo, la proteína murina SCX ha sido probada anteriormente en diferentes especies con resultados funcionales, logrando que su transfección promueva la expresión de COL1A1 en fibroblastos de mono *Cercopithecus aethiops* (COS-7) ⁵⁹, e incluso en células del epitelio alveolar humanas (A549) su sobreexpresión promueve la expresión de los genes COL1A1, COL1A2 y ACTA2, además de inducir el proceso de transición epitelio mesénquima (TEM).³¹ Por tal motivo la incompatibilidad interespecies puede ser descartada como causa de las diferencias en nuestro modelo.

En este trabajo, la sobreexpresión de SCX no tuvo efectos en los genes que son señalados normalmente como sus blancos, a diferencia de lo reportado en órganos como tendones y corazón. Cabe destacar que actualmente la literatura existente sobre la función de SCX en pulmón es nula, siendo este el primer trabajo en evaluar el

comportamiento de este factor en células pulmonares. Por tal motivo se desconocen los mecanismos de regulación de los cuales puede valerse SCX para llevar a cabo su función en este órgano. Tomando en cuenta esta primicia junto con los resultados observados podemos suponer que el mecanismo de regulación en tejido y células pulmonares es distinto al de otros órganos, como corazón y tendón, por lo que la sobreexpresión de SCX en solitario no es suficiente para promover su función reguladora.

Una explicación a esta discrepancia puede darse a través de las características que le han sido atribuidas a SCX. Originalmente SCX fue descubierto como un compañero de heterodimerización de las proteínas E2A (E47 y E12) durante el desarrollo embrionario ²⁶. Debido a que su expresión se veía limitada a unos cuantos órganos después del desarrollo embrionario fue catalogado como un factor de expresión restringida con la capacidad de formar heterodímeros con miembros de la familia bHLH para desempeñar su función ^{22,23}.

Una de las proteínas que más ha sido asociada con SCX es el factor E47 ^{37,59,70}. Esta asociación ha sido reportada en condrogénesis, observándose que cuando estos factores se encuentran asociados se muestra un incremento en su función, promoviendo en mayor medida la expresión de sus genes blanco, en comparación de su efecto en solitario. Esta asociación explicaría lo ocurrido en nuestro modelo, ya que el sobre expresar SCX en solitario no fue suficiente para realizar su función reguladora, pudiendo ser una posible causa, la falta de una proteína con la cual asociarse. Esta hipótesis pudo ser parcialmente confirmada al evaluar los niveles basales del gen TCF3 (E47) en los fibroblastos pulmonares. Al comparar los niveles de expresión de TCF3 con los de SCX observamos la existencia de variabilidad entre ellos, sin embargo, al evaluar la expresión de sus genes blanco notamos que en los cultivos celulares donde se conserva una proporción similar entre estos dos factores se aprecia una mayor expresión de sus genes blanco, en comparación con aquellos cultivos donde no se conserva dicha proporción.

Estos datos podrían indicar que en el tejido pulmonar es necesaria la asociación de estos dos factores para que pueda llevarse a cabo la regulación de los

genes de MEC. Sin embargo, para confirmar dicha hipótesis se necesita explorar más a detalle el comportamiento de estos factores, así como llevar a cabo experimentos que permitan evaluar si la sobreexpresión de ambas moléculas es capaz de tener efectos funcionales en el tejido pulmonar. Esto permitirá ampliar el panorama que se tiene de los factores bHLH en el tejido pulmonar, lo cual puede traer como resultado el conocimiento de nuevos mecanismos de regulación, así como el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de FPI.

10. CONCLUSIONES

La presente investigación representa el primer estudio realizado sobre la función que desempeña el factor transcripcional SCX en tejido pulmonar. Los resultados encontrados nos permiten concluir:

- La expresión de SCX se encuentra incrementada en células y tejido de pacientes con FPI comparado con los controles sanos.
- Los niveles circulantes de SCX en suero sanguíneo se encuentran elevados en pacientes con FPI.
- El incremento de la expresión y los niveles de SCX está relacionado con el grado de avance de la FPI.
- SCX es una proteína candidata para ser utilizada como un biomarcador para medir el grado de avance de FPI, además de que su utilización junto con otros marcadores reportados puede aportar un pronóstico más completo.
- La sobreexpresión de SCX por sí sola no tiene un efecto sobre la expresión de sus genes blanco en fibroblastos pulmonares.
- En fibroblastos pulmonares SCX podría necesitar de la asociación con el factor E47 en una proporción adecuada para realizar sus funciones regulatorias.

11. PERSPECTIVAS

La función que desempeña SCX durante el proceso fibrótico aún no ha sido estudiada a profundidad. Mediante esta investigación se observó que este factor transcripcional se encuentra incrementado en pacientes con FPI y que este incremento está relacionado con el grado de avance y severidad de la enfermedad. Así como también se determinó que, en células pulmonares, la sobreexpresión de SCX no basta para provocar la activación de los genes de MEC.

Teniendo como base estos hallazgos, se abre la puerta para continuar con el estudio de la función de SCX en el desarrollo de esta enfermedad. Algunas de las preguntas que podrían abordarse son:

- ¿Qué tan relevante es la asociación SCX/E47 para la regulación de genes de MEC?
- ¿Una sobreexpresión del heterodímero SCX/E47 tiene efectos funcionales en el tejido pulmonar?
- ¿SCX participa en el proceso de TEM?
- ¿Con que otros factores se asocia SCX para desarrollar su función regulatoria?
- ¿Cuáles son los genes blanco de SCX en los diferentes tejidos en los que se ha encontrado su expresión?
- ¿Los genes blanco de SCX son distintos en condiciones fisiológicas y en condiciones patológicas?
- ¿Cuáles son los genes que regula SCX en distintas patologías fibróticas?
- ¿Cuál es la vía de señalización por la que actúa SCX y cómo se ve alterada durante la fibrosis en diferentes tejidos?
- Una deficiente función regulatoria de SCX ¿es causa o consecuencia del desarrollo de fibrosis?
- ¿La inhibición de SCX es capaz de revertir o mitigar el proceso fibrótico?

A pesar de que esta investigación se enfoca en encontrar la función de SCX en la FPI, los resultados obtenidos nos permiten observar que este factor se encuentra en distintas patologías fibróticas y que su función regulatoria es dependiente del

contexto celular, por tal motivo es importante ampliar el estudio de SCX a diferentes enfermedades fibróticas, esto permitirá conocer los mecanismos de regulación que desempeña este factor, así como sus genes blanco y las vías por las cuales es regulado. De esta forma se tendrá una percepción más amplia sobre las funciones de SCX y la fibrosis en general, lo que permitirá en algún momento desarrollar mejores estrategias para el tratamiento de las enfermedades fibrosantes.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ho, Y. Y., Lagares, D., Tager, A. M. & Kapoor, M. Fibrosis - A lethal component of systemic sclerosis. *Nature Reviews Rheumatology* (2014) doi:10.1038/nrrheum.2014.53.
2. Rosenbloom, J., Macarak, E., Piera-Velazquez, S. & Jimenez, S. A. Human fibrotic diseases: Current challenges in fibrosis research. in *Methods in Molecular Biology* (2017). doi:10.1007/978-1-4939-7113-8_1.
3. Allanore, Y. *et al.* Systemic sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* (2015) doi:10.1038/nrdp.2015.2.
4. Buzan, M. T. A. & Pop, C. M. State of the art in the diagnosis and management of interstitial lung disease. *Med. Pharm. Reports* (2015) doi:10.15386/cjmed-457.
5. Pereira, C. A., Gimenez, A., Kuranishi, L. & Storrer, K. Chronic hypersensitivity pneumonitis. *J. Asthma Allergy* **9**, 171–181 (2016).
6. Selman, M. Hypersensitivity pneumonitis: A multifaceted deceiving disorder. *Clinics in Chest Medicine* (2004) doi:10.1016/j.ccm.2004.04.001.
7. Kouranos, V., Jacob, J., Nicholson, A. & Renzoni, E. Fibrotic Hypersensitivity Pneumonitis: Key Issues in Diagnosis and Management. *J. Clin. Med.* (2017) doi:10.3390/jcm6060062.
8. Giménez, T. F. A. Neumonías intersticiales idiopáticas. *Radiologia* **54**, 479–489 (2012).
9. Martinez, F. J. *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 17074 (2017).
10. Richeldi, L., Collard, H. R. & Jones, M. G. Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet* vol. 389 1941–1952 (2017).
11. Xaubet, A., Ancochea, J. & Molina-Molina, M. Fibrosis pulmonar idiopática. *Medicina Clinica* vol. 148 170–175 (2017).

12. King, T. E. J., Pardo, A. & Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet (London, England)* **378**, 1949–1961 (2011).
13. Saito, A., Horie, M., Micke, P. & Nagase, T. The Role of TGF- β Signaling in Lung Cancer Associated with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *International journal of molecular sciences* vol. 19 1–14 (2018).
14. Wolters, P. J., Collard, H. R. & Jones, K. D. Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **9**, 157–179 (2014).
15. Phan, S. H. The Myofibroblast in Pulmonary Fibrosis. *Chest* **122**, 286S-289S (2002).
16. Miyazono, K. Positive and negative regulation of TGF- β signaling. *J. Cell Sci.* (2000).
17. Morikawa, M., Derynck, R. & Miyazono, K. TGF- β and the TGF- β family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (2016) doi:10.1101/cshperspect.a021873.
18. Santibañez, J. F., Quintanilla, M. & Bernabeu, C. TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. (Lond)*. (2011) doi:10.1042/CS20110086.
19. Biernacka, A., Dobaczewski, M. & Frangogiannis, N. G. TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors* **29**, 196–202 (2011).
20. Hata, A. & Chen, Y. TGF- β Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, a022061 (2016).
21. Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* vol. 425 577–584 (2003).
22. Murre, C. *et al.* Structure and function of helix-loop-helix proteins. *BBA - Gene Structure and Expression* (1994) doi:10.1016/0167-4781(94)90001-9.
23. Massari, M. E. & Murre, C. Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of

- Transcription in Eucaryotic Organisms. *Mol. Cell. Biol.* (2000)
doi:10.1128/MCB.20.2.429-440.2000.
24. Gyoja, F. Basic helix-loop-helix transcription factors in evolution: Roles in development of mesoderm and neural tissues. *Genesis* (2017)
doi:10.1002/dvg.23051.
 25. Wang, L. H. & Baker, N. E. E Proteins and ID Proteins: Helix-Loop-Helix Partners in Development and Disease. *Developmental Cell* (2015)
doi:10.1016/j.devcel.2015.10.019.
 26. Cserjesi, P. *et al.* Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development* (1995).
 27. Brown, D., Wagner, D., Li, X., Richardson, J. a & Olson, E. N. Dual role of the basic helix-loop-helix transcription factor scleraxis in mesoderm formation and chondrogenesis during mouse embryogenesis. *Development* (1999).
 28. Espira, L. *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor scleraxis regulates fibroblast collagen synthesis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (2009)
doi:10.1016/j.yjmcc.2009.03.024.
 29. Berthet, E. *et al.* Smad3 binds Scleraxis and Mohawk and regulates tendon matrix organization. *J. Orthop. Res.* (2013) doi:10.1002/jor.22382.
 30. Mendias, C. L. *et al.* Transforming growth factor-beta induces skeletal muscle atrophy and fibrosis through the induction of atrogen-1 and scleraxis. *Muscle and Nerve* (2012) doi:10.1002/mus.22232.
 31. Bagchi, R. A. *et al.* The transcription factor scleraxis is a critical regulator of cardiac fibroblast phenotype. *BMC Biol.* (2016) doi:10.1186/s12915-016-0243-8.
 32. Bagchi, R. A., Wang, R., Jahan, F., Wigle, J. T. & Czubryt, M. P. Regulation of scleraxis transcriptional activity by serine phosphorylation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (2016) doi:10.1016/j.yjmcc.2016.02.013.

33. Bagchi, R. A. & Czubryt, M. P. Synergistic roles of scleraxis and Smads in the regulation of collagen 1 α 2 gene expression. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* (2012) doi:10.1016/j.bbamcr.2012.07.002.
34. Zeglinski, M. R. *et al.* TGF β 1 regulates Scleraxis expression in primary cardiac myofibroblasts by a Smad-independent mechanism. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* (2016) doi:10.1152/ajpheart.00584.2015.
35. Barnette, D. N. *et al.* Tgf β -Smad and MAPK signaling mediate scleraxis and proteoglycan expression in heart valves. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (2013) doi:10.1016/j.yjmcc.2013.10.007.
36. Smith, T. G. Feedback interactions between MKP3 and ERK MAP kinase control scleraxis expression and the specification of rib progenitors in the developing chick somite. *Development* (2005) doi:10.1242/dev.01699.
37. Furumatsu, T., Shukunami, C., Amemiya-Kudo, M., Shimano, H. & Ozaki, T. Scleraxis and E47 cooperatively regulate the Sox9-dependent transcription. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 148–156 (2010).
38. Edom-Vovard, F., Schuler, B., Bonnin, M. A., Teillet, M. A. & Duprez, D. Fgf4 positively regulates scleraxis and tenascin expression in chick limb tendons. *Dev. Biol.* (2002) doi:10.1006/dbio.2002.0707.
39. Chen, K., Zhou, X. & Sun, Z. Haploinsufficiency of klotho gene causes arterial stiffening via upregulation of scleraxis expression and induction of autophagy. *Hypertension* (2015) doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06033.
40. Maeda, T. *et al.* Conversion of mechanical force into TGF- β -mediated biochemical signals. *Curr. Biol.* (2011) doi:10.1016/j.cub.2011.04.007.
41. Qiu, Y., Lei, J., Koob, T. J. & Temenoff, J. S. Cyclic tension promotes fibroblastic differentiation of human MSCs cultured on collagen-fibre scaffolds. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* (2016) doi:10.1002/term.1880.
42. Roche, P. L. *et al.* Role of scleraxis in mechanical stretch-mediated regulation of

- cardiac myofibroblast phenotype. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* (2016)
doi:10.1152/ajpcell.00333.2015.
43. Chen, X. *et al.* Force and scleraxis synergistically promote the commitment of human ES cells derived MSCs to tenocytes. *Sci. Rep.* (2012)
doi:10.1038/srep00977.
 44. Yuan, H., Zhou, Y., Lee, M. S., Zhang, Y. & Li, W. J. A newly identified mechanism involved in regulation of human mesenchymal stem cells by fibrous substrate stiffness. *Acta Biomater.* (2016) doi:10.1016/j.actbio.2016.06.034.
 45. Upagupta, C., Shimbori, C., Alsilmi, R. & Kolb, M. Matrix abnormalities in pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. Rev.* **27**, (2018).
 46. Asou, Y. *et al.* Coordinated expression of scleraxis and Sox9 genes during embryonic development of tendons and cartilage. *J. Orthop. Res.* (2002)
doi:10.1016/S0736-0266(01)00169-3.
 47. Brent, A. E., Schweitzer, R. & Tabin, C. J. A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell* (2003) doi:10.1016/S0092-8674(03)00268-X.
 48. Havis, E. *et al.* Transcriptomic analysis of mouse limb tendon cells during development. *Development* (2014) doi:10.1242/dev.108654.
 49. Havis, E. *et al.* TGF β and FGF promote tendon progenitor fate and act downstream of muscle contraction to regulate tendon differentiation during chick limb development. *Development* (2016) doi:10.1242/dev.136242.
 50. Murchison, N. D. *et al.* Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. *Development* (2007) doi:10.1242/dev.001933.
 51. Levay, A. K. *et al.* Scleraxis is required for cell lineage differentiation and extracellular matrix remodeling during murine heart valve formation in vivo. *Circ. Res.* (2008) doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.177238.
 52. Barnette, D. N., VandeKopple, M., Wu, Y., Willoughby, D. A. & Lincoln, J. RNA-seq

analysis to identify novel roles of scleraxis during embryonic mouse heart valve remodeling. *PLoS One* (2014) doi:10.1371/journal.pone.0101425.

53. Wang, L. *et al.* Scleraxis is required for differentiation of the stapedius and tensor tympani tendons of the middle ear. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* (2011) doi:10.1007/s10162-011-0264-5.
54. Mann, Z. F., Chang, W., Lee, K. Y., King, K. A. & Kelley, M. W. Expression and Function of Scleraxis in the Developing Auditory System. *PLoS One* (2013) doi:10.1371/journal.pone.0075521.
55. Muir, T. *et al.* Integration of CREB and bHLH transcriptional signaling pathways through direct heterodimerization of the proteins: Role in muscle and testis development. *Mol. Reprod. Dev.* (2008) doi:10.1002/mrd.20902.
56. Bhandari, R. K., Schinke, E. N., Haque, M. M., Sadler-Riggleman, I. & Skinner, M. K. SRY Induced TCF21 Genome-Wide Targets and Cascade of bHLH Factors During Sertoli Cell Differentiation and Male Sex Determination in Rats¹. *Biol. Reprod.* (2012) doi:10.1095/biolreprod.112.099663.
57. Muir, T., Sadler-Riggleman, I. & Skinner, M. K. Role of the Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, Scleraxis, in the Regulation of Sertoli Cell Function and Differentiation. *Mol. Endocrinol.* (2005) doi:10.1210/me.2004-0473.
58. Pryce, B. A., Brent, A. E., Murchison, N. D., Tabin, C. J. & Schweitzer, R. Generation of transgenic tendon reporters, ScxGFP and ScxAP, using regulatory elements of the scleraxis gene. *Dev. Dyn.* (2007) doi:10.1002/dvdy.21179.
59. Léjard, V. *et al.* Scleraxis and NFATc regulate the expression of the pro- α 1(I) collagen gene in tendon fibroblasts. *J. Biol. Chem.* (2007) doi:10.1074/jbc.M610113200.
60. Killian, M. L. & Thomopoulos, S. Scleraxis is required for the development of a functional tendon enthesis. *FASEB J.* (2016) doi:10.1096/fj.14-258236.
61. Bagchi, R. A., Lin, J., Wang, R. & Czubryt, M. P. Regulation of fibronectin gene

- expression in cardiac fibroblasts by scleraxis. *Cell Tissue Res.* (2016) doi:10.1007/s00441-016-2439-1.
62. Abe, H. *et al.* Scleraxis modulates Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4)-Smad1 protein-Smooth Muscle α -Actin (SMA) signal transduction in diabetic nephropathy. *J. Biol. Chem.* (2012) doi:10.1074/jbc.M111.275610.
 63. Yeghiazaryan, K. *et al.* Downregulation of the transcription factor scleraxis in brain of patients with Down syndrome. *J Neural Transm Suppl* (1999).
 64. Agarwal, S. *et al.* Scleraxis-Lineage Cells Contribute to Ectopic Bone Formation in Muscle and Tendon. *Stem Cells* (2017) doi:10.1002/stem.2515.
 65. Raghu, G. *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.* **183**, 788–824 (2011).
 66. van den Hoogen, F. *et al.* 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 1747–1755 (2013).
 67. Pardo, A. *et al.* Up-Regulation and Profibrotic Role of Osteopontin in Human Idiopathic Pulmonary Fibrosis. (2005) doi:10.1371/journal.pmed.0020251.
 68. Barreiro, T. J. & Perillo, I. An Approach to Interpreting Spirometry. *American Family Physician* (2004) doi:10.1152/advan.00014.2013.
 69. Bagchi, R. A. & Czubryt, M. P. Scleraxis: A New Regulator of Extracellular Matrix Formation. in *Genes and Cardiovascular Function* (2011). doi:10.1007/978-1-4419-7207-1_6.
 70. Carlberg, A. L., Tuan, R. S. & Hall, D. J. Regulation of scleraxis function by interaction with the bHLH protein E47. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* (2000) doi:10.1006/mcbr.2000.0195.
 71. Muir, T., Sadler-Riggelman, I. & Skinner, M. K. Role of the basic helix-loop-helix transcription factor, scleraxis, in the regulation of Sertoli cell function and

- differentiation. *Mol. Endocrinol.* (2005) doi:10.1210/me.2004-0473.
72. Teo, Z. *et al.* Angiopoietin-like 4 induces a β -catenin-mediated upregulation of ID3 in fibroblasts to reduce scar collagen expression. *Sci. Rep.* (2017) doi:10.1038/s41598-017-05869-x.
73. Yoshimoto, Y. *et al.* Scleraxis is required for maturation of tissue domains for proper integration of the musculoskeletal system. *Sci. Rep.* (2017) doi:10.1038/srep45010.
74. Yin, L.-C. *et al.* Twist Expression in Circulating Hepatocellular Carcinoma Cells Predicts Metastasis and Prognoses. *Biomed Res. Int.* **2018**, 3789613 (2018).
75. Hu, X. *et al.* Elevated expression of ASCL2 is an independent prognostic indicator in lung squamous cell carcinoma. *J. Clin. Pathol.* (2015) doi:10.1136/jclinpath-2015-203025.
76. Wu, D.-C. *et al.* HEY2, a target of miR-137, indicates poor outcomes and promotes cell proliferation and migration in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **7**, 38052–38063 (2016).
77. Taleb, S., Abbaszadegan, M. R., Moghbeli, M., Roudbari, N. H. & Forghanifard, M. M. HES1 as an independent prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Gastrointest. Cancer* **45**, 466–471 (2014).
78. Schweitzer, R. *et al.* Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development* (2001) doi:10.1242/dev.001933.
79. Guiot, J., Moermans, C., Henket, M., Corhay, J.-L. & Louis, R. Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung* **195**, 273–280 (2017).
80. Drakopanagiotakis, F., Wujak, L., Wygrecka, M. & Markart, P. Biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Matrix Biology* (2018) doi:10.1016/j.matbio.2018.01.023.
81. Maldonado, M. *et al.* Upregulation and nuclear location of MMP28 in alveolar

epithelium of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (2018)
doi:10.1165/rcmb.2017-0223OC.

13.ANEXO – Artículo requisito para la obtención de grado



Article

The Transcription Factor SCX is a Potential Serum Biomarker of Fibrotic Diseases

Miguel Ramírez-Aragón ^{1,2}, Fernando Hernández-Sánchez ³, Tatiana S. Rodríguez-Reyna ⁴ , Ivette Buendía-Roldán ¹ , Gael Güitrón-Castillo ¹, Carlos A. Núñez-Alvarez ⁴, Diego F. Hernández-Ramírez ⁴, Sergio A. Benavides-Suárez ⁴ , Alexia Esquinca-González ⁴ , Ana Lilia Torres-Machorro ^{1,5,*} and Criselda Mendoza-Milla ^{1,*}

¹ Departamento de Investigación en Fibrosis Pulmonar, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, Alcaldía Tlalpan, Mexico City 14080, Mexico; mira0989@hotmail.com (M.R.-A.); ivettebu@yahoo.com.mx (I.B.-R.); gael-17@hotmail.com (G.G.-C.)

² Departamento de Neuropatología Molecular, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

³ Departamento de Investigación en Virología y Micología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, Alcaldía Tlalpan, Mexico City 14080, Mexico; fherndezsnchez@gmail.com

⁴ Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Av. Vasco de Quiroga 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, Alcaldía Tlalpan, Mexico City 14080, Mexico; sofarodriguez@yahoo.com.mx (T.S.R.-R.); nuac80df@gmail.com (C.A.N.-A.); diherram@gmail.com (D.F.H.-R.); benavidessergio.31@gmail.com (S.A.B.-S.); alexia_031@hotmail.com (A.E.-G.)

⁵ Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, Alcaldía Tlalpan, Mexico City 14080, Mexico

* Correspondence: ana.torres@iner.gob.mx (A.L.T.-M.); criselda.mendoza@iner.gob.mx (C.M.-M.); Tel.: +52-555-487-1700 (ext.5257) (A.L.T.-M. & C.M.-M.)

Received: 15 May 2020; Accepted: 7 July 2020; Published: 16 July 2020



Abstract: Fibrosing diseases are causes of morbidity and mortality around the world, and they are characterized by excessive extracellular matrix (ECM) accumulation. The bHLH transcription factor scleraxis (SCX) regulates the synthesis of ECM proteins in heart fibrosis. SCX expression was evaluated in lung fibroblasts and tissue derived from fibrotic disease patients and healthy controls. We also measured SCX in sera from 57 healthy controls, and 56 Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF), 40 Hypersensitivity Pneumonitis (HP), and 100 Systemic Sclerosis (SSc) patients. We report high SCX expression in fibroblasts and tissue from IPF patients versus controls. High SCX-serum levels were observed in IPF (0.663 ± 0.559 ng/mL, $p < 0.01$) and SSc (0.611 ± 0.296 ng/mL, $p < 0.001$), versus controls (0.351 ± 0.207 ng/mL) and HP (0.323 ± 0.323 ng/mL). Serum levels of the SCX heterodimerization partner, TCF3, did not associate with fibrotic illness. IPF patients with severely affected respiratory capacities and late-stage SSc patients presenting anti-topoisomerase I antibodies and interstitial lung disease showed the highest SCX-serum levels. SCX gain-of-function induced the expression of alpha-smooth muscle actin (α -SMA/ACTA2) in fibroblasts when co-overexpressed with TCF3. As late and severe stages of the fibrotic processes correlated with high circulating SCX, we postulate it as a candidate biomarker of fibrosis and a potential therapeutic target.

Keywords: bHLH transcription factor; idiopathic lung fibrosis; systemic sclerosis; TCF3

1. Introduction

The excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) components, such as collagen and fibronectin, in and around inflamed or damaged tissue defines fibrosis. This normal process is necessary for tissue repair; however, it can lead to permanent scarring and organ malfunction under pathological conditions. The cytokine TGF β is a central mediator of fibrogenesis commonly upregulated and activated in fibrotic diseases [1]. TGF β modulates fibroblast function and induces myofibroblast transdifferentiation in the process of fibrotic tissue remodeling [1,2].

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is a chronic and progressive Interstitial Lung Disease (ILD) of unknown etiology. It is characterized by persistent and progressive scarring of the lung parenchyma that ultimately leads to complete loss of pulmonary function. The prognosis is usually poor, with a median survival of 2 to 5 years without antifibrosis treatment [3]. Accurate diagnosis made by multidisciplinary teams of pulmonologists, radiologists, and pathologists sometimes requires invasive surgical lung biopsy. Despite bountiful research in the field, the natural history of the disease is variable, and progression remains unpredictable [3]. Hypersensitivity pneumonitis (HP) is also an ILD caused by inhalation of organic antigens that lead to diffuse immunopathologic reactions in the small airways and pulmonary parenchyma [4]. Approximately 10% of patients with continuous exposure develop chronic HP that may lead to lung fibrosis in a high number of patients.

Fibrosis is also a major pathological feature of several chronic autoimmune diseases such as Systemic Sclerosis (SSc) [5]. This disease is characterized by skin fibrosis, microvascular damage, and dysregulation of innate and adaptive immunity [6]. Clinical manifestations are heterogeneous, with a high percentage of patients developing generalized fibrosis in multiple organs, including the lung, with interstitial lung disease as the leading cause of death in these patients. Diagnosis remains challenging in patients with mild disease, or at early stages in the natural history of the disease.

Available biomarkers to aid the diagnosis and prognosis of fibrotic diseases are scant [7–10]. Examples include candidates informative of IPF susceptibility (MUC5B polymorphism and telomere shortening), diagnosis (MMP7 and CXCL13), differential diagnosis (MMP28) [11], and prognosis (KL6 and MMP7). Likewise, CXCL4, IL-6, IL-10, MMP9, and MMP12 are candidate biomarkers for SSc [12].

The basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor scleraxis (SCX) is involved in the embryonic development and function of ECM-rich tissues, including tendons and cardiac valves [13–15]. SCX actively participates in repairing and remodeling processes that require extracellular matrix synthesis [14,15]. However, defects in its regulatory function may lead to fibrosis in several organs, including the heart [16,17]. In a similar way to matrix proteins like fibronectin and the collagenase MMP2 [18,19], TGF β can regulate the SCX expression [17,20]. SCX has been reported as a crucial regulator of the maintenance of the fibroblast phenotype and is necessary for the epithelial to mesenchymal transition (EMT). SCX downregulation attenuates myofibroblast function and gene expression [21]. Likewise, in SCX knockout mice, the cardiac matrix is deficient, with evidence of impaired EMT, and with ~50% loss of cardiac fibroblasts [21].

As SCX is an extracellular matrix regulator with a crucial role in fibroblast function, we hypothesized that its abnormal regulation could be involved in pathological fibrogenesis of diseases such as IPF and SSc. In this manuscript, we show that SCX expression was elevated in primary cell cultures and lung biopsies from patients with IPF in comparison to controls. Relative SCX concentrations in blood serum remained low in healthy control subjects and HP patients, whereas patients with IPF and SSc presented high circulating SCX. Furthermore, severe IPF and late SSc cases had the highest circulating SCX levels, supporting SCX as a candidate fibrosis biomarker of severity.

2. Results

2.1. SCX Expression was High in Cells from Patients with Fibrotic Diseases

SCX expression was measured in the non-fibrotic cell lung lines CCD25Lu and CCD8Lu. SCX mRNA levels were higher in CCD8Lu fibroblasts in comparison with CCD25Lu (Figure 1a). Next, we tested the expression of SCX profibrotic target genes, finding that mRNA levels of genes encoding collagen (COL1A1 and COL1A2) and alpha-smooth muscle actin (α -SMA/ACTA2) were higher in CCD8Lu (Figure 1), the cell line that expressed more SCX.

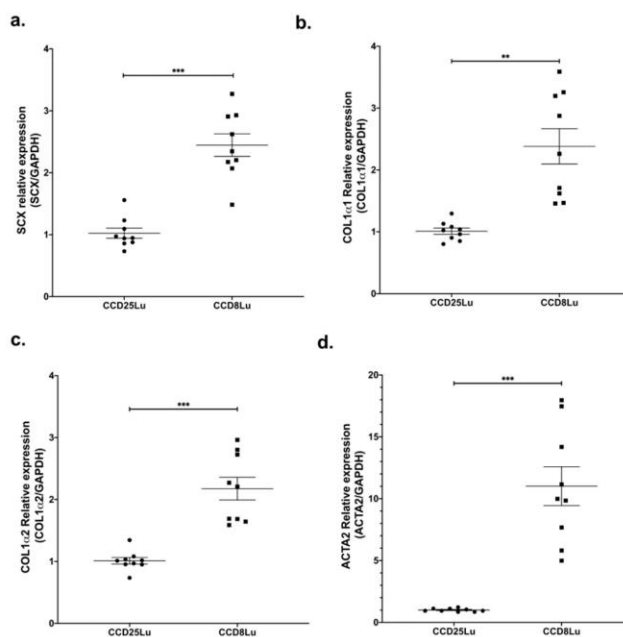


Figure 1. SCX expression levels in lung fibroblasts correlated with the expression of profibrotic genes. Expression of genes SCX (a), COL1A1 (b), COL1A2 (c), and α -SMA/ACTA2 (d) in pulmonary fibroblasts CCD25Lu and CCD8Lu. (a) Scleraxis expression was measured by qPCR using Taqman Hs03054634_g1 relative to GAPDH (Hs02786624_g1). Panels (b–d) correspond to COL1A1 (Hs00164004_m1), COL1A2 (Hs01028956_m1), and α -SMA/ACTA2 (Hs00426835_g1) expression relative to GAPDH, respectively. Statistical differences were assessed using the Student's t-test. ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

Due to its role in regulating the expression of profibrotic genes, we expected SCX expression to be higher in primary lung fibroblasts from patients with pulmonary fibrosis. Thus, we measured SCX in three different cultures derived from patients with IPF (characteristics of donors are in Table S1) versus primary fibroblasts from a healthy subject (NOVA).

SCX expression levels were variable; however, all three IPF lines showed higher levels of SCX against the control line (Figure 2a). Similar to the expression pattern found in CCD25Lu and CCD8Lu, high SCX expression in IPF fibroblasts led to higher expression of SCX target genes COL1A1, COL1A2, and α -SMA/ACTA2 (Figure 2b–d). This increase did not correlate directly with SCX levels, as in Figure 1. For example, HIPF231 fibroblasts with the highest SCX expression showed the lowest increase in expression of target genes, relative to the other IPF cultures. In contrast, HIPF375 and HIPF397 showed a higher increase in target genes expression despite expressing lower SCX levels in

comparison to HIPF231. Because functional SCX requires heterodimerization with E2A proteins [22,23], SCX expression was compared to TCF3 expression, which encodes the transcription factor E47 (Figure 2e). TCF3 levels were also variable among cultures: HIPF231 had about 25 times more SCX compared to TCF3, whereas HIPF375 and HIPF397 showed closer ratios of SCX/TCF3 relative mRNA levels (two- and sixfold, respectively). This fact supports previous findings that SCX function as a transcription factor is more efficient when adequate levels of its heterodimerization partner E47 allow structuring of the functional dimer [22,23]. Considering this, lines HIPF375 and HIPF397 showed high levels of expression of profibrotic genes COL1A1, COL1A2, and α -SMA/ACTA2.

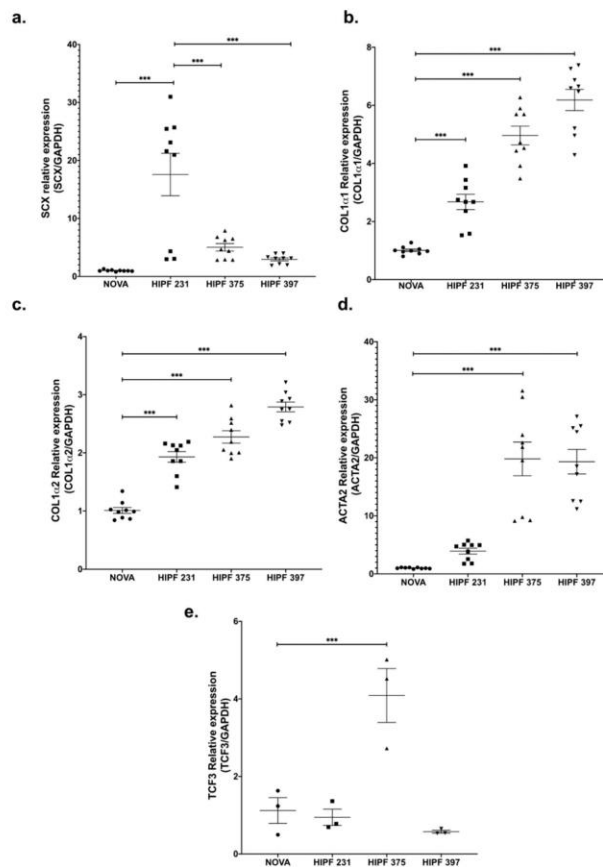


Figure 2. Gene expression of SCX and its target genes was high in IPF fibroblast primary cultures. mRNA levels of the indicated genes were quantified as in Figure 1 using cDNA samples from primary lung fibroblast cultures from a healthy donor (NOVA) and three IPF patients (HIPF). Relative expression of SCX (a), COL1A1 (b), COL1A2 (c), α -SMA/ACTA2 (d), and TCF3 (e). The statistical test used for this assay was one-way ANOVA. *** = $p < 0.001$.

2.2. SCX Expression and Localization was Different in Patients with IPF Compared to Controls

As the gene expression in fibroblasts in culture could be different from that observed in tissue, we measured SCX gene expression directly in biopsy-derived RNA from IPF patients. Two commercial

RNAs from healthy lung tissue were used as controls. We found high SCX expression in tissue from IPF patients relative to controls (Figure S1).

We, therefore, localized SCX by immunohistochemistry in lung tissue slides from both healthy controls and IPF patients. Our results revealed a positive label overall in the bronchiolar epithelium (Figure 3). Whereas, in IPF lungs, SCX was also present in fibroblast foci and inflammatory cells (Figure 3, samples 425-05, 428-16, and 442-16).

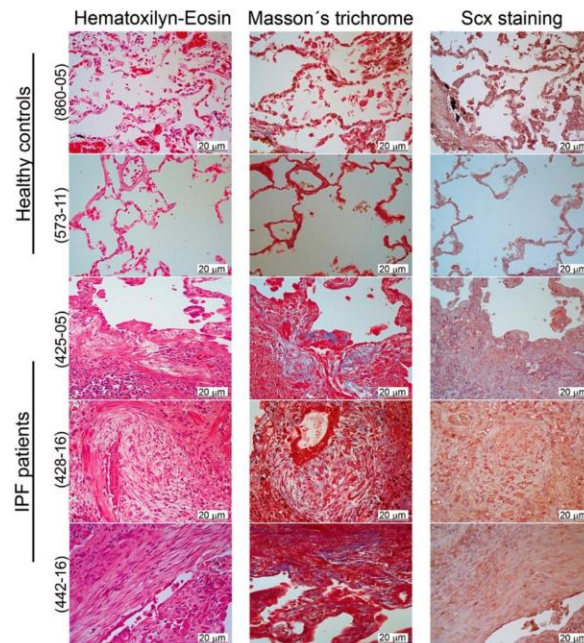


Figure 3. SCX expression was elevated in IPF tissue. Pulmonary tissue derived from IPF patients showed higher expression of SCX in comparison to healthy controls. Immunohistochemical analyses were made in two tissue samples from healthy controls (samples 573-11 and 860-05) and three IPF patients (425-05, 428-16, and 442-16). Samples were stained with hematoxylin–eosin and Masson’s trichrome. SCX was localized with a rabbit polyclonal antibody against human SCX (1:25; Antibodies online ABIN9670006). The fibroblastic foci in all IPF samples were localized in the center of each picture. In the hematoxylin–eosin stain, the fibroblastic foci were observed as pale areas composed of elongated cells, whose nuclei appeared stained with SCX (in the SCX stain). In the Masson’s trichome stain, the fibroblastic foci also showed blue coloring due to the presence of collagen.

The histological analyses confirmed differences in cell composition between normal and fibrotic lung. Healthy tissue was structured mainly by alveolar and muscle cells, whereas, in IPF tissue, alveolar spaces were replaced primarily by interstitial, mesenchymal origin cells, as previously reported [24]. This accumulation of SCX expressing cells could be responsible for SCX accumulation in IPF tissue. Thus, we hypothesized that SCX expression levels could correlate with the degree of fibrosis in patients with IPF.

2.3. Circulating SCX was Increased in IPF and SSc Patients Compared to Healthy Subjects

Given that SCX expression was high in cells and tissue from patients with IPF, we tested if SCX serum levels were also augmented when compared to healthy controls. Circulating SCX was also

measured in patients with two diseases with different forms of fibrosis: SSc and HP. All SSc patients have skin or internal organs fibrosis that may include the lung in up to 70% of patients, whereas fewer patients with HP develop pulmonary fibrosis. ELISA assays were used to measure SCX concentration in all cases.

For this part of the study, we included 56 IPF patients, 40 HP patients, 100 SSc patients, and 57 age-matched controls. Table 1 summarizes the demographic and clinical characteristics of the study population.

Table 1. Patients and controls characteristics.

	Controls	IPF	HP	SSc
Gender (M/F)	15/42	45/11	9/31	10/90
Average age (Years)	62 ± 7	66 ± 11	57 ± 12	45 ± 12
Age range	41–78	50–78	30–78	26–72
Smoking status (never/past/current)	28/0/14	17/8/26	30/5/5	58/32/9
Hypertension (positive/negative)	4/38	13/38	16/22	10/25
TLC (% of predicted value)	105 ± 13	64 ± 16	62 ± 22	-
FVC (% of predicted value)	91 ± 19	72 ± 21	67 ± 25	86 ± 34
DLCO (% of predicted value)	-	54 ± 23	46 ± 25	-
Lymphocytes BAL (%)	-	10 ± 9	40 ± 25	-
Macrophages BAL (%)	-	88 ± 33	58 ± 29	-
SSc classification (limited/diffuse) (limited/diffuse)	-	-	-	57/43
SSc progression (early/late)	-	-	-	51/49
mRSS	-	-	-	10 ± 9

SCX serum levels were found significantly increased in both SSc (0.611 ± 0.296 ng/mL, $p < 0.01$) and IPF patients (0.663 ± 0.558 ng/mL, $p < 0.001$) compared to healthy controls (0.351 ± 0.207 ng/mL) (Figure 4). SCX concentration in sera from HP patients (0.323 ± 0.323 ng/mL) did not differ from controls.

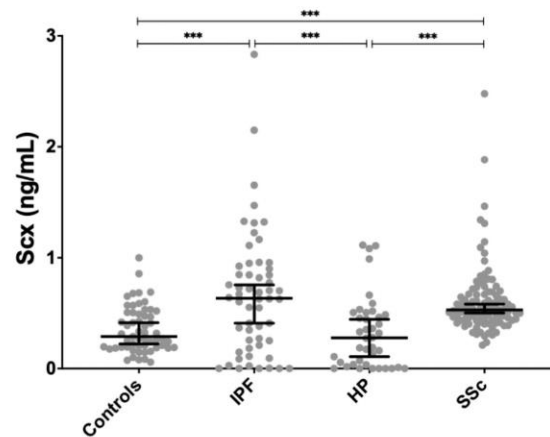


Figure 4. SCX serum concentrations were significantly higher in patients with IPF and SSc compared to controls. SCX serum levels in patients with HP were not different from controls but differed significantly from patients with IPF and SSc. *** = $p < 0.001$.

Taking into consideration the existence of potential risk factors [25–27] and attempting to find other relevant associations, IPF patients were further categorized based on clinical data: smokers, non-smokers, ex-smokers, hypertensive [28], BMI, age, and sex (Figure 5). A comparison of SCX levels among those groups showed a significant increase in circulating SCX levels in non-smokers and hypertensive patients ($p < 0.05$) in contrast with the control group (Figure 5a). Non-obese IPF patients had significantly higher SCX levels (Figure 5b) in comparison with controls, as well as male subjects and patients aged >61 years old (Figure 5c). The control groups did not show statistical differences in SCX concentrations when classified by demographic data (Figure S2).

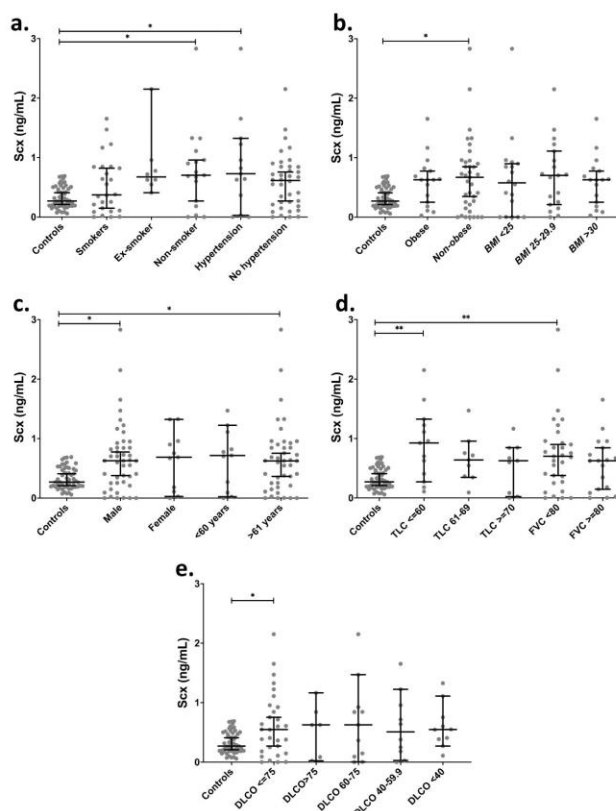


Figure 5. IPF patients with severely affected pulmonary function showed higher levels of circulating SCX. SCX serum levels grouped by (a) smoking habit and hypertension, (b) BMI, (c) sex and age, (d) TLC and FVC, and (e) DLCO. Supplementary file 2 includes an excel file with raw data. Higher SCX serum levels were found in patients with severely diminished TLC ($\leq 60\%$) and with FVC below 80%. Ex-Smoker: patient that has not smoked for at least one year. Non-Smoker: patient with no smoke habit. Hypertension: values above 139 mmHg in systolic pressure and 89 mmHg in diastolic pressure were considered as hypertension [28]. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$. Total Lung Capacity (TLC): maximum volume of air present in the lungs. A normal person can inhale approximately 6 L. Forced Vital Capacity (FVC): volume of air that can be forcibly blown out after a full inspiration. Normal values are approximately 4.6 L [29].

IPF patients were also categorized based on pulmonary function tests (Figure 5d,e). Categories included Total Lung Capacity (TLC), classified as a severe decrease for patients with a capacity lower than 60%, as a moderate decrease for TLC between 61% and 69% and as acceptable for TLC over 70%. The Forced Vital Capacity (FVC) was classified into two categories: FVC below and over 80%. Groups with severely decreased TLC ($\leq 60\%$) and FVC $< 80\%$ showed significantly higher levels of serum SCX relative to controls (Figure 5d), suggesting an association between high SCX and late or severe fibrotic stages.

Similarly, patients with single-breath carbon monoxide diffusing capacity (DLCO) values below 75% showed also higher levels of circulating SCX (Figure 5e). Additionally, the classification of SCX serum levels based on the cellular composition of bronchoalveolar lavages (BAL) did not show statistical differences in any category (Figure S3).

Clinical data grouping of SCX levels in SSc patients showed significant differences ($p < 0.01$) between healthy controls and SSc patients (mean 0.35 vs. 0.61 ng/mL). There were also statistically significant differences between groups of ex-smokers, non-smokers, and BMI < 25 in comparison with the control group (Figure 6a). The serological profile of SSc patients relative to controls showed the highest statistical difference in SCX levels in groups having anti-topoisomerase I antibodies and no anti-centromere antibodies (ACA) (Figure 6b). Even though most patients with SSc are women, higher SCX levels in serum were found in male patients (Figure 6c).

Depending on the time of evolution of SSc, the progression is classified as early or late (see methods). The cohort in this study included patients belonging to both groups. Late-stage SSc patients showed the statistically highest difference in SCX levels compared to the control group. Diffuse and limited SSc variants also showed differences in SCX concentrations relative to controls but not between them (Figure 6e). Moreover, while in dcSSc patients (those with more severe disease) SCX levels remain high over time, there is a negative correlation between SCX levels and time of evolution in late lcSSc patients ($p = 0.05$, correlation coefficient -0.37).

SSc patients were also classified by internal organ involvement, including associated pulmonary fibrosis, pulmonary arterial hypertension, cardiac, gastrointestinal, renal, muscular, and joint involvement. The groups that showed statistically higher circulating SCX when compared to the healthy control group were pulmonary fibrosis, gastrointestinal involvement groups (GI), and arthritis (Figure 6d). The SCX values did not differ between FVC below or over 80% (Figure 6e).

When the HP population was compared to the control group, it did not show any difference in SCX concentrations; however, it was statistically different from the SCX values in SSc and IPF groups (Figure 4). No statistical differences were discovered when the SCX concentration of HP patients was further categorized by clinical data (Figure S4).

These results revealed higher SCX serum concentrations in patients with fibrotic diseases (IPF and SSc) versus healthy subjects. In patients with IPF, high SCX concentrations correlated with severe lung damage, measured through plethysmography and spirometry (TLC ≤ 60 and FVC < 80). In patients with SSc, SCX levels were increased in later stages of the disease and in patients with anti-topoisomerase I antibodies, pulmonary fibrosis (ILD-SSc), and gastrointestinal involvement. These data suggest that SCX is associated with the progression and severity of the fibrotic disease.

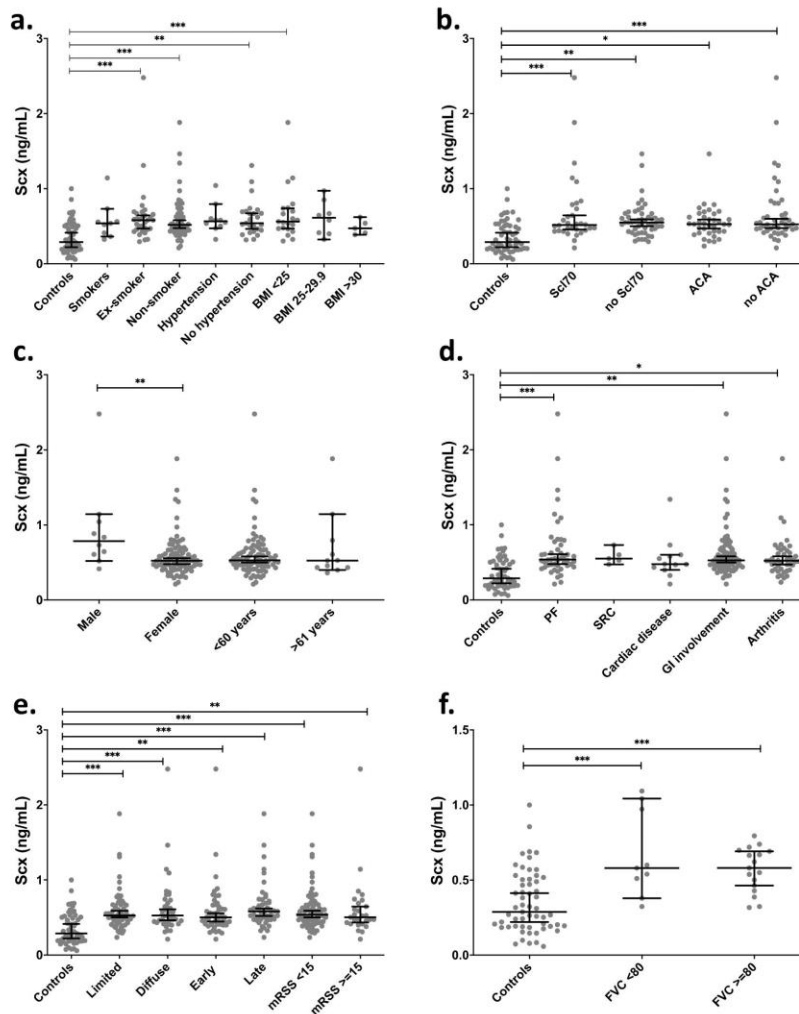


Figure 6. SCX serum levels were high in late progression SSc patients and patients suffering associated pulmonary fibrosis. SCX circulating levels were grouped by (a) smoking habit and BMI, (b) serologic profile, (c) sex and age, (d) internal organ involvement, (e) classification and progression, and (f) FVC. Supplementary file 2 includes an excel file with raw data. Secondary organ involvement comprised pulmonary fibrosis (PF), scleroderma renal crisis (SRC), and gastrointestinal involvement (GI). The GI included esophageal dysmotility, esophageal stricture, small bowel hypomotility or dilation, small bowel bacterial overgrowth, malabsorption syndrome, or use of parenteral nutrition. (d) SSc classification and progression. * = $p < 0.05$. ** = $p < 0.01$. *** = $p < 0.001$. Scl70 = anti-topoisomerase I antibodies.

2.4. Circulating TCF3 Levels were Similar among Controls, and IPF and SSc Patients

Because SCX, as a functional transcription factor, heterodimerizes with E47 (TCF3), we measured TCF3 concentration in serum from patients and controls using an anti-TCF3 ELISA. We included seven IPF patients, eight HP patients, 21 SSc patients, and seven age-matched controls from the cohorts where circulating SCX was quantified. TCF3 levels were very high in all patients and healthy subjects, with all groups averaging values above 5 ng/mL (Figure 7). HP patients averaged the lowest circulating TCF3 (5.2 ± 2.6 ng/mL), whereas SSc patients had the highest average TCF3 serum levels (8.3 ± 4.2 ng/mL). Differences among tested groups were not statistically significant.

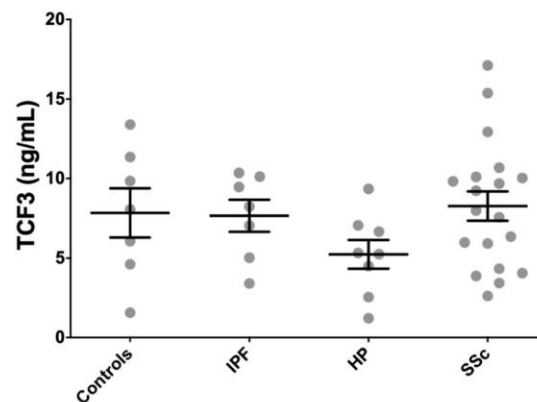


Figure 7. TCF3 serum levels did not associate with fibrotic illness. TCF3 serum levels in all patients and healthy subjects were similarly high.

2.5. SCX Gain-of-Function Experiments Validated its Role in Lung Fibrosing Gene Expression

Elevated α -SMA/ACTA2 expression is a hallmark of fibrotic phenotype conversion. Thus, we evaluated the effect of SCX overexpression in CCD8Lu cells transduced with an adenoviral vector. SCX protein levels were highly induced 48 h after transduction (Figure 8). However, the expression of the target protein alpha smooth-muscle-actin (α -SMA/ACTA2) remained unchanged when compared to transduction with the empty vector. We reasoned that this result could be due to very low to absent TCF3 expression in CCD8Lu cells. Thus, TCF3 and SCX were co-overexpressed through the transduction of CCD8Lu cells, using independent TCF3 and SCX adenoviral vectors. This co-overexpression resulted in an induction of α -SMA/ACTA2 expression in comparison to cells transduced individually with the empty vector, SCX, or TCF3 (Figure 8).

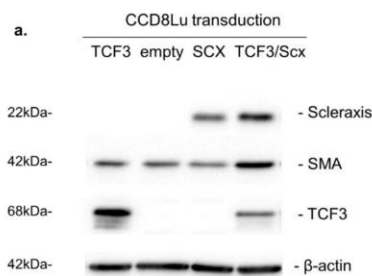


Figure 8. Cont.

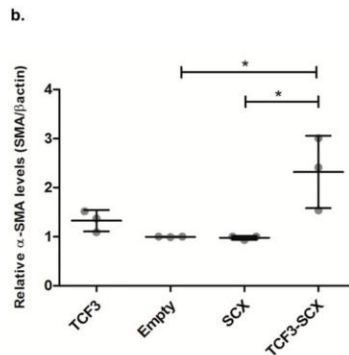


Figure 8. SCX overexpression promoted an induction in α -SMA expression that was dependent on TCF3. (a) The expression of the indicated proteins was analyzed using immunoblots. CCD8Lu cells were transduced with adenoviral vectors for 48 h. The infective particles included an empty vector as a control, and adenoviral vectors encoding SCX, TCF3, and a combination of SCX and TCF3. (b) Densitometric analyses of α -SMA induction relative to β -actin, quantifying three independent samples of each transduction. A one-way ANOVA test confirmed statistical differences in α -SMA expression in empty vs. TCF3-SCX samples. * $p = 0.0086$.

3. Discussion

SCX is a matrix regulator, particularly for collagen gene expression in tendons, skin, and heart [13–15,17,21,30–33]. SCX expression has been reported in the lung without further characterization [34,35]. Herein, we found differences in SCX expression between two lung fibroblast cell lines (CCD25Lu and CCD8Lu). The fibroblast line expressing more SCX also showed higher levels of target genes COL1A1, COL1A2, and α -SMA/ACTA2, suggesting an SCX role in promoting target gene expression in lung fibroblasts. Because the cell line donors were aged 7 and 48 years old, respectively, age differences could influence the variable expression of the genes of interest. SCX expression changes throughout life: it is global during embryogenesis and becomes restricted to physical strength tissues like tendons during development and in adult organisms [36,37].

Abnormal expression of SCX plays a fundamental role in pathological processes in the heart and kidney [17,21,31]. For example, during mitral heart valve prolapse, high SCX levels promote the abnormal expression of proteoglycans and other ECM components [38]. Similarly, in cardiac fibrosis, the SCX dysregulation promotes exacerbated ECM synthesis, the formation of focal adhesions and tension fibers, and diminished migration and proliferation of cardiac cells [19,21,31,39]. In diabetic nephropathies, SCX also activates the expression of α -SMA/ACTA2 and bone morphogenetic protein 4, to promote differentiation of mesangial cells into activated myofibroblasts [40]. The above SCX roles in fibrotic diseases led us to analyze its role in pathological ECM deposition during lung fibrosis. When analyzing SCX expression in three primary fibroblast cell lines derived from patients with IPF, high levels were found in comparison with a normal fibroblast cell line. The expression of target genes was also high when compared to controls, but it did not correlate directly with SCX levels. When the expression of the gene encoding SCX heterodimerization partners (TCF3) was analyzed, we found variability in its mRNA levels. The ratio of SCX/TCF3 levels was very high for HIPF231, whereas HIPF375 and HIPF397 ratios were similar between them, and about five times lower in comparison to the HIPF231 rate. A previous report found that very high levels of SCX in an environment with low TCF3 levels did not result in high induction of SCX target genes [23].

Similarly, in our SCX gain-of-function experiments, SCX functionality and target gene induction were only observed when TCF3 was co-overexpressed in CCD8Lu cells, where basal TCF3 expression is deficient. HIPF231 expresses low TCF3 relative to SCX levels, correlating with the lowest activating

capacity of target gene expression of all three IPF cultures tested. In the HIPF375 and HIPF395 fibrotic cell cultures, TCF3 levels were more balanced relative to SCX, and COL1A1, COL1A2, and α -SMA/ACTA2 expression were also more elevated.

Considering that cultured primary fibroblasts from IPF could have altered expression due to *in vitro* culture conditions, we also tested SCX expression in RNA extracted directly from lung biopsies derived from patients with IPF. Again, SCX expression was higher in comparison with commercial tissue controls, which was in complete agreement with the histological data. Nevertheless, it remains unknown if the increased levels of SCX mRNA in the disease indicate higher expression of individual cells, higher fibroblast accumulation, or both.

SCX expression in lung biopsies demonstrated that control and fibrotic lung tissue localized SCX expression to different cells: whereas it localized predominantly to the bronchiolar epithelium in the healthy lung, its presence was extended to fibroblast foci in biopsies from IPF patients. We propose that the accumulation of cells of mesenchymal origin in alveolar spaces could be responsible for high SCX expression in tissue from patients with pulmonary fibrosis. However, we cannot establish yet if SCX expression in these circumstances is a cause or a consequence of fibrosis.

Thus, high SCX expression in tissue and fibroblasts derived from IPF lungs in comparison to controls is characteristic of the disease. An example of another candidate bHLH tissue biomarker is ASCL2, a transcription factor involved in tumoral progression [41] that exhibits high abnormal expression in progressive cancer. Because of this, it was proposed as a prognosis biomarker in breast cancer, osteosarcoma, and lung squamous cell carcinoma [41–43]. In a similar way to ASCL2, the original SCX function was described as relevant in embryonic development; however, its high abnormal expression in tissue characterizes pulmonary fibrosis. SCX circulating levels were elevated in serum from IPF and SSc patients, whereas circulating protein levels in controls and patients with HP remained low. For both IPF and SSc, severe cases correlated with higher SCX levels in serum. IPF patients with critical pulmonary capacity loss: TLC \leq 60% and FVC $<$ 80% had higher SCX in serum. Lung function decline is related to the severity of IPF. Because we can measure circulating SCX in a noninvasive way, we propose SCX as a candidate biomarker of the severity of IPF.

Furthermore, SSc patients had higher SCX levels than controls, particularly those in late stages of the disease, and with anti-topoisomerase I autoantibodies. As a systemic disease, in SSc, many factors have local and systemic effects on specific tissues that have been associated with severity and progression [44]. Circulating anti-topoisomerase I antibodies (Scl70) have been linked to diffuse disease and the presence and severity of interstitial lung diseases [45]. Scl70 is a poor prognosis marker due to the possibility of associated heart and kidney involvement as part of the fibrotic processes [46,47]. Patients with high SCX levels and anti-topoisomerase I antibodies usually do not have anti-centromere autoantibodies (ACA) in serum; these antibodies are mutually exclusive in the disease most of the time [48]. Thus, when ACA are present, the condition is usually milder, and there is a lower frequency of associated pulmonary fibrosis. Serological profile results are in complete agreement with organ involvement results, where patients with pulmonary fibrosis also had high SCX serum levels in comparison to controls. Therefore, in a similar way to IPF cases, high SCX in serum from SSc patients was also associated with severe cases with the worst prognosis.

SSc patients with gastrointestinal involvement also had high SCX levels, probably reflecting the systemic involvement of the disease and the frequent visceral involvement; however, SCX levels did not correlate with the severity of gastrointestinal involvement. Even though SSc is more prevalent in women, men with the disease showed remarkably higher circulating SCX levels. This result could be related to the poorer prognosis and higher severity of the disease in male SSc patients when compared to female SSc patients [49]. Contrary to SSc, patients with IPF are predominantly males; however, in this condition, SCX levels were similar in women and men.

SCX protein expression was analyzed in the murine pulmonary fibrosis model (induced by a single intratracheal instillation of bleomycin) [50]. We observed a nonsignificant trend towards higher SCX protein levels in the lungs from mice that developed pulmonary fibrosis (Figure S5 and

Supplementary file 1—supplementary methods). After finding high circulating SCX in patients with SSc, the murine model of this disease was also established [51]. Even though collagen levels in the skin increased considerably after 28 days of bleomycin treatment, SCX protein levels remained unchanged. Lungs from mice treated with subcutaneous bleomycin did not develop pulmonary fibrosis, nor increased SCX expression (Figure S6). That led us to suspect that circulating SCX in SSc could be derived from organ fibrosis, probably from lung, and not from skin fibrosis. IPF associated epithelial loss contrasts with skin fibrosis that is characterized by the accumulation of fibroblasts and collagen instead of having a significant cell loss.

TGF β has a central role in severe fibrotic diseases, including IPF, fibrotic heart diseases, systemic sclerosis, and diabetic nephropathy [52,53]. Stimulation with TGF β in cardiac fibroblasts induces an increase in SCX expression [18], which was also observed by our group in lung fibroblasts (Figure S7). These data suggest that dysregulation of SCX expression in pathological fibrogenesis could be due to altered TGF β production. Interestingly, TGF β stimulation induces expression of other profibrotic genes, including α -SMA/ACTA2. Similarly, SCX/TCF3 overexpression can drive the elevated expression of α -SMA/ACTA2 independently of TGF β . This information makes SCX a potential therapeutic target whose alteration would likely be less pleiotropic than targeting TGF β .

It remains to be investigated why there are high levels of a transcription factor circulating in the blood, as they are usually compartmentalized in the cell nucleus to regulate gene expression. We know that SCX is stable enough in serum and produced in enough quantities to be detected by conventional ELISA tests. Because circulating TCF3 levels were high in healthy subjects and all patients, it is not a useful candidate biomarker. However, circulating SCX may be heterodimerizing with TCF3, promoting both factors stabilization and functionality. Furthermore, high circulating TCF3 levels could relate to high intracellular expression, a relevant condition for SCX functionality.

Nevertheless, we do not know yet if a specific cell receptor can recognize SCX and if its free serum form induces distinct cellular responses. Circulating SCX could be a reflection of cell death. Lung epithelial cells injury, activation, and apoptotic death are characteristic of pulmonary fibrosis [54]. Thus, it is also possible that SCX levels increase in serum due to cell damage and release of internal factors into the bloodstream.

SCX has been used as a marker for tendons and ligaments differentiation [37]. Here, we propose SCX as a candidate biomarker of severity of the fibrotic disease because high levels were found in severe cases of two fibrotic diseases. In contrast, low levels prevailed in healthy controls and HP, an inflammatory lung disease with few fibrotic cases. SCX as a biomarker will probably be more useful if applied together with other noninvasive IPF and SSc markers in a diagnostic-prognostic panel including chemokines (CCL18 and CXCL13), interleukins (IL-6, IL-13, and IL-8), and metalloproteinases (MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, and MMP28) [7,55–57], once validated as fibrosis markers.

SCX overexpression promoted elevated expression of target genes only when TCF3 was co-overexpressed. This result contrasts with previous reports where individual SCX overexpression induced increased expression of targets, including Twist, Snai1 [58], MMP2 [18], fibronectin 1 [19], and fibrillar collagens [21]. Because the cell context is critical in gain-of-function assays [59–62], we reasoned that cell cultures used in previous studies probably expressed adequate basal levels of TCF3, allowing the structuring of functional SCX/TCF3 heterodimers when SCX was overexpressed. Likewise, cell cultures used in the SCX publications above were derived from mice in comparison to the human cell cultures used in this work. Importantly, individual TCF3 overexpression did not promote elevated expression of α -SMA/ACTA2, confirming the SCX requirement for fibrosing gene activation.

SCX could be a therapeutic target, due to its confirmed involvement in the activation of fibrosing gene expression, together with the observed higher expression in cells, tissue, and serum derived from patients affected by severe fibrotic diseases. We suggest that the attenuation or blockade of its activity could be potentially useful as a novel therapeutic strategy. One of the advantages of targeting this molecule instead of TGF β is that SCX and TCF3 work downstream from TGF β , and their blockade

would theoretically not alter the other pleiotropic and immunomodulatory activities of this molecule. Additional studies on this pathway should be performed.

4. Conclusions

This research is the first attempt to define high SCX expression in human lung and skin fibrosis. Our data suggest SCX as a candidate biomarker useful in identifying the severity of fibrotic diseases. This information could aid in the design of therapeutic strategies of suppression of SCX function, or in the construction of a noninvasive panel of relevant biomarkers of fibrotic diseases that will potentially enhance prognostic information for fibrotic pathologies.

5. Materials and Methods

5.1. Study Population

Selected patients (Table 1) were male and female over 25 years old with a previous diagnosis of IPF ($n = 56$) or HP ($n = 40$) from the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), Mexico. Patients did not show acute exacerbation of IPF, HP, or some other respiratory disease at the moment of sample collection. The diagnosis was made based on ATS/ERS/JRS/ALAT guidelines criteria [3].

Patients from the SSc cohort were recruited at the Department of Immunology and Rheumatology of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). All patients were at least 18 years old at enrolment, and ($n = 100$) fulfilled the 2013 ACR SSc criteria [63]. At enrollment and every year, they underwent a standardized clinical evaluation that included the modified Rodnan Skin Score (mRSS) and all items included in the Medsger severity scale [64]. Results were recorded from the complete blood count, ESR, creatinine, liver function tests, urinalysis, spirometry, chest X-ray, or high-resolution chest tomography (HRCT), and transthoracic echocardiogram (TTE).

Patients were classified as diffuse (dcSSc) or limited (lcSSc) SSc according to the extent of skin involvement. If patients had skin involvement above the elbows or knees, which could include thorax or abdomen at any time in the course of the disease, they were classified as dcSSc. If the skin involvement was only distal to elbows and knees and never affected thorax or abdomen, the disease was classified as lcSSc. Early and late classification differed between dcSSc and lcSSc. Patients with lcSSc were considered in an early phase if they had up to five years of evolution of the disease from the first symptom attributable to the disease, while dcSSc patients were considered in an early phase if they had up to three years of evolution of the disease.

Control groups were healthy males and females over 40 years old ($n = 57$) with no signs of respiratory disease that volunteered at the INER. The Ethics Committees at both, INER and INCMNSZ, approved the project and research protocol. All patients and control subjects were informed about the purpose of the study and signed informed consent to participate.

5.2. Blood Samples

Donated blood samples were collected in BD Serum Separator tubes (SST) at the time of diagnosis, with no previous treatment, for IPF, SSc, and HP. The IPF, HP, and healthy control samples belong to the biobank Interstitial Diseases Service at INER. SSc samples were obtained at different times during the natural history of the disease, and progression was classified as indicated above. The serum was separated from the clot by centrifuging at $2000\times g$ for 10 min and frozen in aliquots until used.

5.3. SCX and TCF3 Quantification in Blood Serum

SCX and TCF3 concentrations in serum were determined by ELISA assays specific for the human scleraxis homolog A (SCXA) (Cloud-Clone Corp SEN 330Hu, Cloud-Clone Corp, Katy, TX, USA) and the human TCF3 (Abxexa abx250990, Abxexa, Cambridge, UK) following the instructions of the manufacturers. Duplicate undiluted samples were quantified, and SCX and TCF3 concentrations were calculated using standard curves for each assay.

5.4. Cell Culture

Human primary fibroblasts from healthy and IPF were isolated from lung biopsies, as previously described [65]. Cells were maintained in growth medium (Ham's-F12, GIBCO Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10 % fetal bovine serum, penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 µg/mL) until 80% confluence was reached. Primary control cultures were named NOVA, whereas HIPF231, HIPF375, and HIPF397 were primary IPF cultures. Table S1 includes the donor characteristics of primary lung cell cultures. Human normal lung fibroblasts—CCD25-Lu and CCD8-Lu—from the American Type Culture Collection, were cultured in DMEM medium (GIBCO Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented as above. All cell cultures were maintained in T-25 flasks at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% carbon dioxide. CCD8-Lu fibroblasts for transduction experiments were grown as above, but the medium was supplemented with 10% newborn calf serum.

5.5. Real-Time PCR

Total RNA from IPF tissues and cultured fibroblasts were extracted using the TRIzol™ reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Two commercial human normal lung RNAs were used (Ambion AM7968, Ambion, Austin, TX, USA, and Origene HT1009, Origene, Rockville, MD, USA) as tissue controls to compare with RNA extracted from biopsies. RNA samples were reverse transcribed into cDNA using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed using LightCycler® 480 System (Roche, Basel, Switzerland) with TaqMan probes (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) labeled with FAM (Hs03054634_g1 for SCX, Hs00164004_m1 for COL1A1, Hs01028970_m1 for COL1A2, Hs00426835_g1 for α -SMA/ACTA2, and Hs01012685_m1 for TCF3) and VIC (Hs02786624_g1 for GAPDH and Hs02800695_m1 for HPRT).

5.6. Western Blotting

Cultured fibroblasts were lysed with the RIPA buffer (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) containing a protease inhibitors cocktail (Calbiochem, Set V) and PMSF. After a 60 min incubation on ice, cells were sonicated, and cell debris was removed by centrifugation at 20,000× g for 20 min at 4 °C. Supernatants were collected, and protein concentrations were determined using the Bradford method. Forty micrograms of total extract was separated in 10–12% SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and blocked with 5% milk in Tris-buffered saline with Tween 20 0.05% (TBS-T) for 1 h. Three micrograms of protein was used for SCX gain-of-function blots. Membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies: anti-SCX (1:600; Thermo Scientific PA5-23943, Waltham, MA, USA), anti- β -actin (1:200; Santa Cruz Biotechnology Inc. SC-47778, Dallas, TX, USA, or 1:10,000; Sigma A5441, St. Louis, MO, USA), anti-TCF3 (1:500; Thermo Scientific PA5-20900, Waltham, MA, USA), anti-Smooth Muscle Actin (1:500, Sigma A2547, St. Louis, MO, USA), and anti-vinculin (1:500, Santa Cruz Biotechnology Inc. SC-73614, Dallas, TX, USA). SCX in lung and skin tissue was detected with anti-SCX (1:200; Abcam ab58655, Cambridge, UK) after blocking with 5% BSA in TBS-T. Incubation with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (anti-mouse and anti-rabbit IgG; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was performed for 1 h at room temperature. The signal was visualized with the Super Signal West Pico Enhanced Chemiluminescence detection system (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and normalized against β -actin or vinculin. Densitometric analyses were made with the Image Lab software 6.0 from Bio-Rad, Hercules, CA, USA.

5.7. Immunohistochemical Staining

We examined the localization of SCX in three IPF and three healthy lung tissues. Immunohistochemical analyses were performed as described [66]. Briefly, paraffin-embedded lung tissues were obtained from biopsy or autopsy specimens of individuals with IPF or HP, and controls,

in compliance with institutional review board-approved protocols. Three millimeter lung sections were dewaxed and rehydrated, and peroxidase activity was blocked with 3% H₂O₂ in methanol for 30 min, followed by a citrate buffer treatment to retrieve the antigen. The lung sections were incubated overnight at 4 °C with an anti-human SCX rabbit polyclonal antibody (1:25; Antibodies online ABIN9670006). A secondary biotinylated anti-immunoglobulin, followed by horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (DAKO LSAB[®]2 System-HRP, Dako North America, Inc. K0609, Carpinteria, CA, USA) and the 3-amino-9-ethyl-carbazole (BioGenex, HK129-5K, San Ramon, CA, USA) substrate were used following the manufacturer's instructions. Pictures of the hematoxylin-counterstained slides were acquired with a Nikon microscope equipped with the NIS-Elements AR software.

5.8. Adenoviral Vectors Construction and Transduction

SCX and TCF3 infective adenoviral particles were prepared using the Adeno-X adenoviral system three (Clontech, Mountain View, CA, USA). Human SCX (0.6Kb) was subcloned from the cDNA clone SC316344 (OriGene, Rockville, MD, USA) into pAdenoX-DsRedExpress using the inFusion HD cloning kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) and the following primers; adeno-SCXh-F: GTAACATAACGGTCATGTCCTTCGCCACGCTGCG and adeno-SCXh-R: ATTACCTCTTCTCCCTCCTAACTGCGAATCGCTGTCT. Human TCF3 (E47) was amplified from cDNA derived from the CCD25 fibroblast line and cloned into the pCMV6-XL5 vector using the KpnI and XbaI restriction sites included in the following primers; KpnI-TCF3-F CCTCCTGGTACCAATGAACCAGCCGAGAGG, and TCF3-XbaI-R CCTCCTCTAGACGA GAGACACGGGACTTTTATAC. TCF3 (E47, 1.96Kb) was further subcloned into pAdenoX-DsRedExpress with the inFusion (Clontech) technology and the following primer pair; ad-TCF3-F GTAACATAACGGTCATGAACCAGCCGAGAGGATGGC and ad-TCF3-R: ATTACCTCTT CTCCTCACATGTGCCCGGGGGTT. For packaging, PacI linearized recombinant adenoviral vectors (SCX, TCF3, and empty vector) were transfected (Lipofectamine) into Adeno-X 293 cells (Clontech, Mountain View, CA, USA). We used the Adeno-X-Maxi Purification Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) to purify adenoviral particles from a thirty P100 culture-dishes pellet. These cell cultures had reached 50% of the cytopathic effect. Adenoviral titers were calculated using the Clontech Adeno-X Rapid Titer Kit. Titers were as follows. Empty: 1.3×10^9 infectious units per mL (IFU/mL); SCX: 1.82×10^9 IFU/mL; and TCF3: 6.95×10^8 IFU/mL.

CCD8Lu cells were seeded at 80% confluence on 6-well plates. After 24 h, cells were washed with PBS and transduced in DMEM media with no serum, using a Multiplicity of Infection (MOI) of 50 for each well. Cells were maintained under standard culture conditions for 48 h. The infection of the majority of the cells per well was verified using epifluorescence microscopy detecting the Red Fluorescent Protein (RFP) expression driven from all vectors. Then cells were washed with PBS, lysed, and harvested for protein or RNA, which were subsequently used for Western blot and quantitative PCR analyses, respectively.

5.9. Statistical Analyses

Results are presented as the median \pm 95% CI for the SCX ELISAs and as the mean \pm standard deviation (SD) for the TCF3 ELISAs. Statistical differences were analyzed by the one-way ANOVA test and the Tukey multiple comparison tests. Differences with probability values <0.05 were considered statistically significant. Data were analyzed using the statistical program GraphPad Prism 5.00 for Windows (GraphPad Software).

5.10. Ethics Approval and Consent to Participate

All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committees at INER (B15-14) and INCMNSZ (IRE-2557-18-20-1) approved this

project and research protocols. All patients and control subjects were informed about the purpose of the study and signed informed consent to participate.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/14/5012/s1>.

Author Contributions: M.R.-A., F.H.-S., A.L.T.-M., and C.M.-M. contributed substantially to the design of research, experimental procedures, and writing. T.S.R.-R. and I.B.-R. were responsible for patients' diagnosis and SSC and IPF biobanks. G.G.-C., C.A.N.-A., D.F.H.-R., S.A.B.-S., and A.E.-G. were responsible for obtaining, processing, and organizing the samples and clinical data. All authors read and approved the final manuscript.

Funding: The following CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) grants to C. Mendoza-Milla supported this work: CONACyT-SALUD 2015-1-261961 and Cátedras-CONACyT: U000320157-266189.

Acknowledgments: This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for M. Ramírez-Aragón. The CATEDRAS CONACyT 282 program also supported A.L. Torres-Machorro. The Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Mexico and Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM; supported M. Ramírez-Aragón to obtain the Ph.D. degree. We thank Guadalupe Hiriart Valencia and Erika Monterrubio Flores for technical support for tissue processing. Héctor Arizpe-González provided technical support in the construction and preparation of infective adenoviral particles. Anita Vega Miranda offered technical assistance for cell culture and RNA processing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Biernacka, A.; Dobaczewski, M.; Frangogiannis, N.G. TGF-beta signaling in fibrosis. *Growth Factors* **2011**, *29*, 196–202. [[CrossRef](#)]
2. Hinz, B.; Phan, S.H.; Thannickal, V.J.; Galli, A.; Bochaton-Piallat, M.L.; Gabbiani, G. The myofibroblast: One function, multiple origins. *Am. J. Pathol.* **2007**, *170*, 1807–1816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Raghu, G.; Remy-Jardin, M.; Myers, J.L.; Richeldi, L.; Ryerson, C.J.; Lederer, D.J.; Behr, J.; Cottin, V.; Danoff, S.K.; Morell, F.; et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2018**, *198*, e44–e68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Selman, M. Hypersensitivity pneumonitis: A multifaceted deceiving disorder. *Clin. Chest Med.* **2004**, *25*, 531–547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wynn, T.A.; Ramalingam, T.R. Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 1028–1040. [[CrossRef](#)]
6. Allanore, Y.; Simms, R.; Distler, O.; Trojanowska, M.; Pope, J.; Denton, C.P.; Varga, J. Systemic sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2015**, *1*, 15002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Drakopanagiotakis, F.; Wujak, L.; Wygrecka, M.; Markart, P. Biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2018**, *68–69*, 404–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Hasegawa, M. Biomarkers in systemic sclerosis: Their potential to predict clinical courses. *J. Dermatol.* **2016**, *43*, 29–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Marshall, R.P.; Simpson, J.K.; Lukey, P.T. Strategies for biomarker discovery in fibrotic disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1832*, 1079–1087. [[CrossRef](#)]
10. Pokorska-Spiewak, M.; Kowalik-Mikolajewska, B.; Aniszewska, M.; Pluta, M.; Marczyńska, M. Clinical usefulness of new noninvasive serum biomarkers for the assessment of liver fibrosis and steatosis in children with chronic hepatitis C. *Clin. Exp. Hepatol.* **2017**, *3*, 198–202. [[CrossRef](#)]
11. Maldonado, M.; Buendía-Roldán, I.; Vicens-Zygmunt, V.; Planas, L.; Molina-Molina, M.; Selman, M.; Pardo, A. Identification of MMP28 as a biomarker for the differential diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0203779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Affandi, A.J.; Radstake, T.R.; Marut, W. Update on biomarkers in systemic sclerosis: Tools for diagnosis and treatment. *Semin. Immunopathol.* **2015**, *37*, 475–487. [[CrossRef](#)]
13. Lédard, V.; Brideau, G.; Blais, F.; Salingcarboriboon, R.; Wagner, G.; Roehrl, M.H.; Noda, M.; Duprez, D.; Houillier, P.; Rossert, J. Scleraxis and NFATc regulate the expression of the pro-alpha1(I) collagen gene in tendon fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 17665–17675. [[CrossRef](#)]
14. Berthet, E.; Chen, C.; Butcher, K.; Schneider, R.A.; Alliston, T.; Amirtharajah, M. Smad3 binds Scleraxis and Mohawk and regulates tendon matrix organization. *J. Orthop. Res.* **2013**, *31*, 1475–1483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Levay, A.K.; Peacock, J.D.; Lu, Y.; Koch, M.; Hinton, R.B., Jr.; Kadler, K.E.; Lincoln, J. Scleraxis is required for cell lineage differentiation and extracellular matrix remodeling during murine heart valve formation in vivo. *Circ. Res.* **2008**, *103*, 948–956. [[CrossRef](#)]
16. Mendias, C.L.; Gumucio, J.P.; Davis, M.E.; Bromley, C.W.; Davis, C.S.; Brooks, S.V. Transforming growth factor-beta induces skeletal muscle atrophy and fibrosis through the induction of atrogen-1 and scleraxis. *Muscle Nerve* **2012**, *45*, 55–59. [[CrossRef](#)]
17. Bagchi, R.A.; Czubyrt, M.P. Synergistic roles of scleraxis and Smads in the regulation of collagen 1alpha2 gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 1936–1944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Nagalingam, R.S.; Safi, H.A.; Al-Hattab, D.S.; Bagchi, R.A.; Landry, N.M.; Dixon, I.M.; Wigle, J.T.; Czubyrt, M.P. Regulation of cardiac fibroblast MMP2 gene expression by scleraxis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2018**, *120*, 64–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Bagchi, R.A.; Lin, J.; Wang, R.; Czubyrt, M.P. Regulation of fibronectin gene expression in cardiac fibroblasts by scleraxis. *Cell Tissue Res.* **2016**, *366*, 381–391. [[CrossRef](#)]
20. Zeglinski, M.R.; Roche, P.; Hnatowich, M.; Jassal, D.S.; Wigle, J.T.; Czubyrt, M.P.; Dixon, I.M. TGFbeta1 regulates Scleraxis expression in primary cardiac myofibroblasts by a Smad-independent mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2016**, *310*, H239–H249. [[CrossRef](#)]
21. Bagchi, R.A.; Roche, P.; Aroutiounova, N.; Espira, L.; Abrenica, B.; Schweitzer, R.; Czubyrt, M.P. The transcription factor scleraxis is a critical regulator of cardiac fibroblast phenotype. *BMC Biol.* **2016**, *14*, 21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Carlberg, A.L.; Tuan, R.S.; Hall, D.J. Regulation of scleraxis function by interaction with the bHLH protein E47. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* **2000**, *3*, 82–86. [[CrossRef](#)]
23. Furumatsu, T.; Shukunami, C.; Amemiya-Kudo, M.; Shimano, H.; Ozaki, T. Scleraxis and E47 cooperatively regulate the Sox9-dependent transcription. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42*, 148–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. King, T.E.; Pardo, A., Jr.; Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* **2011**, *378*, 1949–1961. [[CrossRef](#)]
25. Figueroa, M.C.G.S.; Carrillo, G.; Pérez-Padilla, R.; Fernández-Plata, M.R.; Buendía-Roldán, I.; Vargas, M.H.; Selman, M. Risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis in a Mexican population. A case-control study. *Respir. Med.* **2010**, *104*, 305–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lee, A.S.; Mira-Avendano, I.; Ryu, J.H.; Daniels, C.E. The burden of idiopathic pulmonary fibrosis: An unmet public health need. *Respir. Med.* **2014**, *108*, 955–967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Qiu, M.; Chen, Y.; Ye, Q. Risk factors for acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Respir. J.* **2018**, *12*, 1084–1092. [[CrossRef](#)]
28. Williams, B.; Mancia, G.; Spiering, W.; Agabiti Rosei, E.; Azizi, M.; Burnier, M.; Clement, D.L.; Coca, A.; De Simone, G.; Dominiczak, A.; et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension. *J. Hypertens.* **2018**, *36*, 1953–2041.
29. Barreiro, T.J.; Perillo, I. An approach to interpreting spirometry. *Am. Fam. Physician* **2004**, *69*, 1107–1114.
30. Cserjesi, P.; Brown, D.; Ligon, K.L.; Lyons, G.E.; Copeland, N.G.; Gilbert, D.J.; Jenkins, N.A.; Olson, E.N. Scleraxis: A basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development* **1995**, *121*, 1099–1110.
31. Espira, L.; Lamoureux, L.; Jones, S.C.; Gerard, R.D.; Dixon, I.M.; Czubyrt, M.P. The basic helix-loop-helix transcription factor scleraxis regulates fibroblast collagen synthesis. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2009**, *47*, 188–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Killian, M.L.; Thomopoulos, S. Scleraxis is required for the development of a functional tendon enthesis. *FASEB J.* **2016**, *30*, 301–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Teo, Z.; Chan, J.S.K.; Chong, H.C.; Sng, M.K.; Choo, C.C.; Phua, G.Z.M.; Teo, D.J.R.; Zhu, P.; Choong, C.; Wong, M.T.C.; et al. Angiotensin-like 4 induces a beta-catenin-mediated upregulation of ID3 in fibroblasts to reduce scar collagen expression. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Muir, T.; Sadler-Riggelman, I.; Skinner, M.K. Role of the basic helix-loop-helix transcription factor, scleraxis, in the regulation of Sertoli cell function and differentiation. *Mol. Endocrinol.* **2005**, *19*, 2164–2174. [[CrossRef](#)]
35. Pryce, B.A.; Brent, A.E.; Murchison, N.D.; Tabin, C.J.; Schweitzer, R. Generation of transgenic tendon reporters, ScxGFP and ScxAP, using regulatory elements of the scleraxis gene. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **2007**, *236*, 1677–1682. [[CrossRef](#)]

36. Brown, D.; Wagner, D.; Li, X.; Richardson, J.A.; Olson, E.N. Dual role of the basic helix-loop-helix transcription factor scleraxis in mesoderm formation and chondrogenesis during mouse embryogenesis. *Development* **1999**, *126*, 4317–4329.
37. Schweitzer, R.; Chyung, J.H.; Murtaugh, L.C.; Brent, A.E.; Rosen, V.; Olson, E.N.; Lassar, A.; Tabin, C.J. Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development* **2001**, *128*, 3855–3866.
38. Barnette, D.N.; Hulin, A.; Ahmed, A.S.; Colige, A.C.; Azhar, M.; Lincoln, J. Tgfbeta-Smad and MAPK signaling mediate scleraxis and proteoglycan expression in heart valves. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2013**, *65*, 137–146. [[CrossRef](#)]
39. Roche, P.L.; Nagalingam, R.S.; Bagchi, R.A.; Aroutiounova, N.; Belisle, B.M.; Wigle, J.T.; Czubryt, M.P. Role of scleraxis in mechanical stretch-mediated regulation of cardiac myofibroblast phenotype. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2016**, *311*, C297–C307. [[CrossRef](#)]
40. Abe, H.; Tominaga, T.; Matsubara, T.; Abe, N.; Kishi, S.; Nagai, K.; Murakami, T.; Araoka, T.; Doi, T. Scleraxis modulates bone morphogenetic protein 4 (BMP4)-Smad1 protein-smooth muscle alpha-actin (SMA) signal transduction in diabetic nephropathy. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 20430–20442. [[CrossRef](#)]
41. Liu, M.H.; Cui, Y.H.; Guo, Q.N.; Zhou, Y. Elevated ASCL2 expression is associated with metastasis of osteosarcoma and predicts poor prognosis of the patients. *Am. J. Cancer Res.* **2016**, *6*, 1431–1440.
42. Hu, X.G.; Chen, L.; Wang, Q.L.; Zhao, X.L.; Tan, J.; Cui, Y.H.; Liu, X.D.; Zhang, X.; Bian, X.W. Elevated expression of ASCL2 is an independent prognostic indicator in lung squamous cell carcinoma. *J. Clin. Pathol.* **2016**, *69*, 313–318. [[CrossRef](#)]
43. Xu, H.; Zhao, X.L.; Liu, X.; Hu, X.G.; Fu, W.J.; Li, Q.; Wang, Y.; Ping, Y.F.; Zhang, X.; Bian, X.W.; et al. Elevated ASCL2 expression in breast cancer is associated with the poor prognosis of patients. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7*, 955–961. [[PubMed](#)]
44. Sierra-Sepúlveda, A.; Esquinca-González, A.; Benavides-Suárez, S.A.; Sordo-Lima, D.E.; Caballero-Islas, A.E.; Cabral-Castañeda, A.R.; Rodríguez-Reyna, T.S. Systemic Sclerosis Pathogenesis and Emerging Therapies, beyond the Fibroblast. *BioMed Res. Int.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Steen, V.D.; Powell, D.L.; Medsger, T.A., Jr. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **1988**, *31*, 196–203. [[CrossRef](#)]
46. Jacobsen, S.; Ullman, S.; Shen, G.Q.; Wiik, A.; Halberg, P. Influence of clinical features, serum antinuclear antibodies, and lung function on survival of patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* **2001**, *28*, 2454–2459.
47. Murata, H.; Sumida, T. Quantitative analysis of fetal microchimerism in Japanese women patients with systemic sclerosis. *Mod. Rheumatol.* **2001**, *11*, 259–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Ho, K.T.; Reveille, J.D. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res. Ther.* **2003**, *5*, 80–93. [[PubMed](#)]
49. Peoples, C.; Medsger, T.A.; Lucas, M., Jr.; Rosario, B.L.; Feghali-Bostwick, C.A. Gender differences in systemic sclerosis: Relationship to clinical features, serologic status and outcomes. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **2016**, *1*, 177–240. [[CrossRef](#)]
50. Walters, D.M.; Kleeberger, S.R. Mouse models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2008**. [[CrossRef](#)]
51. Yamamoto, T.; Takagawa, S.; Katayama, I.; Yamazaki, K.; Hamazaki, Y.; Shinkai, H.; Nishioka, K. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J. Investing. Dermatol.* **1999**, *112*, 456–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Pohlars, D.; Brenmoehl, J.; Löffler, I.; Müller, C.K.; Leipner, C.; Schultze-Mosgau, S.; Stallmach, A.; Kinne, R.W.; Wolf, G. TGF-beta and fibrosis in different organs—Molecular pathway imprints. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1792*, 746–756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Fernandez, I.E.; Eickelberg, O. The impact of TGF-beta on lung fibrosis: From targeting to biomarkers. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2012**, *9*, 111–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Selman, M.; Pardo, A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: From innocent targets to serial killers. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2006**, *3*, 364–372. [[CrossRef](#)]
55. Guiot, J.; Moermans, C.; Henket, M.; Corhay, J.L.; Louis, R. Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung* **2017**, *195*, 273–280. [[CrossRef](#)]

56. Odler, B.; Foris, V.; Gungl, A.; Müller, V.; Hassoun, P.M.; Kwapiszewska, G.; Olschewski, H.; Kovacs, G. Biomarkers for Pulmonary Vascular Remodeling in Systemic Sclerosis: A Pathophysiological Approach. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 587. [CrossRef]
57. Maldonado, M.; Salgado-Aguayo, A.; Herrera, I.; Cabrera, S.; Ortíz-Quintero, B.; Staab-Weijnitz, C.A.; Eickelberg, O.; Ramírez, R.; Manicone, A.M.; Selman, M.; et al. Upregulation and Nuclear Location of MMP28 in Alveolar Epithelium of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2018**, *59*, 77–86. [CrossRef] [PubMed]
58. Al-Hattab, D.S.; Safi, H.A.; Nagalingam, R.S.; Bagchi, R.A.; Stecy, M.T.; Czubryt, M.P. Scleraxis regulates Twist1 and Snai1 expression in the epithelial-to-mesenchymal transition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2018**, *315*, H658–H668. [CrossRef]
59. Wang, L.H.; Baker, N.E. E Proteins and ID Proteins: Helix-Loop-Helix Partners in Development and Disease. *Dev. Cell* **2015**, *35*, 269–280. [CrossRef] [PubMed]
60. Pagliuca, A.; Gallo, P.; De Luca, P.; Lania, L. Class A helix-loop-helix proteins are positive regulators of several cyclin-dependent kinase inhibitors' promoter activity and negatively affect cell growth. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1376–1382. [PubMed]
61. Firulli, B.A.; Hadzic, D.B.; McDaid, J.R.; Firulli, A.B. The basic helix-loop-helix transcription factors dHAND and eHAND exhibit dimerization characteristics that suggest complex regulation of function. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 33567–33573. [CrossRef] [PubMed]
62. Mullen, A.C.; Orlando, D.A.; Newman, J.J.; Lovén, J.; Kumar, R.M.; Bilodeau, S.; Reddy, J.; Guenther, M.G.; DeKoter, R.P.; Young, R.A. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF-beta signaling. *Cell* **2011**, *147*, 565–576. [CrossRef] [PubMed]
63. Van Den Hoogen, F.; Khanna, D.; Fransen, J.; Johnson, S.R.; Baron, M.; Tyndall, A.; Matucci-Cerinic, M.; Naden, R.P.; Medsger, T.A., Jr.; Carreira, P.E.; et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.* **2013**, *72*, 1747–1755. [CrossRef] [PubMed]
64. Medsger, T.A.; Bombardieri, S., Jr.; Czirjak, L.; Scorza, R.; Della Rossa, A.; Bencivelli, W. Assessment of disease severity and prognosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2003**, *21*, S42–S46. [PubMed]
65. Becerril, C.; Pardo, A.; Montano, M.; Ramos, C.; Ramirez, R.; Selman, M. Acidic fibroblast growth factor induces an antifibrogenic phenotype in human lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1999**, *20*, 1020–1027. [CrossRef]
66. Yu, G.; Kovkarova-Naumovski, E.; Jara, P.; Parwani, A.; Kass, D.; Ruiz, V.; Lopez-Otin, C.; Rosas, I.O.; Gibson, K.F.; Cabrera, S.; et al. Matrix metalloproteinase-19 is a key regulator of lung fibrosis in mice and humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2012**, *186*, 752–762. [CrossRef]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

