



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DE METILACIÓN DE GENES PRO-APOPTÓTICOS
EN DNA DE PULMÓN DE PACIENTES CON FIBROSIS
PULMONAR IDIOPÁTICA

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MIGUEL ÁNGEL NEGREROS AMAYA

TUTOR

DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA

2009





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno
Negreros
Amaya
Miguel Ángel
55 71 51 61
Universidad Nacional Autónoma de México
Biología
302103319

2. Datos del tutor
Dr
José Guadalupe
Cisneros
Lira

3. Datos del sinodal 1
Dra
Annie
Pardo
Semo

4. Datos del sinodal 2
Dra
María de Lourdes
Segura
Valdez

5. Datos del sinodal 3
M en IBB
Saúl
Cano
Colín

6. Datos del sinodal 4
Dr
Víctor Manuel
Ruiz
López

7. Datos del trabajo escrito

Análisis de metilación de genes pro-apoptóticos en DNA de pulmón de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática

29 p.

2009

Agradecimientos

A mis Padres Socorro Amaya y Refugio Negreros que me han apoyado durante todos estos años y que con su cariño, consejos y desvelos me han llevado hasta donde estoy, esta tesis también es de ustedes. A mis hermanos Mayte y Gonzalo por estar siempre ahí, y a mi Tía Eugenia que con sus consejos y su ayuda incondicional me daba nuevos bríos cuando me sentí titubeante.

A la Universidad Nacional Autónoma de México que por tan poco me ha dado tanto y a la cual siempre llevaré tatuada en la piel y en el corazón; y a sus increíbles profesores, quienes me han dado las armas para defenderme en la vida profesional y cuyos importantes conocimientos llevaré por siempre.

A la Fundación Alberto y Dolores Andrade y a las licenciadas Mimila, Marisela y en especial a la licenciada Leticia, que me ayudaron desinteresadamente, desde hace tanto tiempo, sin esperar nada a cambio.

Al Dr. José Cisneros por todo lo que aprendí de él durante este tiempo, por su apoyo profesional y personal, por su comprensión y paciencia, gracias Pepe.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y Al Dr. Moisés Selman así como a todos los miembros del laboratorio de Fibrosis Pulmonar por abrirme las puertas y ayudarme durante la realización de esta tesis.

A Luís, Itzue, Sandra, Mónica, Iris, Fabiola y Maira quienes me acompañaron durante esta travesía, con quienes compartí más que tareas, trabajos, exámenes y desvelos, compartí retos, lágrimas y sueños. Y a todos mis amigos (que afortunadamente son muchos y desafortunadamente sería imposible mencionarlos a todos) que sin ser maestros me enseñaron muchas de las cosas importantes de la vida.

A todos.... Gracias!

Por que sin todos ustedes nada de esto hubiera sido posible.

ÍNDICE

	Pag.
INTRODUCCIÓN.....	1
Fibrosis Pulmonar.....	1
Apoptosis.....	3
Epigenética y Metilación del DNA.....	7
TMS1.....	11
DAPK.....	11
p16/Ink4a.....	12
Caspasa 8.....	13
OBJETIVOS.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	14
METODOLOGÍA.....	15
Muestras.....	15
Extracción de DNA.....	15
Evaluación del grado de metilación	16
Tratamiento con bisulfito de sodio.....	16
PCR específico para metilación (MS-PCR).....	16
Controles de metilación.....	17
Análisis de resultados.....	17
RESULTADOS.....	19
MS-PCR en tejidos congelados.	19
p16 y TMS1.....	19
DAPK.....	20
Caspasa-8.....	21
MS-PCR de focos de fibroblastos.	22
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	23
REFERENCIAS.....	26

INTRODUCCION

Fibrosis pulmonar

La fibrosis pulmonar (FP) es el resultado final de varios padecimientos heterogéneos que afectan al parénquima respiratorio y que se conocen como enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) (1).

Se han descrito más de 150 diferentes EPID y aproximadamente el 60% de ellas tienen una causa identificable como por ejemplo, la inhalación de partículas inorgánicas (sílice, asbesto) u orgánicas (proteínas de aves, hongos, bacterias termofílicas), o el uso de diversos medicamentos como por ejemplo la bleomicina. El 40% restante son de causa desconocida, dentro de las cuales destaca la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), que se considera la entidad más agresiva de las enfermedades fibrosantes del pulmón de todas las EPID con una supervivencia promedio de 2-3 años después de realizado el diagnóstico (1,2).

La FPI se caracteriza por la migración, proliferación de fibroblastos, cambio fenotípico a miofibroblastos y la remodelación inapropiada de la matriz extracelular, que resulta en un aumento exagerado de moléculas de matriz extracelular que incluye a las colágenas intersticiales lo que trae como consecuencia una extensa desorganización estructural del parénquima pulmonar donde las unidades alvéolo-capilares responsables del intercambio gaseoso se pierden progresivamente y son reemplazadas por fibrosis y quistes, lo cual resulta en la pérdida irreversible de la arquitectura del pulmón que conlleva a la incapacidad respiratoria y a la muerte de los individuos (3)

Los mecanismos patogénicos responsables de la respuesta fibrosante pulmonar no se conocen con precisión y recientemente se ha propuesto que las EPID pueden seguir dos caminos celulares diferentes para el desarrollo de una respuesta fibrosante (3,4).

En la mayoría de las EPID la respuesta fibrótica se asocia a una inflamación pulmonar crónica no resuelta (*vía inflamatoria*) que se perpetúa hasta dar lugar a una fase caracterizada por la proliferación de fibroblastos y el depósito exagerado de matriz extracelular en el intersticio pulmonar (3).

Por el contrario, la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), representa un proceso fibrótico independiente de la inflamación, caracterizado por una comunicación anormal entre células epiteliales y mesenquimatosas (3, 4, 5, 6). En este caso, (*vía epitelial*), las células del epitelio alveolar y bronquiolar aberrantemente estimuladas secretan las citocinas y factores de crecimiento responsables de la migración y proliferación de fibroblastos la formación de los focos de fibroblastos/miofibroblastos en el intersticio del pulmón afectado adyacentes a sitios donde ocurre el daño epitelial y de hecho, el número de focos fibroblásticos observados en una biopsia pulmonar mantiene una estrecha relación con la mortalidad de los individuos (7).

El papel que juega la apoptosis es muy importante, ya sea durante el mantenimiento de la homeostasis del pulmón o en la patogénesis de distintas enfermedades pulmonares como la Fibrosis Pulmonar Idiopática. La muerte celular excesiva o la resistencia a ésta ocasionan la pérdida del balance de las actividades celulares del organismo (homeostasis) todo depende del tipo celular involucrado y el microambiente del pulmón afectado (8).

Apoptosis.

La muerte celular es un proceso biológico fundamental para el mantenimiento y homeostasis de los tejidos. Existen básicamente 2 tipos de muerte celular, la necrosis y la apoptosis. La necrosis o muerte accidental resulta por la agresión o daño directo a la célula y se caracteriza por pérdida de la integridad de la membrana celular y liberación del contenido citoplasmático, lo cual conduce a un proceso inflamatorio alrededor de la célula muerta, debido a la liberación del contenido celular y moléculas proinflamatorias (9).

La apoptosis o muerte celular programada, afecta a las células en procesos que no involucran inflamación y se inicia cuando la célula activa su propia autodestrucción, mediante una serie de eventos en cascada que incluyen, entre otros, la translocación del fosfolípido fosfatidilserina del interior hacia el exterior de la membrana celular, la despolarización del potencial de membrana mitocondrial, la liberación del citocromo C, la activación de caspasas (proteasas de cisteína), la ruptura del DNA y condensación de la cromatina y el decremento del volumen celular, acompañado por la formación de los cuerpos apoptóticos(10).

Nuevos estudios indican que la apoptosis se regula de manera tipo celular y tejido específica; por esta razón, la regulación de la apoptosis en los distintos tipos celulares es actualmente un área creciente en investigación(11).

Un gran número de investigaciones confirman el papel que juega la apoptosis en la remodelación del tejido pulmonar después de un daño agudo. Al eliminar el exceso de células epiteliales después de la reparación y para la eliminación

normal del exceso de células mesenquimales del espacio alveolar.(12) Es por eso que la apoptosis se encuentra presente ampliamente en pacientes con FPI, ya que nuevas líneas de investigación sugieren que la apoptosis de ciertos tipos celulares determina tanto la patogénesis como la resolución de la lesión fibrótica.(13, 14)

Se han descrito dos vías que conducen a la apoptosis, la extrínseca y la intrínseca(figura 1).La vía extrínseca o de los "receptores de muerte" establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales pro-apoptóticas desde el exterior y actúa a través de receptores. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: el receptor Fas y el receptor para el factor de necrosis tumoral (TNFR-1) (15). La proteína transmembranal Fas en su dominio intracelular interacciona con un factor intermedio denominado FADD (factor associated death domain) y una vez formado el complejo activa a las caspasas-8 y -10. TNFR actúa de manera similar, pero su porción intracelular se une a complejos intermedios como el Tradd (TNF receptor associated death domain) y Raidd (receptor associated interleukine death domain), y de esta manera activan caspasas "iniciadoras" de la apoptosis. La unión del ligando de Fas a su receptor (APO-1 o CD95) induce apoptosis en células que expresan el receptor. Fas está ensamblado como un trímero, el cual presenta un cambio conformacional en respuesta a la unión con su ligando. Entonces, en el dominio citoplásmico del receptor se ensambla un complejo de señalización que comprende un segmento de cerca de 80 residuos de aminoácidos llamado el dominio de muerte. La transducción de la señal involucra la unión de este dominio con una molécula adaptadora FADD. El dominio N-terminal de FADD recluta a la

procaspasa-8. La caspasa 8, una de las llamadas caspasas iniciadoras, es activada por las altas concentraciones locales de la procaspasa-8, a través de su actividad autoproteolítica, lo cual subsecuentemente activa a las caspasa-3 y -7 también conocidas como caspasas ríoabajo o efectoras, llamadas así por sus sitios de acción en la cascada proteolítica, las cuales pueden actuar en un amplio rango de sustratos, a la fecha se han detectado más de 60, los cuales se pueden dividir en dos categorías: proteínas reguladoras de apoptosis los cuales son activadas o inactivados por escisión, y proteínas estructurales cuyo corte es requerido para el desensamblaje ordenado de la célula (16, 17).

La vía intrínseca o mitocondrial está regulada por proteínas de la familia de Bcl-2, ejerciendo su acción sobre la mitocondria. Las proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2, son reguladas por muy diversos eventos de entre los cuales destacan: escisión, cambios conformacionales, fosforilación y desfosforilación dinámica(18), produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembranal, entre ellas el citocromo C. Una vez en el citosol, el citocromo C activa un complejo protéico llamado "apoptosoma", que activa directamente a la caspasa-9. Una vez que la caspasa-9 está activada, ésta activa a las caspasas efectoras como la caspasa-3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis. La vía mitocondrial puede conectarse también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa-8 por dichos receptores, esta caspasa activa a la proteína Bid, lo que provoca la apertura del poro mitocondrial y la activación de la caspasa-9 (16,19).

La activación de la caspasa-8 funciona como un intermediario entre la vía extrínseca y la intrínseca, ya que una vez activada, la caspasa-8 corta a Bid, un miembro de la familia Bcl2, para formar Bid truncada o tBid, el cual se transloca a la mitocondria y activa a las proteínas proapoptóticas Bax y Bak.(20)

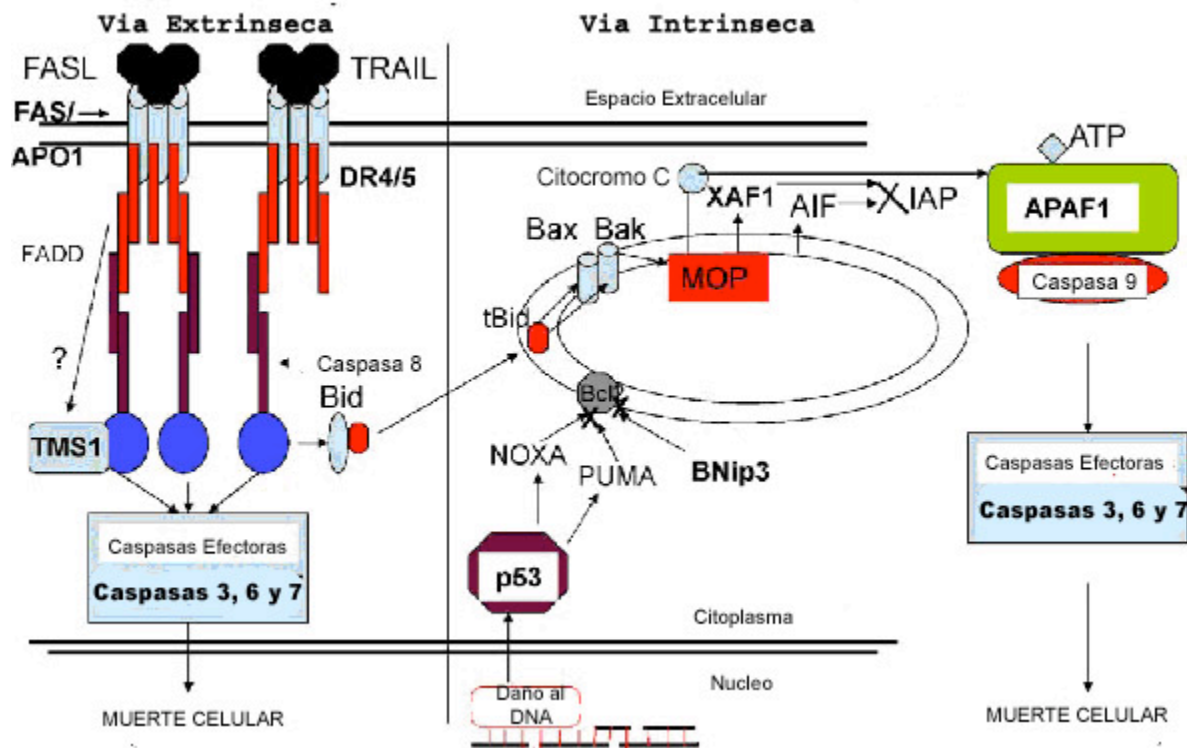


Figura 1 Esquema que ejemplifica de manera general las 2 vías apoptóticas. *Mol Immunol* 2006; 43:1729–1740.

Tanto la vía intrínseca como la extrínseca terminan con la activación de las proteasas de cisteína llamadas caspasas, que ejecutan la apoptosis. Las caspasas cortan su sustrato hidrolizando siempre el enlace peptídico donde un residuo de aspartato participa con el carbonilo del enlace amida y son sintetizadas como zimógenos. De los 14 diferentes tipos de caspasas identificados en mamíferos, 11 se han encontrado en humanos. Dependiendo de su papel en la

ejecución de los eventos apoptóticos, las caspasas generalmente se dividen en dos grupos: iniciadoras (caspasa 2, 8, 9 y 10) y efectoras (caspasa 3, 6 y 7). Una característica que distingue a las caspasas iniciadoras de las efectoras es la presencia de uno o más dominios adaptadores que son esenciales para su función. Los blancos de las caspasas incluyen proteínas del citoesqueleto, las cuales son necesarias para el mantenimiento de la viabilidad celular y cuya degradación progresiva lleva a la muerte celular (20).

Puesto que la regulación negativa de los genes involucrados en la apoptosis mediante su metilación, afecta todos los aspectos de la apoptosis, desde su iniciación hasta su ejecución (21), trataré el tema brevemente, ya que fue de interés para el presente trabajo.

Epigenética y Metilación del DNA.

La epigenética estudia las modificaciones en la expresión génica que no se deben a alteraciones en la secuencia del DNA. Estas modificaciones son reversibles y transmisibles durante la mitosis o la meiosis y controlan el repertorio correcto del programa genético que determinará la expresión diferencial de genes que regulan el fenotipo de las células. Las modificaciones epigenéticas incluyen la metilación del DNA y la metilación o acetilación de las histonas (22).

La metilación es una modificación covalente que consiste en la adición de un grupo metilo en el carbono 5' de residuos de citosina (C) lo cual resulta en la formación de 5-metilcitosina (m5C). Aproximadamente 1% del total de las bases

del DNA, en células somáticas humanas son citosinas metiladas y, por lo tanto, afecta del 70% al 80% de todos los dinucleótidos CpG en el genoma (22, 23).

La metilación ocurre en fragmentos de DNA de 0.5 a 5kb con “clusters” o agrupaciones de dinucleótidos en regiones ricas en GC que son designadas como islas “CpG” y se encuentran principalmente localizadas en la región del promotor y dentro del primer exón, aunque algunas islas CpG se pueden encontrar, ocasionalmente, dentro del cuerpo del gen o en la región 3’ (24).

En el humano, aproximadamente el 60% de los genes están asociados con islas CpG, pero la gran mayoría de estos genes no se metilan en ninguna etapa del desarrollo (25). La metilación del DNA genómico en mamíferos es catalizada por las DNA metiltransferasas (DNMT) que utilizan S-adenosil-L-metionina como donador de grupos metilo. Las DNMTs pueden dividirse en dos grupos, las llamadas de novo, que incluyen a la DNMT3a y 3b y las de mantenimiento, que incluyen la DNMT2, 3A, 3B, 3L y la DNMT1. Durante la replicación del DNA, la DNMT1 se encarga de adicionar el grupo metilo en las citosinas de la cadena recién sintetizada, manteniendo así la memoria del estado metilado en la célula hija a través de las divisiones celulares. Por otro lado, se ha observado que la actividad enzimática de las DNA metiltransferasas se encuentra aumentada en células tumorales, comparada con la de los tejidos normales (26).

La metilación afecta de manera directa la transcripción, debido a la interferencia generada por el dinucleótido m5CpG entre el factor de transcripción y el promotor, mientras que de manera indirecta, como resultado de la interferencia generada por proteínas que se unen al dinucleótido m5CpG que bloquean la unión con factores de transcripción (Figura 2). Hasta ahora se han descrito diversas proteínas

de unión a DNA metilado que interfieren con la transcripción: MeCP1 MeCP2, MBD1, MDB2, MBD3, KAISO (26).

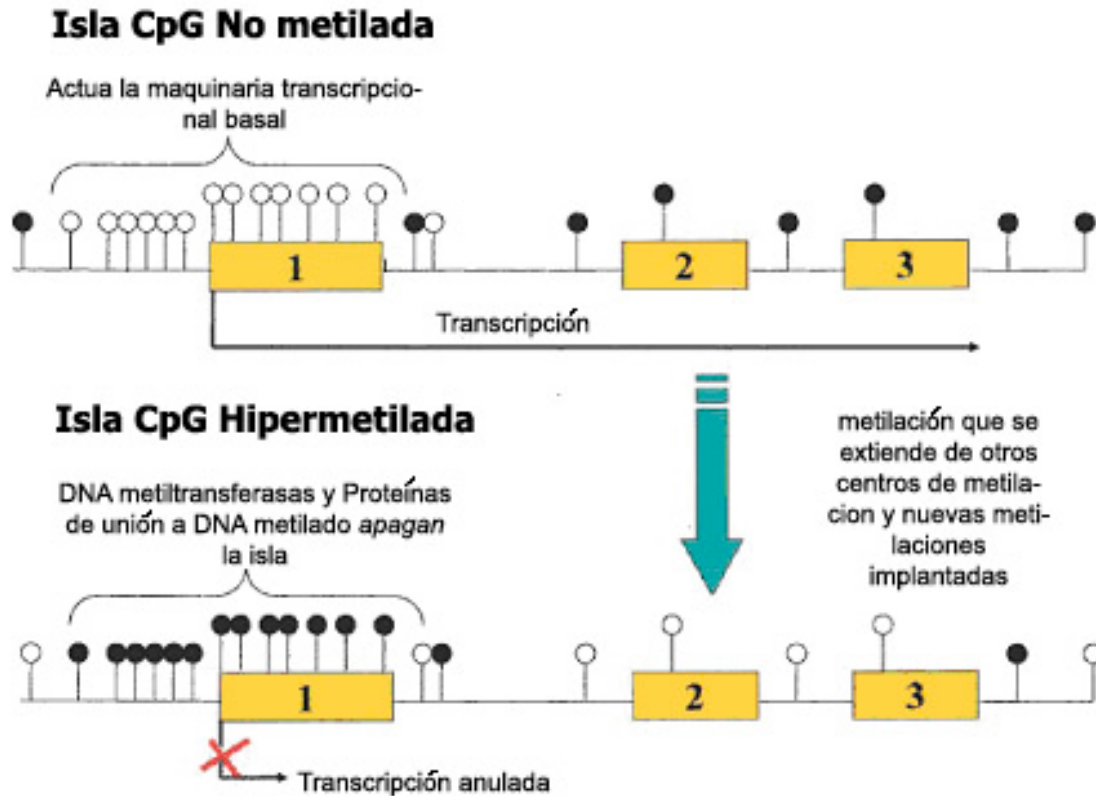


Figura 2 Esque que ejemplifica el efecto de la metilación en las islas CpG dentro del promotor. La presencia de metilación en estas islas cambia el ambiente molecular de la región promotora impidiendo la transcripción. *Oncogene*, 2002; 21: 5427-5440

Los cambios en los patrones de metilación pueden ocurrir de dos formas, ya sea como hipometilación o hipermetilación. La hipometilación esta generalmente asociada con la reactivación de genes, mientras que la hipermetilación esta relacionada con el silenciamiento de genes. La represión de genes a través de un proceso de hipermetilación actúa sobre genes asociados a distintos procesos celulares, como por ejemplo: genes implicados en la reparación del DNA, la

respuesta hormonal y la eliminación de tumores. Así mismo, la metilación constituye un mecanismo de regulación en procesos como la diferenciación, la impronta genómica y la inactivación del cromosoma X (27,28).

La hipermetilación es probablemente resultado de un proceso lento y progresivo en comparación con la súbita aparición de una mutación y, aunque hasta ahora no se sabe con exactitud como se origina, existen dos teorías para explicar cómo inician los eventos de hipermetilación:

- La primera sugiere que la hipermetilación aberrante se extiende de centros normales de metilación adyacentes al área libre de metilación (29) y la segunda propone que una nueva metilación es “implantada” y subsecuentemente ésta “atrae” mas eventos de metilación; este ultimo es el modelo que se ha propuesto para explicar la metilación del gen de la glutatión-S- transferasa en cáncer de próstata (30).

La represión de genes a través de metilación representa un proceso con enormes repercusiones en la expresión génica y desempeña un papel clave en el desarrollo y la progresión de diversas patologías, en particular, en el cáncer. Diversos estudios muestran que en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el de mama, pulmón, vejiga, hígado y cerebro, el silenciamiento de genes por hipermetilación, es un proceso que puede favorecer la progresión y perpetuación de la enfermedad, lo cual se debe en parte a que muchos de los genes que se encuentran hipermetilados, como por ejemplo p14ARF, DAPK, TMS1, y p16 son genes supresores de tumores y participan en el proceso de apoptosis y se ha demostrado que existe una asociación directa entre el grado de metilación con el

grado y el desarrollo del cáncer, esto debido a que al estar inactivados estos genes, las células cancerosas son resistentes a la muerte celular. (31,21).

TMS1.

El blanco de silenciamiento inducido por metilación 1, o TMS1 por sus siglas en inglés, es una proteína bipartita que consiste en un dominio pirina (PYD) N-terminal y un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) C-terminal. Dada su estructura, funciona como proteína adaptadora en la regulación de la vía NF- κ B y/o apoptosis (25). El locus TMS1/ASC está conformado por tres exones y comprende una región de 1.5kb en el cromosoma 16p11.2. El transcrito codifica para una proteína de 22-kDa. Se ha visto que TMS1 induce apoptosis de una forma caspasa-8 dependiente, y se sabe que puede interactuar con I κ B α , y caspasa-8. También puede regular la actividad de la caspasa-1 y bloquear la activación río abajo del factor nuclear kappa B(NF- κ B). El papel de TMS1 es de interés, ya que es regulado negativamente mediante la metilación del DNA en algunos cánceres. El promotor de TMS1 contiene una isla CpG y carece de una caja TATA canónica. La metilación de las islas de CpG está acompañada de cambios en la estructura de la cromatina, lo cual resulta en la pérdida de un sitio hipersensible a DNasa, hipoacetilación de histonas H3 y H4, y silenciamiento de genes (21).

DAPK.

La familia DAPK es una nueva subfamilia de cinasas proapoptóticas de serina/treonina, que consiste en por lo menos cinco miembros, los cuales se expresan en varios tejidos y son capaces de inducir apoptosis. Esta familia está

involucrada en ambas vías apoptóticas, la intrínseca y la extrínseca. Sumado a esto, la desactivación de DAPK disminuye la inducción de p19ARF/p53, lo que da como resultado la inhibición de la vía apoptótica dependiente de p53. El miembro más estudiado de esta familia es DAPK, cuyo gen se localiza en el cromosoma 9q34.1. DAPK contiene un dominio de muerte en su extremo carboxilo terminal, y fue inicialmente aislado como un mediador positivo de apoptosis inducida por IFN- γ (33).

p16ink4a.

La proliferación celular depende de la regulación del ciclo celular y de la apoptosis. Una de las muchas moléculas que están implicadas en la regulación del ciclo celular es p16, la cual inhibe la unión de las ciclinas con las cinasas dependientes de ciclinas (CDK4 y CDK9) de la fase G1 (34). p16 participa en la actividad transcripcional de la célula en varios niveles: inhibe la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRb), inhibe directamente a NF κ -B, regula la actividad de Myc, e inhibe a la Cinasa dependiente de ciclina 7 (CDK7).

Aunque actualmente el papel que juega p16 en la regulación de la apoptosis no es del todo claro, ya se ha logrado identificar que p16 es capaz de regular la apoptosis en líneas celulares de células cancerosas pulmonares no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés) en las cuales p53 es funcional y que este proceso puede estar relacionado no solo a la regulación negativa/ hipofosforilación de pRB sino, en una reducción de la expresión de la proteína antiapoptótica bcl-2. (35)

El locus INK4a/ARF humano se localiza en el cromosoma 9 en 9p21, comprende dos genes, INK4 y ARF que codifican para las proteínas p16INK4a y p14ARF. El promotor del exón 1 del gen INK4a presenta una isla CpG, el cual al estar metilado inhibe la transcripción (36). El análisis de la secuencia del promotor de ARF reveló que posee islas CpG y una región TATA ausente. Se ha visto que p16ARF es regulado negativamente por procesos de metilación.

Caspasa-8.

La caspasa-8 tiene un papel importante y no redundante en la apoptosis mediada por receptor. Ésta forma un complejo con la molécula adaptadora FADD y con una molécula receptora como FasR, para establecer lo que es conocido como complejo de señalización muerte-inducida. Una vez que el complejo se ha formado exitosamente, este transmite una señal del receptor a las caspasas efectoras, lo que resulta en la activación de una “cascada mortal de caspasas”.

En la lista de receptores que transmiten una señal de muerte a través de caspasa-8 se incluye Fas, TNFR1, DR3, DR4 y DR5. (37). El gen de la caspasa-8 o CASP8 se localiza en el cromosoma 2 en la banda q33-34, una región eliminada frecuentemente, en tumores humanos (38).

OBJETIVO

Analizar el estado de metilación de los genes CASP8, DAPK, TMS1, y p16ink4a en DNA de pulmón de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.

JUSTIFICACIÓN

El silenciamiento de genes pro-apoptóticos a través de metilación, constituye un proceso que determina, en buena parte, la progresión de algunas enfermedades como el cáncer. En la fibrosis pulmonar idiopática se cree que la presencia y permanencia de los focos de fibroblastos se puede deber a que estos sean resistentes a la apoptosis. Sin embargo, en la FPI los estudios encaminados al análisis de la regulación epigenética son prácticamente nulos y por ello en este trabajo nos enfocamos a estudiar el estado de metilación de algunos genes relacionados con la apoptosis.

METODOLOGÍA.

Muestras.

Se utilizaron muestras de tejido congelado que fueron obtenidas en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias a partir de biopsias de pulmón de pacientes diagnosticados con fibrosis pulmonar idiopática (n=4). Los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C hasta su uso. Adicionalmente, también se utilizaron muestras correspondientes a focos de fibroblastos que fueron adquiridos por micro-disección laser de tejidos incluidos en parafina (n=3) mediante la técnica de LCM (del inglés Laser-capture microdissection) con el equipo PixCell II LCM system (Arcturus Engineering, Mountain View, CA.).

Extracción de DNA

De los tejidos congelados se tomaron de 50-60 miligramos y de éstos se extrajo el DNA utilizando el estuche de extracción Puregen (Gentra, Inc, CA, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente, se añadieron 300 µl de la solución de lisis la cual contiene un detergente aniónico que se encarga de romper la membrana de las células, además de un estabilizador de DNA que neutraliza la actividad de DNAsas intracelulares y también de las DNAsas que se encuentran en el ambiente. Después de incubar durante 3 horas a 55 °C con Proteinasa K, el RNA de la muestra se eliminó con una solución de RNasa 1 (10 mg/ml). Posteriormente, las proteínas se precipitaron y el DNA de las muestras se recuperó y resuspendió en 300 µl de etanol al 70% y centrifugó a 12 000 g durante 1 min. Finalmente, el DNA se reconstituyó en 100 µl de una solución

amortiguadora de Tris-EDTA (hidroximetil-aminometano y ácido etilendiaminotetracético).

La extracción de DNA de los focos de fibroblastos se realizó con el kit PicoPure DNA Extraction Kit (Arcturus) incubando las muestras con proteinasa-K durante 24 horas a 65°C y después inactivando la proteinasa durante 10 min a 95 °C.

La concentración de DNA extraído en cada una de las muestras se determinó con el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Termo Scientific MA,USA).

Evaluación del grado de Metilación

Tratamiento con bisulfito de sodio

Para analizar el estado de metilación, 1 µg de DNA de cada uno de los tejidos congelados y 100 ng de DNA proveniente de los focos de fibroblastos, fueron tratados con bisulfito de sodio, utilizando para ello el estuche EpiTect Bisulfite (Qiagen). Mediante este procedimiento, los residuos de citosina que no están metilados son convertidos en uracilos, mientras que las citosinas metiladas permanecen sin cambio. El DNA tratado con bisulfito de sodio se cuantificó con el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Termo Scientific MA,USA) y utilizado inmediatamente o congelado a -20 °C.

PCR específico para metilación (MS-PCR)

El estado de metilación de los genes DAPK, TMS1, p16 y caspasa-8, se analizó mediante la técnica de PCR específico para metilación (MS-PCR), por sus siglas en inglés). En esta técnica se utiliza como molde el DNA modificado con bisulfito de sodio y dos pares de primers(oligonucleotidos o iniciadores) que reconocen sólo la región promotora del gen, uno de los cuales amplifica si la región esta

metilada y que no se modificó con el tratamiento de bisulfito y que se puede discriminar de la secuencia no metilada, con un par de primers que amplifica los uracilos (que provienen de las citocinas no metiladas) (39). Para la reacción de amplificación, se utilizaron ~50 ng de DNA modificado con bisulfito de sodio, 20 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, una mezcla de nucleótidos 200 μM de cada uno, 1 μM de cada primer, 1.25 unidades de la enzima Taq Gold PCR (Roche, Branchburg, NJ) y 5% de DMSO, todo en un volumen de 25 μl. La desnaturalización de todas las reacciones se llevó a cabo a 94° C mientras que la temperatura de elongación fue de 72° C. La temperatura de alineación y el número de ciclos varió en función de los primers (Tabla 1).

Controles de metilación.

Como controles de amplificación para MS-PCR, en cada una de las reacciones se incorporó una muestra de ~2 ng de un DNA comercial que no está metilado y un DNA que fue químicamente modificado para que todas las citocinas estuvieran metiladas (Chemicon, Temecula CA, USA). Estos DNAs fueron tratados con bisulfito de sodio, como se describió anteriormente. Adicionalmente, para el control negativo se incluyeron tubos que contenían toda la mezcla de reacción pero sin DNA.

Análisis de resultados.

Para el análisis de p16 y TMS1 los productos de MS-PCR se corrieron en geles de agarosa al 2% preteñidos con bromuro de etidio. Para DAPK y Caspasa-8, los productos de amplificación se corrieron en geles de poliacrilamida al 6% en buffer TBE (Tris-borato-EDTA) y después se tiñeron durante 30 minutos con bromuro de

etidio. Para cada muestra de tejido, los productos de MS-PCR con los primers que amplifican el gen metilado (M) y el no metilado (U) se corrieron juntos. Todos los geles se corrieron a voltaje constante de 100V en buffer TBE y se observaron bajo luz UV.

Para obtener la imagen, los geles se digitalizaron con una cámara digital Kodak DS120 utilizando el sistema de fotodocumentación Kodak Digital Science (Kodak, NY, USA).

Gen	Secuencia	Temperatura de Alineación (°C)	Ciclos
p16	UF 5'- TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3' UR 5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3' MF 5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3' MR 5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3'	68	33
Casp8	UF 5'- GATGTGAGGTGATTTATGAG-3' UR 5'-CACAACAACCTACAACCTCAATTTCCCT-3' MF 5'-GACGCGAGGCGATTTACG-3' MR 5'-CGACCACGTACGCGAAAACCTCGCG-3'	56 64	34
TMS1	UF 5'-TTGTTGGAGGGTAATGGA-3' UR 5'-CCCACAAAATACACCCATA-3' MF 5'- CGATTTTGGCGTTTTTCGACGTT-3' MR 5'- CCGCTCACCCCGCTACAACCGC-3'	58 65	35
DAPK	UF 5'- GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT -3' UR 5'- CAATCCCTCCCAAACACCAA - 3' MF 5' - GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC-3' MR 5' - CCCTCCAAACGCCG-3'	62	33

Tabla 1.- Secuencias de primers, temperatura de alineación y ciclaje utilizados para MS-PCR.

RESULTADOS.

Una condición indispensable y crucial para el análisis de metilación mediante MS-PCR es la conversión de las citocinas no metiladas por uracilos en el DNA genómico. Este proceso se lleva a cabo a través del tratamiento del DNA con bisulfito de sodio. En este trabajo se utilizó el estuche comercial Epitec Bisulfite (Qiagen) convierte el 99.5% de las citocinas no metiladas y mantiene esta condición estable por más de 30 días.

Para analizar el estado de metilación de las muestras, se utilizaron dos pares de primers (Tabla 1), uno designado para amplificar el gen no metilado en su promotor y otro que amplifica si esta metilado. Esta combinación resulta en productos no metilados (U) y metilados (M) de diferentes tamaños, en reacciones para la misma muestra.

MS-PCR en tejidos congelados.

p16 y TMS1.

La figura 3 muestra el resultado para el ensayo de MS-PCR del gen p16. Como puede observarse, en todas las muestras de tejidos se observa la banda correspondiente al producto de amplificación no metilado (U) con un tamaño aproximado de 151 pb. Sin embargo, ninguna de estas muestras amplificó con los primers para la secuencia metilada (M).

Para el gen TMS1, el análisis por MS-PCR arrojó los mismos resultados que para el gen p16. Como se observa en la figura 4, en las muestras de tejidos sólo se observa la banda de amplificación de ~272 pb correspondiente al alelo no metilado de TMS1.

Tanto para p16 como para TMS1, los controles de DNA no metilado y DNA metilado amplificaron con su respectivo par de primers y no hay producto de amplificación en el control negativo de la reacción que lleva agua en lugar de DNA.

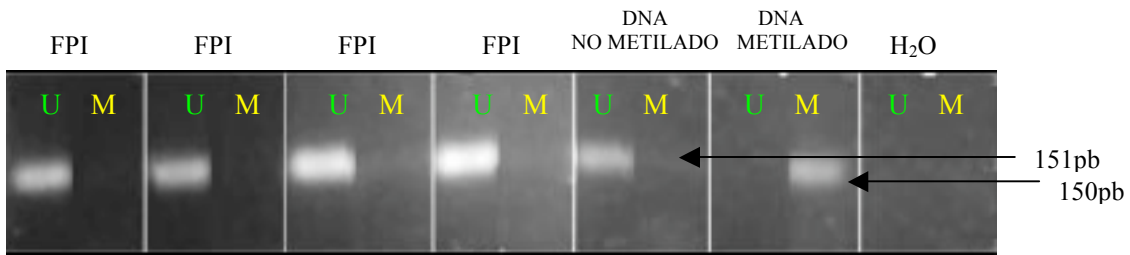


Figura 3. Gel de agarosa al 2% que muestra los productos de amplificación del gen p16 en tejidos de pulmón congelado obtenidos por MS-PCR.

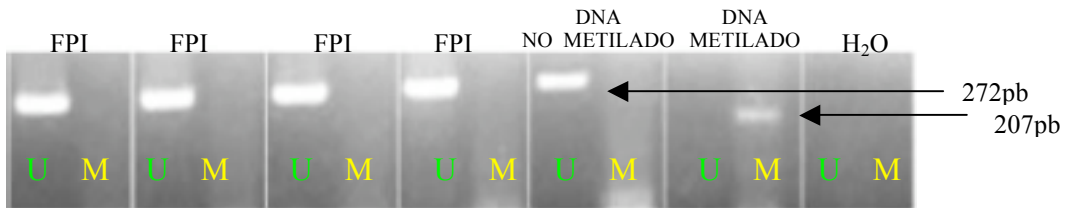


Figura 4. Gel agarosa al 2% que muestra el resultado del análisis de metilación por MS-PCR para el gen TMS1 en muestras de tejido congelado de pacientes con FPI.

DAPK

Para el gen DAPK se encontró que el 100% de los tejidos analizados por MS-PCR presentan una banda de amplificación de ~106 pb con los primers M, lo cual indica que en las muestras se presenta el alelo metilado. Así mismo, todas las muestras amplificaron con los primers U y en el gel se observa la banda correspondiente con un tamaño aproximado de 98 pb (Figura 5). Así mismo, los controles positivos

amplificaron correctamente con su correspondiente par de primers y los negativos sin DNA no amplificaron.

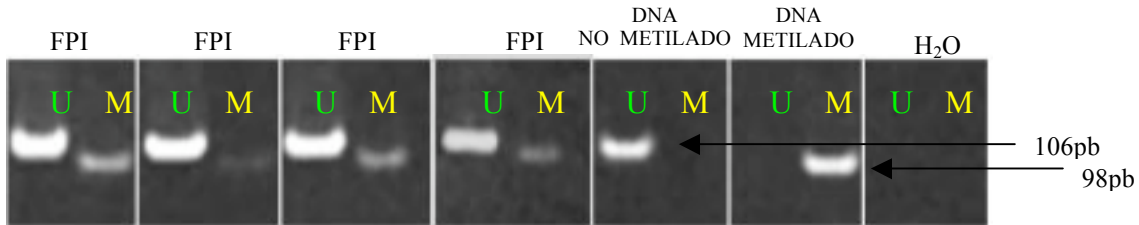


Figura 5. Gel de poliacrilamida al 6% que muestra el resultado del análisis de metilación por MS-PCR para el gen DAPK en muestras de tejido congelado de pacientes con FPI.

CASPASA-8

El resultado del análisis de MS-PCR para el gen de caspasa-8 se muestra en la figura 6. Todos los tejidos amplificaron con los primers no metilados y en ellos se observa la banda correspondiente de 165 pb. Sin embargo, solo en 1 de las cuatro muestras de tejidos se pudo amplificar la banda de 212 pb correspondiente al alelo metilado. Los controles positivos amplificaron correctamente y en los negativos no se observaron bandas de amplificación.

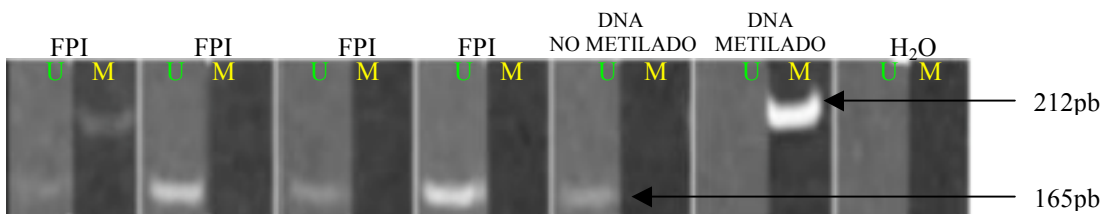


Figura 6. Gel de poliacrilamida al 6% el resultado del análisis de metilación por MS-PCR para el gen Caspasa-8 en muestras de tejido congelado de pacientes con FPI.

MS-PCR de focos de fibroblastos.

Se analizaron 2 muestras de DNA proveniente de DNA de focos de fibroblastos aislados por LCM de tejidos incluidos en parafina de pacientes diagnosticados con FPI y una muestra de un paciente diagnosticado con bronquiolitis obliterante con neumonía organizada (BOOP) La cual se incluyo para hacer un comparativo de los focos de fibroblastos ya que en esta patología, a diferencia de la FPI, sí se resuelve el exceso de células mesenquimales. En estas muestras sólo se realizó el análisis de metilación para los genes p16 y DAPK.

Para p16 se encontró que las dos muestras de FPI amplificaron únicamente para el alelo metilado mientras que en la muestra de BOOP sólo se amplificó el que no está metilado (Figura 7). Por otro parte, para el gen DAPK se observó que una muestra de FPI presentó la banda de amplificación correspondiente al alelo metilado (Figura 8).

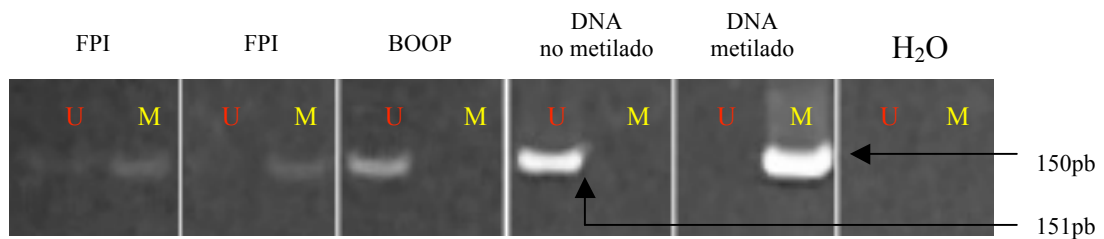


Fig.7 Gel de agarosa al 2% que muestra los resultados de amplificación por MS-PCR del gen p16 de tejidos incluidos en parafina.

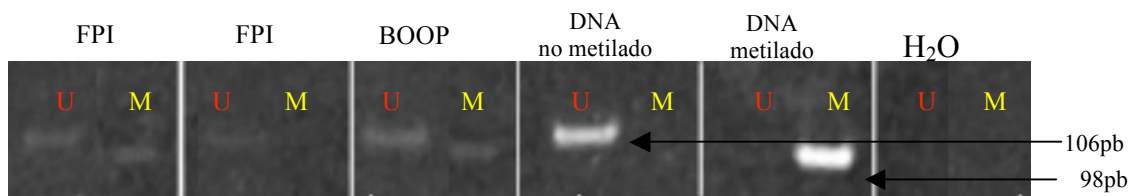


Figura 8. Gel de poliacrilamida al 6% del análisis de metilación por MS-PCR para DAPK en muestras de tejidos incluidos en parafina de pacientes con FPI y BOOP.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La metilación del DNA es un fenómeno epigenético que se sabe tiene un papel importante en la etiología de distintas enfermedades crónicas, de entre las cuales destacan diferentes tipos de cáncer. Diversos estudios sugieren que la hipermetilación de la región promotora afecta la respuesta apoptótica de ciertos tipos celulares en distintos órganos, esto debido a que muchos de los genes que se encuentran hipermetilados son genes que participan en la muerte celular por apoptosis.

Una característica fundamental de la FPI es la formación de focos de fibroblastos en el intersticio pulmonar y una probabilidad de que estos fibroblastos permanezcan y se perpetúen es que éstos sean resistentes a la apoptosis. En este contexto, la apoptosis juega un papel decisivo tanto en el mantenimiento de la homeostasis normal del pulmón así como en la remodelación asociada con la enfermedad fibrosante pulmonar, así mismo la apoptosis en las células epiteliales puede ser un factor decisivo en esta patología, ya que, puede generar un ambiente profibrótico por si mismo, aunque también puede ayudar a resolver la correcta reparación del daño al eliminar el exceso de células del espacio alveolar, después de la correcta reepitelización.(8).

En este estudio analizamos el estado de metilación de algunos genes involucrados en la respuesta apoptótica (p16, Caspasa-8, TMS1 y DAPK) en DNA de tejidos congelados de biopsias de pacientes con FPI y en DNA derivado de focos de fibroblastos recolectados por LCM. Mediante la técnica de MS-PCR, en este trabajo encontramos que el gen DAPK se encuentra metilado en su región promotora en todas las muestras de tejidos congelados y sólo en una de estas

muestras también se observó para caspasa-8. En estas mismas muestras el resultado indica que TMS1 y p16 no se encuentran metilados.

Por otra parte y sorpresivamente, el análisis de DNA de focos fibroblásticos indicó que en las dos muestras de FPI el promotor de p16 se encuentra completamente hipermetilado, lo cual no ocurre con la muestra de BOOP y para el gen DAPK, sólo se encontró metilación en una muestra de FPI.

El hecho de que en muestras de pulmón de pacientes con FPI se haya encontrado metilación positiva para los genes DAPK y p16 es un hallazgo importante, ya que estos son considerados como genes pro-apoptóticos y que se hayan encontrado metilados, podría ser indicativo de que en esta enfermedad, estos genes podrían estar apagados y sugiere que en estos pulmones haya células resistentes a la apoptosis.

De los resultados encontrados, quizás el de DAPK sea el más consistente ya que se encontró metilado en muestras de tejido congelado y de focos de fibroblastos.

Sin embargo, resultó muy interesante que el estudio de metilación para p16 fuera negativo en tejidos congelados, pero positivo en DNA de los focos, aunque en este caso sólo fueron 2 muestras. Este último resultado toma una gran importancia, ya que se ha sugerido que los fibroblastos de los focos son resistentes a la apoptosis y de hecho se ha observado que fibroblastos de focos fibroblásticos de pacientes con FPI presentan una menor actividad apoptótica en comparación con los fibroblastos de pacientes con BOOP (40). Más recientemente, se ha observado que células mesenquimatosas derivadas de pacientes con daño pulmonar agudo persistente adquieren un fenotipo anti-apoptótico a través de la activación del mecanismo de sobrevivencia celular inducido por PI3K-Akt (10). En este sentido,

la hipermetilación de p16 en los focos de fibroblastos podría ser en parte, uno de los mecanismos que regulan el “fenotipo anti-apoptótico” de estas células.

El resultado de metilación positivo que encontramos para Caspasa-8 en sólo uno de los tejidos de FPI nos sugiere que hace falta un estudio mas profundo para determinar el papel que juega caspasa-8 en la Fibrosis Pulmonar Idiopática.

La apoptosis es un fenómeno que se genera todo el tiempo en el pulmón, pero las repercusiones de este proceso afectan dependiendo del tipo celular que se encuentre en el contexto, es por eso que para estudios posteriores se podrían utilizar microdisecciones para obtener cada estirpe presente en la arquitectura del pulmón y así, saber exactamente qué sucede con la epigenética en los diferentes tipos celulares.

Finalmente este estudio sugiere que la metilación del gen DAPK y p16 puede tener un efecto profibrosante al generarse la represión de dichos genes. Esto a su vez originaría una resistencia a la apoptosis en tipos celulares específicos como los fibroblastos y miofibroblastos, los cuales son los responsables del depósito excesivo de matriz extracelular característico de la fibrosis pulmonar idiopática.

REFERENCIAS.

1. Ryu, J. H., Daniels, C. E., Hartman, T. E., Yi, E. S. Diagnosis of Interstitial Lung Diseases. *Mayo Clin Proc*(2007).. 82: 976-986
2. Green, FH Overview of pulmonary fibrosis. *Chest* 2002;122(suppl),334S-339S
3. Pardo A, Selman M. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front Biosci.* 2002;7:d1743-61
4. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and Evolving Hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy *Annals of Internal Medicine.* 2001;134:136-151
5. Selman, M., y Pardo., A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. (2006) *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3:364-372.
6. Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., Thompson, E. W.. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. (2006). *JCB* 172: 973-981
7. M Selman, M Montaña, C Ramos, R Chapela. Concentration, biosynthesis and degradation of collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax.* 1986; 41(5):355-9
8. Fattman CL. Apoptosis in pulmonary fibrosis:too much or not enough? *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 379–385, 2008.
9. Edinger A, Thompson C, Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy, *Current Opinion in Cell Biology* 2004; 16:663-669.
- 10.Thannickal V, Horowitz J. Evolving Concepts of Apoptosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3(4): 350-356.
- 11.B.D. Uhal, Epithelial apoptosis in the initiation of lung fibrosis. *Eur. Respir. J.*, September 20, 2003; 22(44_suppl): 7s - 9s

12. Fine A, Janssen-Heininger Y, Sulttanakis RP, Swisher SG, Uhal BD Apoptosis in lung pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L423–L427
13. V A Polunovsky, B Chen, C Henke, D Snover, C Wendt, D H Ingbar, and P B Bitterman Role of mesenchymal cell death in lung remodeling after injury. *J. Clin. Invest.* 92, 388-97, 1993
14. Uhal BD, Joshi I, Hughes WF, Ramos C, Pardo A, and Selman M Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblast in advanced fibrotic human lung *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2001; 24(5) 591-598. 7.
15. Yan N, Shi Y. Mechanisms of Apoptosis Through Structural Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005; 21:35-56.
16. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell(Cambridge)* 1997; 88:33, 355-365, Cell Press.
17. G Nunez, MA Benedict, Y Hu, N Inohara Caspases: The proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17, 3237-3245, 1998
18. B Fadeel, B Zhivotovsky, S Orrenius All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. *FASEB J* 13, 1647-1657, 1999.
19. Hockenberry, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., Korsmeyer, S.J.. Bcl-2 is a inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348, 202-206.
20. Chang H, Yang X. Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 2000;. 821-846.
21. Gopisetty G, Ramachandran K, Singal R. DNA methylation and apoptosis. *Mol Immunol* 2006; 43:1729–1740.
22. Bird A, DNA methylation patterns and epigenetic memory *Genes & Dev.*, January 1, 2002; 16(1): 6 – 21
23. Ehrlich, M., Gama-Sosa, MA, Huang, LH, Miogett, RM, Kuo, KC, McClune, RA, Grenhoke, C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 1982; 1: 2709–2721.
24. Bird, A.P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321:209-213.

25. Antequera, F., Bird, A. Number of CpG islands and genes in human and mouse *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90: 11995-11999.
26. Turek-Plewa J, Jagodzinsky P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression *Cellular & Molecular Biology letters* 2005; 10:631-647.
27. Estecio M, Gharibyan V, Shen L, Ibrhin A, Doshi K, He R, Jelinek J, Yang A, Yan P, Huang T, Tajara E, Issa J Line-1 Hypomethylation in cancer is highly variable and inversely correlated with microsatellite instability. *PLoS ONE* 2(5): 2007 e399.
28. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, 2002; 21: 5427-5440.
29. Graff, J.R., Herman, J.G., Myohanen, S., Baylin, S.B., Vertino, P.M. Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in *de novo* methylation. *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 22322–22329.
30. Song J, Stirzaker C, Harrison J, Malki J, Clark S, Hypermethylation trigger of the glutathione-S-transferase gene (GSTP1) in prostate cancer cells *Oncogene* 2002; 21, 1048-1061.
31. Baylin S, Esteller M, Rountree M, Bachman K, Schebel K, Herman J. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer *Human Molecular Genetics*, 2001; Vol. 10, No. 7 687-692.
32. McConnell BB, Vertino PM. TMS1/ASC: the cancer connection. *Apoptosis* 2004;9:5–18.
33. Toyooka S, Toyooka K, Miyajima K, Reddy J, Toyota M, Sathyanarayana U, Padar A, Tockman M, Lam S, Shivapurkar N, Gazdar A.. Epigenetic Down-Regulation of Death-Associated Protein Kinase in Lung Cancers *Clinical Cancer Research* 2003; 9: 3034-3041.
34. Kim M, Katayose Y, Rojanala L, Shah S, Sgagias M, Jang L, Jung Y-J, Hwang S-G, Cowan KH. Induction of apoptosis in p16 INK4A mutant cell lines by adenovirus-mediated overexpression of p16 INK4A protein. *Cell Death and Differentiation*. 2000; 706-711.
35. Kataoka M, Wiehle S, Spitz F, Schumacher G, Roth JA and Cristiano RJ. Down-regulation of bcl-2 is associated with p16INK4-mediated apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 2000;19:1589–1595

36. Chien W, French M. Régulation de p16INK4a, sénescence et oncogénèse. *Medecine/sciences* 2006; 22 :865-71.
37. Teitz T, Lahti JM, Kidd VJ. Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. *J Mol Med* (2001) 79:428-436
38. Grener J, Teitz T, Wei T, Valentine V, Kidd VJ. Structure and chromosome localization of the human CASP8 gene. *Gene* 1999; 226(2):225-32
39. Herman J. G., Graff J. R., Myohanen S., Nelkin B. D., Baylin S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93: 9821-9826.
40. Lappi-Blanco E, Soini Y, Paakko P, Apoptotic activity is increased in the newly formed fibromyxoid connective tissue in bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *Lung* 1999; 177:367-37.