



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA**

**ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS PROFIBROSANTES POR
CÉLULAS EPITELIALES DE PULMÓN SENESCENTES Y SU EFECTO SOBRE
FIBROBLASTOS PULMONARES.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

DAVID MELQUIADES MEDINA PÉREZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MOISÉS SELMAN LAMA
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARINA MACÍAS SILVA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DR. DAVID KERSHENOBICH STALINICOWITZ
FACULTAD DE MEDICINA**

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA**

**ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS PROFIBROSANTES POR
CÉLULAS EPITELIALES DE PULMÓN SENESCENTES Y SU EFECTO SOBRE
FIBROBLASTOS PULMONARES.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

DAVID MELQUIADES MEDINA PÉREZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MOISÉS SELMAN LAMA
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARINA MACÍAS SILVA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DR. DAVID KERSHENOBICH STALINIKOWITZ
FACULTAD DE MEDICINA**

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2013

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de (Biología Experimental y Biomedicina), en su sesión ordinaria del día 22 de abril de 2013, aprobó el jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **MEDINA PÉREZ DAVID MELQUIADES** con número de cuenta **301220741**, con la tesis titulada **“ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS PROFIBROSANTES POR CÉLULAS EPITELIALES DE PULMÓN SENESCENTES Y SU EFECTO SOBRE FIBROBLASTOS PULMONARES”**, bajo la dirección del **DR. MOISES SELMAN LAMA:**

Presidente: **DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**
Vocal: **DR. VÍCTOR MANUEL RUIZ LÓPEZ**
Secretario: **DR. JORGE ANTONIO GARCÍA ÁLVAREZ**
Suplente: **DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ**
Suplente: **DRA. MARINA MACIAS SILVA**

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de mayo de 2013



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

Agradecimientos.

- ❖ Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme la oportunidad de pertenecer a su programa reconocido mundialmente.

 - ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me proporciono (No. de registro 255162).

 - ❖ De manera muy especial agradezco a mi tutor el Dr. Moisés Selman Lama y a los miembros de mi comité tutor, la Dra. Marina Macías Silva y el Dr. David Kershenobich Stalinikowitz.
-

Agradecimientos personales.

Al Dr. Moisés Selman y a la Dra. Annie Pardo por el apoyo y los consejos brindados a todo lo largo de este ciclo, para mejorar la calidad de mi trabajo y principalmente para mejorar mi formación académica, además de ser ambos son un ejemplo a seguir.

Al Dr. Jorge García, por el apoyo, consejo, ayuda y tiempo dedicado a mi formación, no solo en este trabajo, sino a todo lo largo de mi estadía en este grupo de trabajo.

A la Maestra Remedios Ramírez, de igual modo, por su conocimiento brindado a todo lo largo de mi paso por este laboratorio, instruyéndome no solo en el actuar técnico, sino también en el personal.

A Jazmín, que me ayudo en tantas ocasiones, a veces con resultados positivos, a veces desastrosos, pero siempre con una buena disposición.

A todos mis compañeros de laboratorio que hicieron los días amenos y el trabajo siempre grato, Yair, Adrian, Luis, Diana, Paul, Miguel Negreros, Miguel Cid, Semiramis, Mariel, Fabián, Mariana, a las Doctoras Sandra y Angélica, a la Maestra Isabel y al Doctor Alfonso.

A Elizabeth, que siempre estuvo para acompañarme en los días malos y buenos, siendo un muy gran apoyo para mí en todo momento.

A mis amigos, nuevos y viejos, por los momentos compartidos, algunos alegres, otros no tanto, pero siempre presentes para mí. Mayra, Toño, Victor, Brenda, Berenice, Meche, Rafael. Algunos distantes, pero siempre considerados amigos.

A mis hermanos Juan, Abraham e Irving, que cada día y cada logro que tengo, siempre están conmigo y son parte fundamental de ellos.

A mis padres, por haberme traído al mundo, y darme la oportunidad de estar donde estoy, y de llegar a donde me lo proponga.

Ab ímo pectore.

Y por último, a ti Universidad, que me hiciste lo que soy, que me diste tantas cosas, y que en tus aulas y espacios aprendí, no solo los conocimientos académicos dados por mis profesores, sino algo más importante, el cómo vivir y convivir con mis iguales. Por ti tuve la oportunidad de conocer a tantas personas de caracteres tan distintos, gracias a ti conocí a grandes personas, y tuve el honor de ser amigo de ellas, no solo compañeros, de igual modo profesores y trabajadores. Por todo ello, ¡Gracias UNAM!

¡Por mí raza hablara el espíritu!

El primer paso de la ignorancia
es presumir de saber.

Albert Einstein.

Índice.

1. Resumen.	1
2. Abstract.	3
3. Introducción.	4
3.1 Senescencia.	4
3.2 Senescencia asociada a un fenotipo secretor.	7
3.3 Fibrosis Pulmonar Idiopática.	11
4. Hipótesis.	15
5. Objetivos.	15
6. Material y métodos.	16
6.1. Obtención de cultivos.	16
6.2. Inducción de senescencia.	16
6.3. Reacción de β -galactosidasa.	17
6.4. Extracción de RNA.	17
6.5. Transcripción reversa.	18
6.6. PCR en tiempo real.	19
6.7. Western blot.	20
6.8. Ensayo de zimografía.	21
6.9. Tasa de crecimiento.	22
6.10. Estimulación de fibroblastos.	22
6.11. Cuantificación de colágena.	23
6.12. Análisis estadístico.	23
7. Resultados.	24

7.1. Protocolo de desarrollo de senescencia en células epiteliales A549.	24
7.2. Efecto de la senescencia sobre la expresión de diversos mediadores proinflamatorios y profibrosantes.	27
7.3. Efecto de la senescencia sobre la actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9.	28
7.4. Efecto de la senescencia sobre la expresión de E-Cadherina.	30
7.5. Efecto de las células epiteliales senescentes sobre la activación de fibroblastos pulmonares.	31
8. Discusión.	37
9. Conclusiones.	41
10. Bibliografía.	42
11. Lista de abreviaturas.	46
11. Apéndice 1.	48
12. Apéndice 2.	49

Resumen.

La senescencia celular es un proceso caracterizado por el arresto definitivo del ciclo celular, la resistencia a la apoptosis, y la modificación de la transcripción génica global. Este proceso se ha encontrado asociado al envejecimiento y a patologías relacionadas con el mismo. Se han descrito múltiples factores que intervienen en el desarrollo de la senescencia, entre los que se encuentran el estrés oxidante, anomalías en los sistemas de reparación del material genético y activación de oncogenes, entre muchos otros. La presencia de la senescencia se ha descrito en múltiples enfermedades, sin llegar a dilucidarse si este fenómeno es benéfico, perjudicial o irrelevante para la regeneración del tejido.

En la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), se ha reportado que las células epiteliales se encuentran en un estado senescente, sin embargo el papel que este proceso desempeña dentro del desarrollo de la fisiopatología es desconocido. Reportes previos han demostrado que en la FPI las células del epitelio alveolar secretan una gran cantidad de mediadores incluyendo factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas, los cuales participan en la promoción de la migración y proliferación de fibroblastos así como en su diferenciación a miofibroblastos, favoreciendo de este modo la acumulación de proteínas de matriz extracelular, principalmente la colágenas fibrilares lo cual destruye la arquitectura pulmonar.

Se conoce que las células senescentes secretan una gran variedad de moléculas pro-inflamatorias. Sin embargo, no se han realizado estudios sobre la participación de la senescencia en enfermedades pro-fibrosantes. Por este motivo, en este trabajo se evaluaron los niveles de expresión de un conjunto de moléculas profibrosantes que se han

reportado como secretadas por el epitelio alveolar en la FPI, por células epiteliales senescentes y controles in vitro, así como el efecto que éstas tienen sobre los fibroblastos pulmonares.

Abstract.

Cellular senescence is a process characterized by definite cell cycle arrest, apoptosis resistance, and changes in global gene transcription. This process has been found associated with aging and diseases related thereto. Described multiple factors involved in the development of senescence, among which are oxidative stress, abnormal repair systems of genetic material and oncogene activation, among others. The presence of senescence described in many diseases, without actually clarified whether this phenomenon is beneficial, damaging, or irrelevant for tissue regeneration.

In idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), it has been reported that epithelial cells are found in a senescent state, however the role it plays in the development process of the pathophysiology is unknown. Previous reports have shown that in IPF alveolar epithelial cells secrete a large number of mediators, including growth factors, cytokines and chemokines, which are involved in promoting the fibroblasts migration and proliferation as well as differentiation into myofibroblasts, favoring in this way the accumulation of extracellular matrix proteins, mainly fibrillar collagen which destroys lung architecture.

It is known that senescent cells secrete a variety of pro-inflammatory molecules. However, there have been no studies on the participation of senescence in profibrosing diseases. For this reason, in this work we evaluated the expression levels of a set of profibrosing molecules that have been reported to be secreted by the alveolar epithelium in IPF, senescent epithelial cells in vitro and controls, and the effect you are have on lung fibroblasts.

Introducción.

Senescencia.

En 1961, Leonard Hayflick y Moorhead Pablo descubrieron que fibroblastos normales humanos tenían una capacidad limitada de proliferación in vitro, un fenómeno que se denominó senescencia replicativa en la que se propuso que este potencial predeterminado de pasajes en cultivo, más adelante denominado el "límite Hayflick", se debía a un sistema anómalo de auto-replicación, e interpretaron estos resultados como la base de los mecanismos celulares subyacentes al envejecimiento del organismo. Posteriormente se demostró que los telómeros se acortan a medida que las células diploides alcanzan su máximo potencial de replicación, actuando como relojes mitóticos en la regulación de la senescencia replicativa (1, 2).

De acuerdo con lo sugerido por las observaciones iniciales de Hayflick, se ha demostrado en vivo que el número de células senescentes aumentan con la edad en varios órganos y tejidos, utilizando para ello la actividad de la β -galactosidasa (β -gal) ahora conocida como senescencia asociada a β -Gal (SA- β -Gal). Sin embargo, la senescencia replicativa no es la única causa para la acumulación de células senescentes en

tejidos de mamíferos, siendo la llamada senescencia celular otra forma de senescencia que contribuye a esta acumulación, la cual puede ser generada por diversos tipos de estrés como la falta de nutrientes, estrés oxidante, daño al material genético entre otros. (**Figura 1**) (3).

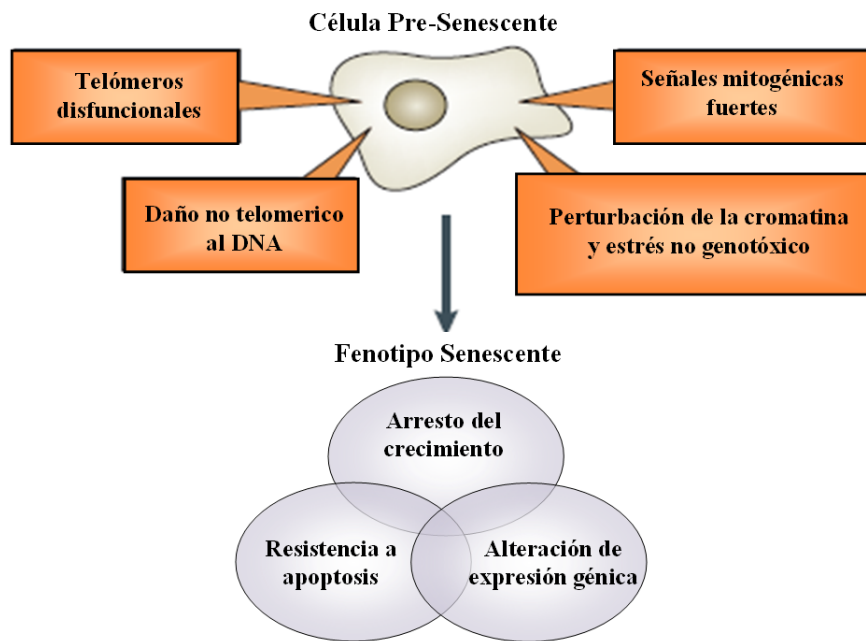


Figura 1. El fenotipo senescente puede ser inducido por múltiples estímulos, o por proliferaciones sucesivas y acortamiento de los telómeros.

La respuesta senescente causa cambios que llevan en esencia al arresto de la proliferación celular, al desarrollo de resistencia a apoptosis (en células somáticas) y a la alteración de los patrones de expresión génica (modificado de Campisi J. 2007).

Se han propuesto muchos mecanismos que pueden contribuir al proceso de senescencia, incluyendo alteraciones en el mantenimiento del genoma y el estrés oxidante con la consecuente acumulación de radicales libres. En relación a

los efectos de la senescencia se ha planteado la hipótesis, tanto para la senescencia replicativa como para la senescencia celular, de que éstas contribuyen a la reducción de la capacidad de regeneración, a la disfunción tisular y a la enfermedad. Sin embargo, no se habían dilucidado los mecanismos a través de los cuales las células senescentes podían tener efectos negativos o positivos, hasta que se descubrió que éstas tienen un patrón alterado de la expresión génica en comparación con células no senescentes del mismo linaje (3, 4).

Las células senescentes tienen un fenotipo complejo caracterizado por la interrupción irreversible del ciclo celular mediado predominantemente por p21 o p16 (**Figura 2**), aumento del tamaño celular, morfología alterada, resistencia a la apoptosis, expresión génica alterada incluyendo la regulación positiva de SA- β -Gal, y la adquisición de un perfil único de secreción que se conoce como la senescencia asociada a fenotipo secretor (SAFS) (3-5).

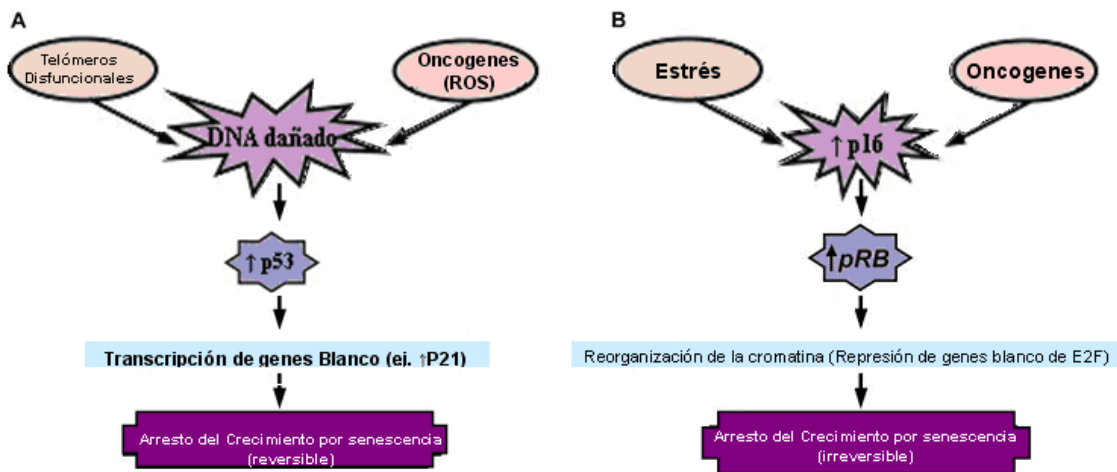


Figura 2. Papel de las vías de p53 y p16/pRB en la respuesta a senescencia.

(A) **La ruta de p53 a senescencia.** Causas posibles: el daño al DNA, telómeros disfuncionales, estrés genotóxico del tipo producido por ROS, rutas de señalización que se activan en respuesta al daño por p53 y la transcripción de genes dependientes de p53, todos ellos inducen el arresto de la proliferación típico de senescencia. (B) **La ruta de pRB a senescencia.** Oncogenes y otros tipos de estrés inducen a p16, el cual activa a pRB. Este gen reprime a través de la formación de focos de heterocromatina los cuales contienen blancos de E2F y otros posibles genes que promueven el crecimiento (modificado de Campisi J. 2005).

Senescencia asociada a un fenotipo secretor.

La senescencia asociada a un fenotipo secretor (SAFS) se compone principalmente de tres clases de proteínas secretadas: (i) quimiocinas y citocinas inflamatorias, (ii) proteasas de remodelación de la matriz, y (iii) factores de crecimiento. La señalización de SAFS es compleja y puede tener efectos opuestos en diferentes condiciones (6).

Datos recientes indican que la SAFS de fibroblastos y células epiteliales senescentes muestran, con algunas excepciones, una considerable semejanza. Por otro lado, aunque la SAFS está asociada a la senescencia, no parece ser el resultado de la actividad de p53/p21 o p16 (7). Evidencias experimentales sugieren más bien que la SAFS está regulada por una respuesta al daño en el DNA o por señalización relacionada con p38MAPK dependiendo de la naturaleza y el contexto del factor estresante (8,9).

Los factores secretados en la SAFS pueden dividirse en las siguientes categorías principales: factores solubles de señalización (interleucinas, quimiocinas, y factores de crecimiento), proteasas y proteínas insolubles componentes de la matriz extracelular (MEC). Las proteasas en la SAFS puede tener tres efectos principales: (a) desprender proteínas asociadas a la membrana, resultando en versiones solubles de receptores unidos a la membrana, (b) escindir o degradar moléculas de señalización, y (c) remodelar la MEC. Estas actividades proporcionan potentes mecanismos por los cuales las células senescentes pueden modificar el microambiente del tejido (10).

La SAFS puede ser beneficiosa debido a que algunos componentes refuerzan el arresto del crecimiento por una red

autócrina de citocinas. Además, muchos componentes de la SAFS se producen para estimular la reparación y regeneración de tejidos, y/o actuar como señales de peligro dentro de la vecindad de los tejidos o a nivel de organismo. Por lo tanto, las células que experimentan senescencia inicialmente pueden señalar daño tisular, e iniciar la reparación del mismo a través de la SAFS. Tal efecto beneficioso sería el de células no autónomas en función de la senescencia celular. Sin embargo, cuando se presenta crónicamente, la actividad secretora de las células senescentes puede ser perjudicial alterando la estructura y función del tejido normal, y eventualmente estimulando la remodelación tisular asociada con la edad o promover fenotipos malignos (10, 11).

A pesar del hecho de que se aumenta la secreción de un número significativo de factores en la senescencia, la SAFS no es un regulador positivo general o inespecífico de la secreción. Los niveles de expresión de muchos factores secretados no cambian cuando las células entran en senescencia. Entre las moléculas que no se modifican se encuentran factores anti-inflamatorios solubles, tales como Interleucinas-2, -4, -10, -11, y -12 (10). CXCL-1, Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas tipo B (PDGF-BB), y LIGTH (todos esenciales para la migración diferenciación o

proliferación de leucocitos) se mantienen sin cambios cuando los fibroblastos son inducidos a envejecer por radiación, la sobreexpresión de RAS, o agotamiento replicativo. (11).

Las células senescentes a menudo están presentes en enfermedades crónicas. Se ha documentado que pueden desarrollarse debido a ciertos tratamientos, incluyendo la quimioterapia y la radioterapia. Sin embargo, no se conoce con precisión si las células senescentes están implicadas en la patogénesis de los padecimientos relacionados con la edad o simplemente son causadas por el proceso de envejecimiento (12).

La senescencia celular también se ha implicado en la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), una enfermedad respiratoria progresiva, en la que en las paredes alveolares se acumulan cantidades excesivas de colágena, causando pérdida de la distensibilidad pulmonar, restricción en la ventilación y destrucción del parénquima. Al igual que lo que sucede en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la edad es un factor de riesgo importante para el desarrollo de la FPI, ya que en general esta enfermedad ocurre en individuos de más de 50 años (12, 13). Recientemente se reportó que células del epitelio alveolar de pacientes con FPI se tiñen positivamente para SA- β -Gal y contienen niveles elevados del marcador de

senescencia p21. Aunque fue un trabajo descriptivo, los autores postularon que los componentes de la SAFS de células senescentes, tales como IL-6, IL-8 e IL-1 β , podían promover la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y la transición epitelial-mesénquima, resultando en una amplia remodelación de la matriz extracelular de los espacios alveolares e intersticiales (12, 14).

Fibrosis Pulmonar Idiopática.

La fibrosis pulmonar idiopática es la más común y agresiva de las enfermedades intersticiales idiopáticas siendo generalmente progresiva, irreversible y letal en un plazo breve de tiempo. La edad promedio de los pacientes al momento del diagnóstico es de 66 años, con un rango de 50 a 75 años. Aunque su etiología no se conoce, la FPI se ha asociado al hábito de fumar. En un estudio de corte realizado en los Estados Unidos se reportó que la FPI tiene una incidencia anual de 16 casos por cada 100,000 habitantes (14, 15).

La primera hipótesis que se planteó sobre la patogénesis de esta enfermedad planteó la idea de que una inflamación crónica desempeñaba un papel esencial, explicando que las alteraciones en el epitelio alveolar caracterizados por pérdida de los neumocitos tipo 1 y proliferación de los de tipo 2, eran causados

por procesos inflamatorios crónicos sin resolver, y que las células epiteliales eran en realidad víctimas de la agresión y el consecuente microambiente inflamatorio. Posteriormente, las células inflamatorias eran también las responsables de la activación de los fibroblastos y la fibrosis (15).

Sin embargo, en la década pasada se propuso que la FPI es probablemente el resultado de múltiples ciclos de daño al epitelio y su consecuente activación aberrante, lo que provoca la migración, proliferación y activación de células mesenquimales con la formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos, lo que conduce a la exagerada acumulación de MEC y la remodelación anormal del daño (Fig. 3) (15, 16). En otras palabras, esta hipótesis reemplazó la teoría inflamatoria por la teoría epitelial.

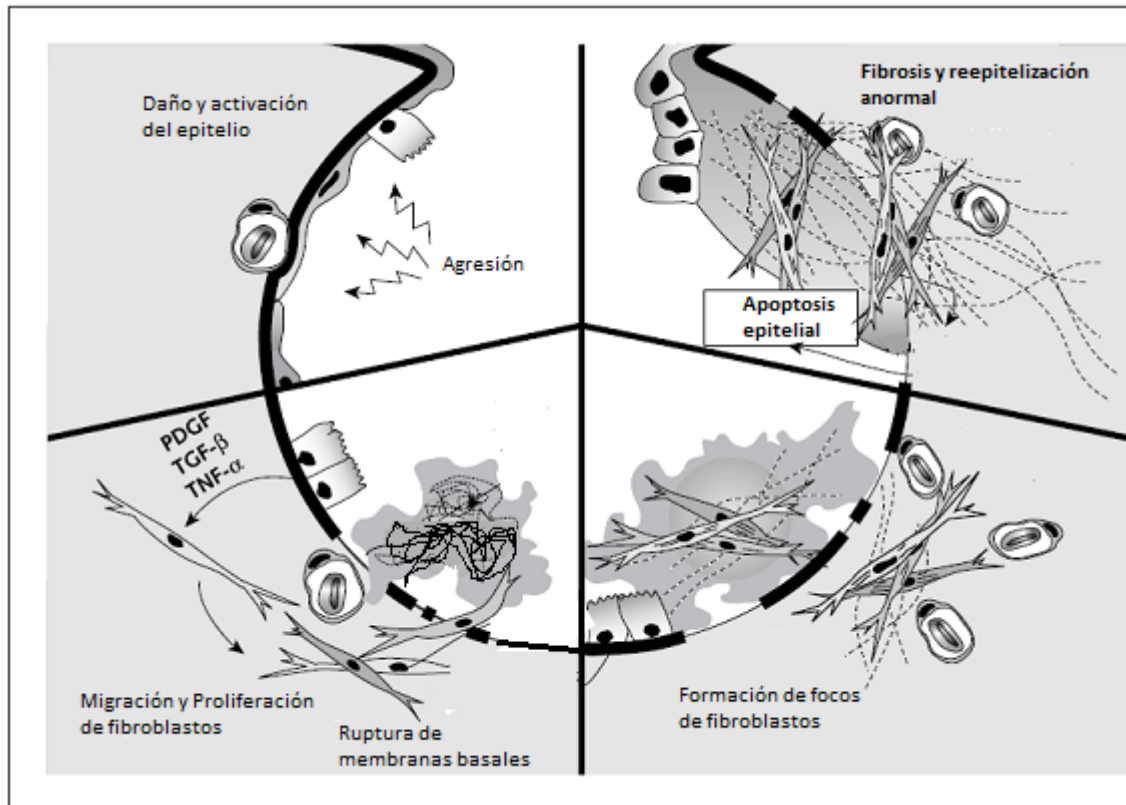


Figura 3. Las múltiples microlesiones dañan y activan a las células epiteliales alveolares (arriba a la izquierda), que a su vez inducen un entorno antifibrinolítico en los espacios alveolares, evitando la degradación de la matriz provisional que sigue a la herida. Las células epiteliales alveolares secretan factores de crecimiento e inducen la migración y proliferación de fibroblastos y la diferenciación a miofibroblastos (parte inferior izquierda). Los miofibroblastos y las células del epitelio alveolar producen gelatinasas que pueden aumentar la ruptura de la membrana basal y permitir la migración de fibroblastos-miofibroblastos (parte inferior derecha). Ambos, miofibroblastos intra-alveolares e intersticiales secretan proteínas de matriz extracelular, principalmente colágenas. Un desequilibrio entre las colagenasas intersticiales y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas favorece el depósito progresivo de la matriz extracelular (parte superior derecha).

En los adultos, los neumocitos tipo 1 cubren más del 90% de la superficie de intercambio gaseoso del pulmón, son células muy delgadas que se interconectan con los capilares pulmonares proporcionando una superficie de grosor mínimo permeable a gases. Los neumocitos tipo 2 son células cuboidales que se encuentran en las esquinas de los alveolos. Son células multifuncionales que secretan el surfactante pulmonar y sirven como células progenitoras de los neumocitos tipo 1 siendo estas capaces de repoblar el pulmón en caso de una agresión (16).

Uno de los rasgos histológicos más notable en los pulmones de pacientes con FPI es el incremento en el número de células epiteliales alveolares las que con frecuencia muestran fenotipos anormales, tales como la hiperplasia/hipertrofia de neumocitos tipo 2, principalmente en zonas fibróticas (17). Estas células epiteliales secretan una gran variedad de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que promueven la formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos. Además secretan también anormalmente metaloproteinasas de matriz (MMP) las cuales pueden participar, entre otros efectos, en la remodelación aberrante de la matriz extracelular característica de la FPI (18-20).

Hipótesis.

Las células epiteliales senescentes secretan moléculas que promueven el establecimiento de un fenotipo profibrótico en fibroblastos pulmonares favoreciendo la remodelación anormal de la matriz extracelular.

Objetivos.

- 1. Evaluar la producción de moléculas pro-fibrosantes provenientes de células epiteliales alveolares senescentes in vitro.*
- 2. Examinar el efecto de las moléculas secretadas por las células epiteliales senescentes sobre fibroblastos pulmonares humanos.*

Material y Métodos

Obtención de cultivos.

Las células epiteliales de pulmón A549, y los fibroblastos CCD25Lu se obtuvieron de la compañía *American Type Cell Culture* (ATCC) con los números de catalogo CCL-185 y CCL-215 respectivamente. Los fibroblastos primarios de pulmón se aislaron por tratamiento enzimático con Tripsina-EDTA (SIGMA) a 37° C, 20 minutos. Posteriormente los fibroblastos se sembraron en cajas Falcon de 25 cm² con medio F-12K (GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), penicilina y estreptomicina al 0.5%.

Inducción de senescencia.

Los cultivos de células epiteliales de pulmón A549 se sembraron en cajas de 6 pozos (9.6 cm²), 180,000 células por pozo, y se incubaron en medio F-12K con 10% de SFB por 24 horas. Posteriormente se les retiró el medio suplementado y se les agregó medio libre de SFB, y a las 48 horas se les agregó nuevo medio sin SFB con 30µM de H₂O₂. Las células epiteliales se dejaron 4 horas con el estímulo de H₂O₂ al término del cual se les retiro y se agregándose nuevamente medio fresco libre de SFB. Veinte horas después de retirado el estímulo se realizó el ensayo de actividad de la β-galactosidasa (para evaluar el porcentaje de células

senescentes), y se obtuvieron las fracciones de RNA y proteínas para los ensayos de expresión génica y de proteínas (21,22).

Reacción de β -galactosidasa.

Este estudio se realizó de acuerdo con el protocolo recomendado en el estuche *Senescence Cell* (SIGMA). Brevemente, a los cultivos celulares se les retiró el medio de cultivo, se lavaron dos veces con PBS 1X y se les adicionó el amortiguador de fijación 1X durante 6-7 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron en tres ocasiones con PBS 1X y se les adicionó la solución de tinción. Se incubaron a 37° C por 24 horas en ausencia de CO₂ y en oscuridad. Se lavaron con PBS 1X y se observaron al microscopio. La cuantificación de la senescencia se realizó mediante morfometría, tomando campos al azar y cuantificando las células con reacción positiva para la enzima, comparadas contra las que no tuvieron reacción.

Extracción de RNA.

La obtención de RNA de los cultivos celulares se realizó bajo el protocolo establecido para el reactivo TRIzol Reagent (Invitrogen). Se utilizó 1 ml de TRIzol por cada 10 cm², homogenizando suavemente la mezcla e incubando por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se adicionó 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol utilizado; las muestras se resuspendieron e incubaron a temperatura ambiente por 3 minutos, y se

centrifugaron a 12,000 revoluciones por minuto (rpm) a 4° C por 15 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se adicionó 0.5 ml de isopropanol por cada ml de TRIzol; se homogenizó e incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm a 4° C por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante por decantación y se adicionó 1 ml de etanol al 75% por cada ml de TRIzol. Las muestras se resuspendieron y centrifugaron a 7,500 rpm a 4° C por 5 minutos, se removió el sobrenadante con suavidad y se dejó secar a temperatura ambiente. Las muestras fueron resuspendidas en agua DEPC (dietilpirocarbonato al 0.1%), de 10 a 15 µl por cada ml de TRIzol.

Transcripción reversa.

Para realizar la RT-PCR primero se cuantificó la muestra utilizando el equipo NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) y posteriormente las muestras se trataron con DNasa para eliminar el DNA genómico que pudiera interferir con la reacción.

Se utilizó 1 µg de RNA al que se agregó 1 µl de DNasa (1U/µl) y 1 µl de amortiguador 10X (Invitrogen) y agua DEPC para un volumen final de 10 µl. Las muestras se incubaron a 25° C durante 15 minutos y después se adicionó ácido etilendiaminotetraacético 10X (EDTA, 25mM) para inactivar RNasas y se incubó a 65° C por 10 minutos para desnaturalizar a la DNasa.

Para la reacción de la RT-PCR se utilizó 1µg de RNA tratado con DNAsa el que se llevó a un volumen final de 12.5 µl. Se añadió 1 µl de hexámeros al azar y se calentó a 70° C por 2 minutos e inmediatamente después, se colocó en hielo. Posteriormente se le añadieron los reactivos para la reacción de RT-PCR (Clontech):

Buffer 5X	4 µl
dNTP's Mix (10 mM)	1 µl
Inhibidor de RNAasa (1U/µl)	0.5 µl
MMLV Transcriptasa Reversa	1 µl
RNA tratado con DNAasa (1 µg)	13.5 µl
Volumen final	20 µl

Se mezcló el contenido con la micropipeta e incubó a 42 °C por una hora y después se calentó a 94° C por 5 minutos para detener la reacción. La muestra fue llevada hasta un volumen final de 100 µl con agua DEPC.

PCR en tiempo real.

Para las reacciones de PCR en tiempo real se utilizaron sondas diseñadas por la compañía Applied Biosystems (Apéndice 1). El RNA ribosomal 18s fue utilizado para ajustar las diferencias en la cantidad de RNA total de cada muestra. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron en un termociclador Bio Rad, modelo CFX96 Real-Time System.

Se utilizaron las siguientes condiciones para la amplificación de los productos:

		45 ciclos	
50° C	95° C	95° C	60° C
2 min	10 seg	15 seg	1 min

Para determinar los niveles de concentración de RNA en las muestras, se realizó una diferencia relativa entre el ciclo de amplificación del gen endógeno (18s) y el gen de interés (2^{-dCT}).

Western blot.

Para la extracción de proteínas, se lavaron los cultivos con PBS 1X en dos ocasiones, se adicionó 100 µl de amortiguador para lisis por cada pozo y se incubó durante 5 minutos. Se levantó la monocapa de células con un rastrillo en un tubo de 1.5 ml, se centrifugó a 9500 rpm por 2 minutos y se recuperó el sobrenadante.

Se utilizaron 25µg de proteínas para ser separadas en geles de acrilamida SDS-PAGE al 12%. Posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF pre-humedecida con metanol y lavada con amortiguador TBS en una cámara semi-húmeda y después se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% en TBS-T por una hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron

con el anticuerpo primario a la concentración indicada por el proveedor durante toda la noche a 4° C en agitación constante (Apéndice 2) y al día siguiente se lavó la membrana en dos ocasiones con TBS-T por 15 minutos y se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a HRP. Para el revelado de la membrana se utilizó el kit Immobilon Western (MILLIPORE), la captura de la imagen se ejecutó en un equipo Chemidoc XRS+ (Bio-Rad) y los análisis densitométricos se realizaron utilizando el programa Quantity One^R 1D Analysis Software.

Ensayo de zimografía.

Para analizar la actividad enzimática de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9, se utilizó un microgramo de proteínas del medio condicionado de las células epiteliales control y senescentes el que se separó en un gel de acrilamida para condiciones nativas a una concentración del 8.5%, adicionando 1mg/ml de gelatina a los geles. Posteriormente los geles se trataron con una solución de Triton X-100 en dos ocasiones en agitación constante por 15 minutos, se lavaron después con abundante agua e incubaron durante toda la noche a 37° C en solución TRIS/ glicina pH 7.6 con CaCl₂ 10 mM y ZnCl₂ 50 nM. Ulteriormente los geles se tiñeron con azul brillante de Coomasie R250 y se destiñeron con una solución metanol/ Ac. acético. Las imágenes se tomaron y analizaron con el fotodocumentador Chemidoc XRS+.

Tasa de crecimiento.

Las células se sembraron en placas para cultivo de 96 pozos translucidas y se cultivaron por 24 horas en medio suplementado con SFB al 10%. Posteriormente se dejaron en medio libre de SFB por 24 horas y se realizó la primera lectura bajo las condiciones indicadas por el proveedor, utilizando 100µl de medio sin SFB más 10µl de reactivo WST. Se agregó a cada pozo 100µl de reacción, se incubó por una hora y se leyó en un lector de placas Multiskan EX, marca ThermoLabsystems a una longitud de onda de 450 nm y corrigiendo a una longitud de onda de 620 nm. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado para cada una de las condiciones. Las células epiteliales se trataron bajo las condiciones establecidas para el protocolo de inducción de senescencia en medio libre de SFB, realizando lecturas en cada uno de los tiempos que se delimitaron en dicho protocolo. Para los cultivos de fibroblastos se utilizó medio condicionado suplementado con 1% y 10% de SFB.

Estimulación de fibroblastos.

Se sembraron fibroblastos pulmonares humanos normales en cajas de 9.6 cm², (150,000 células por pozo), se cultivaron por 24 horas y posteriormente se les retiró el medio y se les adiciono solo el medio condicionado obtenido de las células epiteliales senescentes y control. Adicionalmente se agregó un grupo control

de fibroblastos con medio fresco libre de SFB y uno estimulado con TGF- β a 5ng/ml.

Cuantificación de colágena.

Se recuperó el medio condicionado de los fibroblastos estimulados con el medio condicionado de células epiteliales, se dializaron con membranas de exclusión menor a 12 kD, se concentraron las muestras a sequedad y se resuspendieron en 100 μ l de agua y se cuantificó la concentración de proteína. Posteriormente se adicionó 500 μ l del reactivo Sircol (Collagen Assay S1000, Biocolor) y se incubaron las muestras por 30 minutos en agitación constante. Se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 minutos a 4° C y se desechó el sobrenadante eliminando parte de los restos del sircol con un hisopo. Se adicionó 375 μ l de la solución *Acid Salt Wash* y se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm por 10 min a 4° C. Se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 125 μ l de la solución Alkali Reagent. Se utilizaron 100 μ l de muestra para leer a una longitud de onda de 550nm en un lector de placas de 96 pozos.

Análisis estadístico.

Los datos fueron expresados con promedio y desviación estándar. Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas mediante la prueba T-Student utilizando el paquete INERstat. Además las diferencias entre los grupos se establecieron mediante el método de máxima verosimilitud, cuando el valor de p fue menor a 0.05 ($p < 0.05$).

Resultados

Protocolo de desarrollo de senescencia en células epiteliales

A549

En primer lugar se estandarizó la concentración de peróxido de hidrógeno que debía utilizarse para inducir senescencia en cultivos de la línea celular A549. Para ello utilizamos dos marcadores reportados como característicos del fenotipo senescente, la β -galactosidasa y p21. La concentración óptima fue de 30 μ M con la cual se obtuvo de manera reproducible un ~30% de senescencia de las células epiteliales en comparación con el control que solo mostraban de un 5 a un 7%, utilizando el ensayo de β -Galactosidasa como referencia (**Figura 4**). Con estos ensayos, el protocolo de inducción de senescencia quedó como se muestra en la **figura 5**.

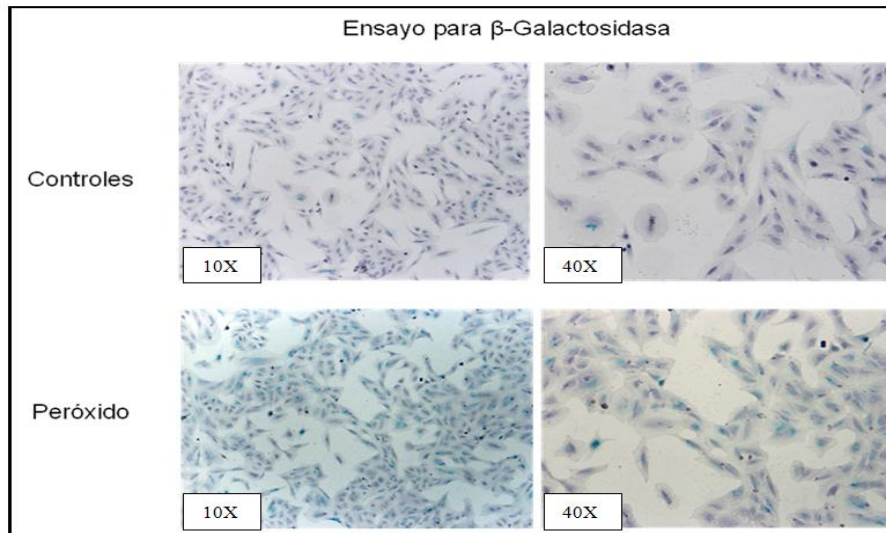


Figura 4. Reacción de β -Galactosidasa, en los cultivos de A549. Los cultivos fueron tratados con $30\mu\text{M}$ de peróxido de hidrogeno, y el ensayo se realizó a las 24 horas de iniciado el estímulo.

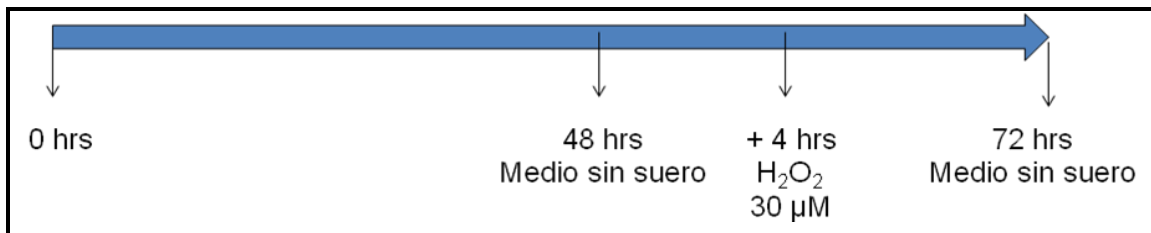


Figura 5. Esquema de los tiempos que se manejan para obtener la senescencia en los cultivos de A549.

Adicionalmente se realizó un Western blot para evaluar la presencia de la proteína p21 en el ensayo de inducción de senescencia. Sin embargo no se encontró un aumento significativo de dicha proteína en los cultivos tratados con $30\mu\text{M}$ peróxido de hidrógeno (**Figura 6**). Posteriormente se evaluó si el peróxido de hidrógeno tenía repercusiones sobre el número celular.



Figura 6. Western blot para analizar la concentración de p21. En los cultivos tratados con el peróxido de hidrógeno. No se encontró diferencias significativas entre las células tratadas y las células control (T-Student, n=3).

Se realizó un ensayo de proliferación para medir el efecto de la dosis utilizada de peróxido de hidrógeno en las células epiteliales cultivadas sin suero, y determinar si dicha concentración genera diferencias en el número celular. Al analizar este resultado, inicialmente se comparò la proliferación de los grupos sin y con suero (1%). En primera instancia las células se comportan como se ha observado en varios estudios de nuestro grupo, el grupo con suero prolifera más que el que no tiene, en segundo lugar se analizó lo que sucede cuando se agrega el peróxido de hidrógeno a la concentración ya establecida, y como se puede observar, las células tratadas con 30µM de peróxido de hidrógeno no presentaban diferencias con respecto a las células que fueron cultivadas solamente en medio sin suero (**Figura 7**). Esto nos indica que el tratamiento con esta concentración de peróxido no tiene repercusiones significativas en el número celular en comparación con las células no tratadas. Estos resultados demuestran que no hay variación en la tasa de proliferación con respecto al grupo control sin suero, y debido a esto se decidió

medir los niveles de expresión de moléculas proinflamatorias y profibrosantes en este modelo.

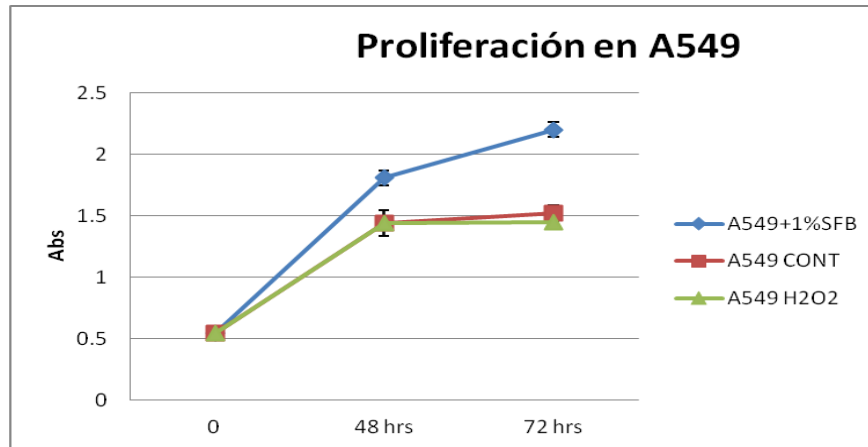


Figura 7. Ensayo de proliferación en el protocolo de inducción de senescencia en las células epiteliales A549. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio. Se agregó un grupo control con medio suplementado con 1% de SFB. (T-Student, n=4).

Efecto de la senescencia sobre la expresión de diversos mediadores proinflamatorios y profibrosantes

Se analizó la expresión de PDGF-A, PDGF-B, el Factor de Crecimiento Transformante tipo $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), Osteopontina y la Metaloproteinasas de Matriz 7 (MMP-7) en las células epiteliales senescentes y control, las cuales han sido encontradas expresadas in vivo por las células epiteliales de pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. Sin embargo, como se observa en la **figura 8**, no hubo diferencias en la expresión de estos genes en nuestro modelo. Por este motivo se analizaron otras moléculas implicadas en metabolismo y regulación del microambiente.

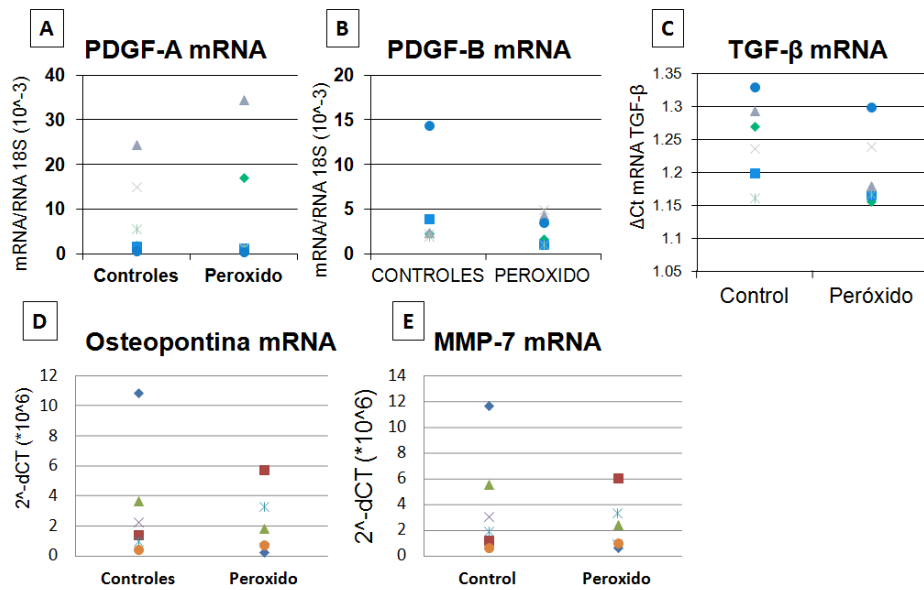


Figura 8. Análisis de la expresión del mRNA de moléculas mediadoras profibrosantes de células epiteliales controles y estimuladas con peróxido de hidrógeno. **Panel A:** expresión del mRNA de PDGF-A. **Panel B:** expresión del mRNA de PDGF-B- **Panel C:** expresión del TGF-β. **Panel D:** expresión de la Osteopontina. **Panel E;** expresión de la MMP-7. Los niveles de expresión fueron ajustados contra el rRNA 18s (T-Student, n=6).

Efecto de la senescencia sobre la actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9

Se examinó por zimografía la actividad de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 en los medios condicionados de las células A549 y se observó que la actividad de ambas enzimas en su forma latente (proMMP-2 y proMMP-9) está aumentada en las células epiteliales senescentes (**Figura 9**).

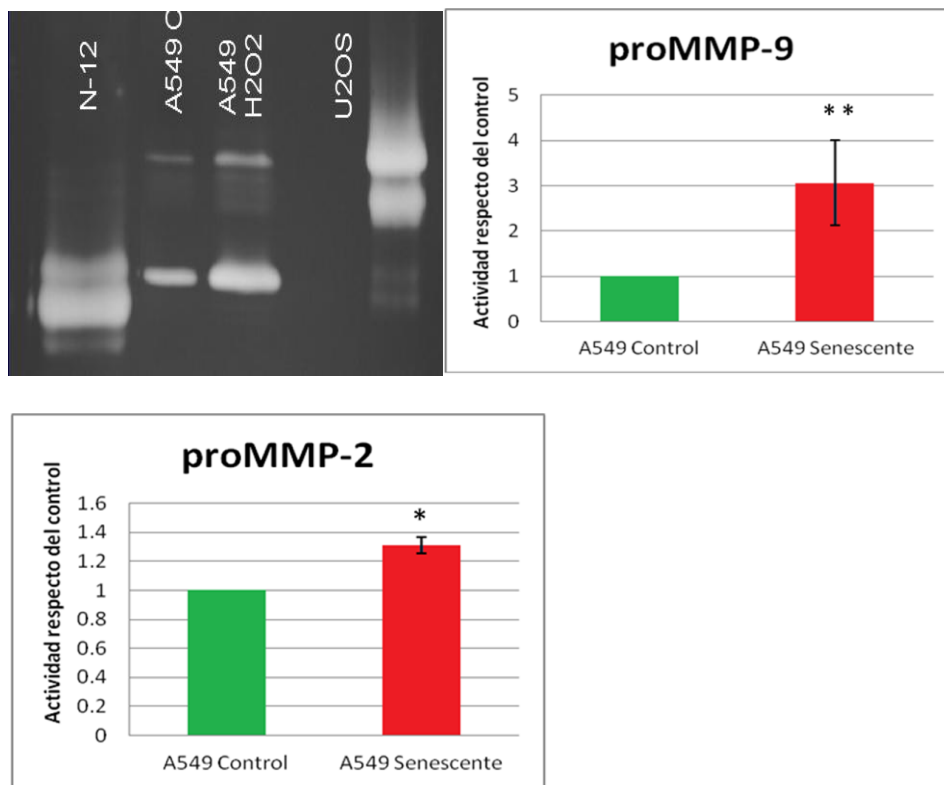


Figura 9. Actividad gelatinolítica en medios condicionados de células A549 normales y senescentes evaluada por zimografía. Se observa un aumento significativo de las enzimas en su forma latente en las células senescentes. Las gráficas representan el análisis densitométrico de tres experimentos independientes (n=3, *p<0.01, **p=0.01).

Para este ensayo se utilizó un microgramo de proteína de los medios condicionados. El medio condicionado de fibroblastos pulmonares humanos normales (n-12) se utilizó como control para la actividad de la MMP-2, y medio condicionado de la línea U2OS proveniente de osteosarcoma se usó como control para la actividad de la MMP-9. Posteriormente se evaluó si se desarrollaba el proceso de transición epitelio-mesénquima en las células tratadas con el peróxido de hidrógeno.

Efecto de la senescencia sobre la expresión de E-Cadherina

Se exploró si la inducción de senescencia en el modelo establecido previamente podía acompañarse del proceso de transición epitelio-mesénquima. Para esto se midió la expresión de E-Cadherina a los cuatro días posteriores al estímulo con el peróxido de hidrógeno. Como se observa en la **figura 10**, no se encontraron diferencias entre los cultivos normales y los senescentes para dicha proteína. Posteriormente se examinó si el medio condicionado de las células epiteliales tenía algún efecto sobre fibroblastos pulmonares.

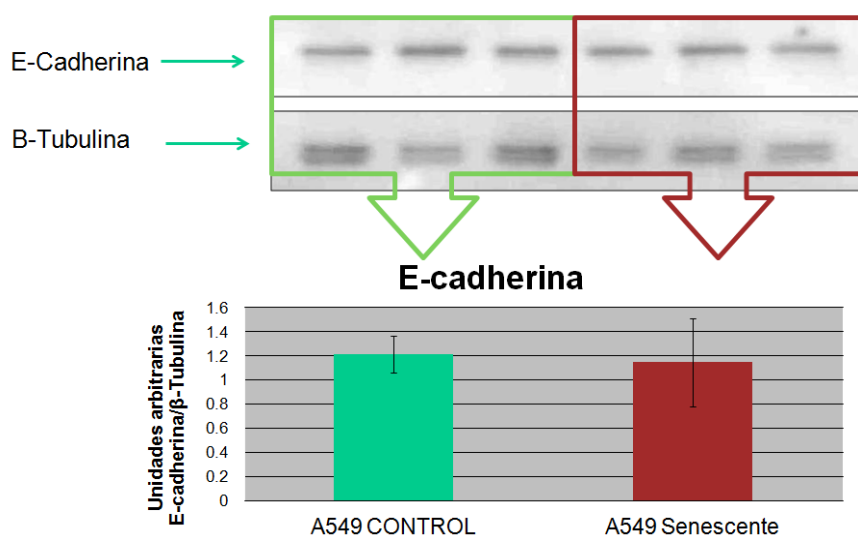


Figura 10. Análisis de la expresión de E-Cadherina por Western Blot de células epiteliales A549 normales y senescentes. No se encontró diferencias entre los grupos de estudio. La gráfica representa el análisis densitométrico del Western blot (T-Student, n=3).

Efecto de las células epiteliales senescentes sobre la activación de fibroblastos pulmonares

Se examinó el efecto de los medios condicionados de las células epiteliales control y senescentes sobre la proliferación y síntesis de colágena en fibroblastos pulmonares humanos.

El esquema del diseño para proliferación se muestra en la **figura 11**. Este ensayo se realizó en tres líneas diferentes de cultivos de fibroblastos primarios.

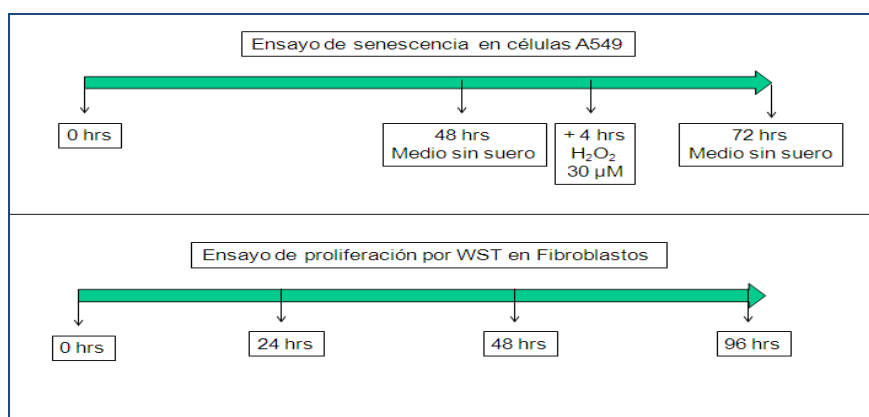


Figura 11. Se estimularon fibroblastos con los medios condicionados de las células epiteliales senescentes y control. Se agregó un grupo control de fibroblastos sin estímulo. Todos los ensayos se realizaron con medio de cultivo suplementado con SFB al 1%. Se utilizó el medio condicionado de células A549 control y senescentes bajo las condiciones estandarizadas previamente.

Los resultados de estos experimentos de proliferación indican que el medio condicionado de las células epiteliales senescentes no tiene un efecto diferencial sobre la proliferación celular, ya que los

fibroblastos tratados tanto con el medio de células normales como senescentes no presentaron variación en su cinética (**Figura 12**).

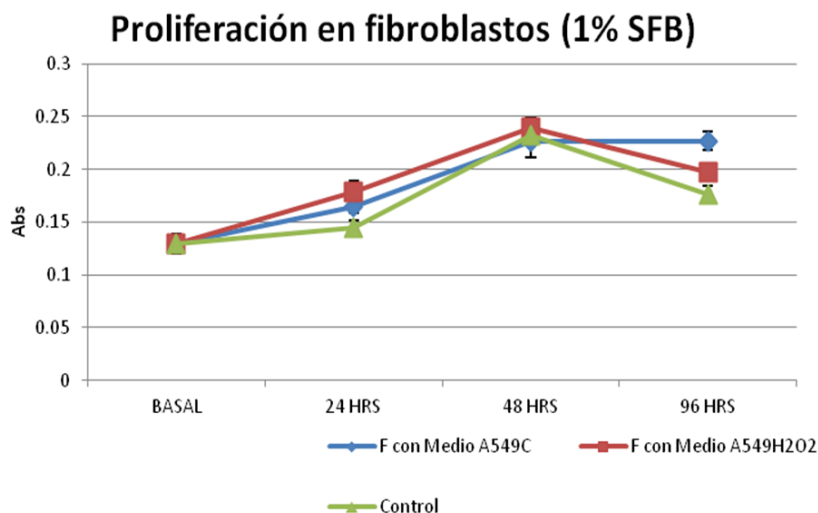


Figura 12. Ensayo de proliferación en fibroblastos pulmonares humanos normales (pasaje 11) estimulados con el medio condicionado de células epiteliales, realizado por la conversión de la sal WST-1. Los puntos en la gráfica muestran el promedio de cuatro pozos independientes (T-Student, n=4).

Posteriormente se analizó el efecto de los medios condicionados de células epiteliales control y senescentes sobre la producción de colágena en fibroblastos pulmonares normales. Como se puede apreciar en las **Figuras 13 y 14**, los medios condicionados obtenidos de las células senescentes indujeron un aumento significativo de la producción de colágena evaluada a través del ensayo de sircol. El experimento piloto se realizó con 100% de medio condicionado (**Figura 13**) y posteriormente se repitió, incluyendo fibroblastos control, con 50% y 100% de medio condicionado observándose un resultado similar, aunque más

potente con el 100%. Con esta concentración de medio condicionado, las células epiteliales normales también causaron un incremento en la producción de colágena, aunque significativamente menor (**Figura 14**).

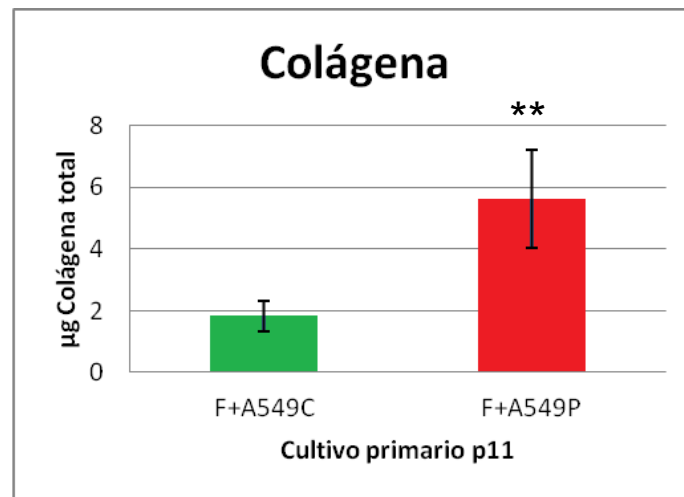


Figura 13. Cuantificación de colágena en un cultivo primario de fibroblastos humanos estimulados por 72 horas con 100% de medio condicionado de las células epiteliales. (T-Student. **p=0.05, n=3).

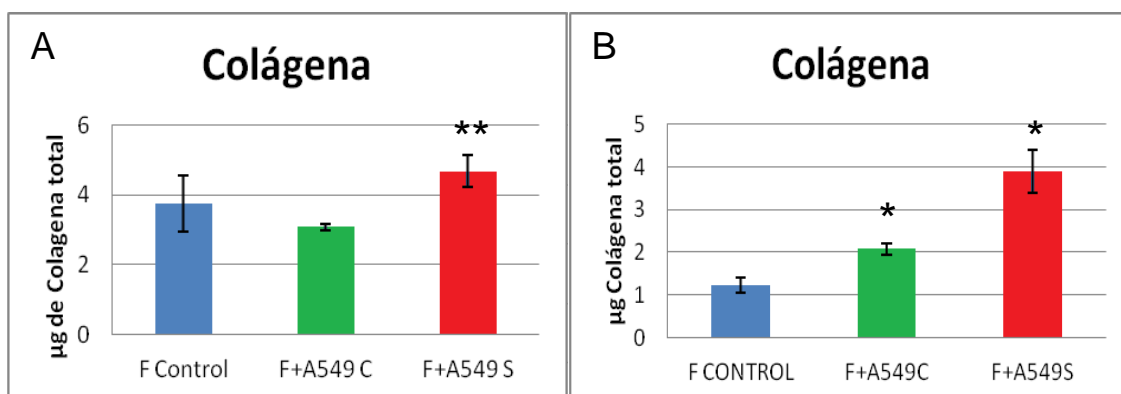


Figura 14. Cuantificación de colágena en fibroblastos pulmonares humanos. **Panel A:** estimulación por 72 horas realizada con 50% del medio condicionado de las células epiteliales y 50% de medio fresco. **Panel B:** estimulación realizada por 48 horas con el 100% del medio condicionado de las células epiteliales. (T-Student. *p=0.01, **p=0.05, n=3).

Adicionalmente examinamos la expresión de la cadena alfa 1 de la colágena tipo I por PCR en tiempo real. Los resultados mostraron una diferencia significativa entre los fibroblastos CCD25 sin estímulo y los estimulados con los medios condicionados de las células A549 senescentes y controles (**Figura 15**). Además, se observó una diferencia significativa entre los fibroblastos estimulados con medio de células A549 normales y senescentes, siendo los estimulados con el medio de las células senescentes los que tiene una expresión mayor de este gen, lo que corrobora los resultados obtenidos a nivel de proteína.

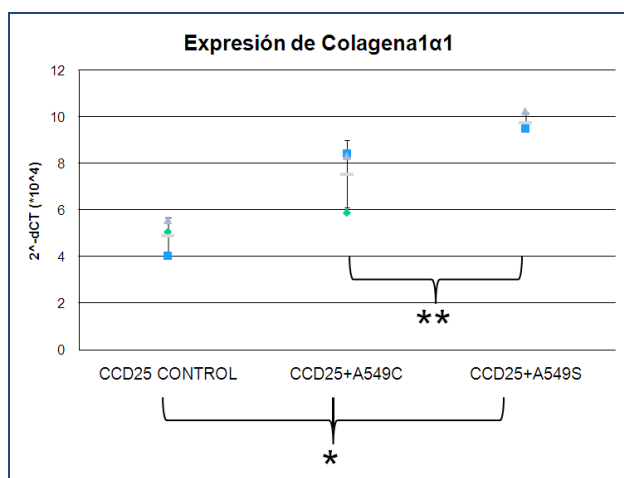


Figura 15. Análisis por qPCR de la cadena alfa1 de la colágena tipo I en fibroblastos de la línea CCD25 estimulados con medio fresco (primer grupo), con medio condicionado de células A549 normales (segundo grupo) y de A549 senescentes (tercer grupo). Los últimos con 50% del medio condicionado de las células epiteliales., (T-Student, *p=0.01, **p=0.05, n=3).

Además en este ensayo se analizó la expresión de PTEN (Homólogo de Fosfatasa y Tensina por sus siglas en inglés), encontrando un incremento significativo en su expresión de mRNA cuando los fibroblastos se estimularon con medio condicionado de células epiteliales senescentes (**Figura 16**). Se ha observado que la sobreexpresión de esta molécula interfiere con la transición de fibroblasto a miofibroblasto.

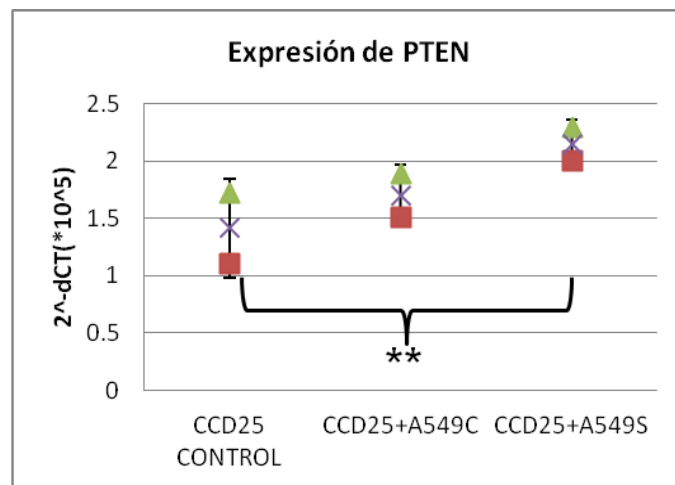


Figura 16. Expresión de PTEN por qPCR de fibroblastos estimulados con el 50% del medio condicionado de las células epiteliales.

Finalmente se analizó si el estímulo de fibroblastos con los medios condicionados de células epiteliales modificaba la expresión de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP-1, -2, -3, -4) que son importantes en la fibrogénesis tisular, sin encontrar diferencias entre los grupos de estudio (**Figura 17**). Tampoco se observaron diferencias en la expresión de α -actina de músculo liso (α -SMA) y de la MMP-1.

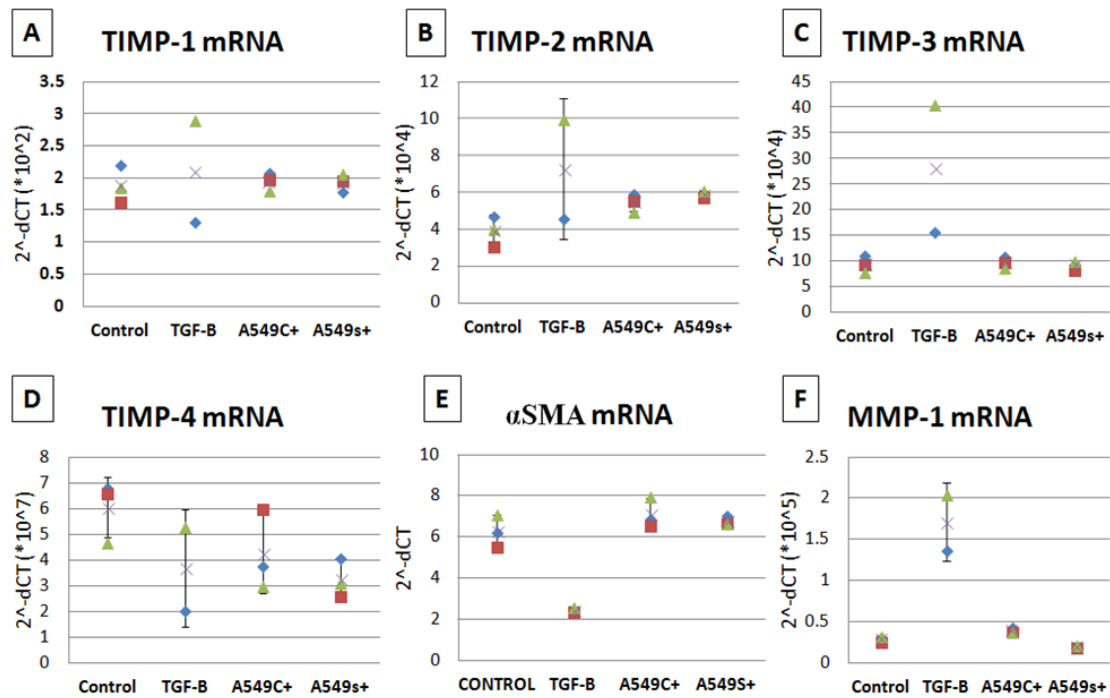


Figura 17. Análisis de la expresión los inhibidores tisulares de las MMPs, de la α -actina de musculo liso y de la MMP-1. **Panel A:** expresión del TIMP-1. **Panel B:** expresión del TIMP-2. **Panel C:** expresión del TIMP-3. **Panel D:** expresión del TIMP-4. **Panel E:** expresión de la α -actina de musculo liso. **Panel F:** expresión de la MMP-1. Los niveles de expresión fueron ajustados contra el rRNA 18s, excepto la α -SMA que fue ajustada contra el mRNA de la Hipoxantina-guanin fosforibosiltransferasa (HPRT).

Discusión.

La senescencia es un proceso celular seleccionado por la evolución para evitar la proliferación desmedida de células malignas, sin embargo, este proceso se ha encontrado presente en patologías distintas al desarrollo de tumores. Las enfermedades en las que se ha encontrado la presencia de senescencia celular, muchas de ellas relacionadas con la edad, son de etiologías distintas y afectan a una gran cantidad de tejidos. Entre otras se encuentran algunas enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2, neurodegenerativas como el Parkinson o Alzheimer, o en enfermedades fibrosantes como la fibrosis hepática o la FPI (12). Sin embargo, en esta variedad de enfermedades, y de linajes celulares afectados ha sido difícil establecer cuál es el papel que desempeña la senescencia en cada uno de ellos, y si es perjudicial o benéfica la presencia de ella para la resolución de la enfermedad.

En dos enfermedades semejantes, como lo son la fibrosis hepática y la fibrosis pulmonar, en las que la activación de los fibroblastos y el depósito exagerado de matriz extracelular son claves en el desarrollo de la enfermedad, la presencia de la senescencia se encuentra en linajes celulares completamente diferentes. Así, en la cirrosis hepática, la senescencia se localiza en las células estelares de la periferia de los focos de fibrosis, mientras que en la fibrosis pulmonar idiopática se localiza en las células del epitelio alveolar (13, 23). Asimismo, se ha sugerido que en la cirrosis, las células estelares senescentes ayudan a contener el desarrollo de la patología, esto por que limitan la

proliferación de las demás células estelares (23). Sin embargo, en la FPI, se considera que la amplia distribución de la senescencia tiene relación con el desarrollo de la patología ya que afecta a las células epiteliales, las cuales son responsables de la secreción de la mayoría de los mediadores profibrosantes (13). De entre las moléculas que favorecen el desarrollo de procesos fibróticos, se encuentra el TGF- β , el cual se ha demostrado que aumenta la producción de colágena en fibroblastos, además de favorecer la diferenciación de fibrocitos y fibroblastos a miofibroblastos (15, 24). Otra de las moléculas ampliamente relacionadas con este proceso fibrótico es el PDGF-B, el cual tiene como una de sus funciones características el servir como quimioatrayente para fibroblastos y fibrocitos (25, 26).

El desarrollo de la senescencia en las células epiteliales puede deberse a múltiples factores, incluyendo una alta tasa de proliferación como se ha descrito previamente causando un acortamiento anormal de telómeros (21, 27). En este contexto, varios estudios recientes han demostrado que algunos pacientes con FPI familiar tienen mutaciones de la enzima telomerasa con acortamiento importante de telómeros (28). De manera importante, también se reportó que los pacientes con FPI esporádica sin mutaciones en la telomerasa también presentan un acortamiento anormal de telómeros, incluyendo en las células del epitelio alveolar (29). Las razones de por qué los pacientes con FPI, sin mutaciones de la telomerasa, presentan acortamiento de los telómeros se desconocen, pero puede deberse a la excesiva replicación celular, o a la exposición a humo de tabaco, el cual es un factor ambiental que se ha relacionado con este proceso.

Por ejemplo, se ha reportado que la senescencia de células epiteliales alveolares A549 provoca un aumento en la producción de moléculas pro-inflamatorias, como la IL-6 y la IL-8. De manera interesante, se ha sugerido que esto induce un fenotipo inhibitor de la telomerasa, y adicionalmente que la secreción de estas moléculas pro-inflamatorias está relacionada con el desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (30).

En este estudio se evaluó si la inducción de senescencia causaba la secreción de moléculas profibrosantes, pero ninguno de los mediadores biológicos seleccionados por haber sido reportados como secretados por el epitelio en la fibrosis pulmonar idiopática mostró diferencias con las células epiteliales control. Asimismo, la exposición de las células epiteliales a la concentración usada en este estudio no indujo transición epitelio-mesénquima ya que no modificó la expresión de E-cadherina. Sin embargo, el peróxido de hidrógeno que se utilizó como inductor de senescencia, además de ser un metabolito secundario se ha encontrado que es sobreproducido por fibroblastos obtenidos de pacientes con FPI (21), y tiene múltiples efectos sobre la célula, como la oxidación de moléculas electroafines, la oxidación de lípidos y daño al material genético (21), lo cual puede generar entre otras cosas la activación de los mecanismos de autofagia, y que por ello no se esté observando un aumento en la expresión de los mediadores profibrosantes.

Sin embargo se encontró un aumento importante en la expresión de la pro-MMP-2 y pro-MMP-9, dos enzimas que participan en la remodelación de

proteínas estructurales de la matriz extracelular, en particular de aquellas que forman parte de las membranas basales, así como en el procesamiento de diversas citocinas y quimiocinas (31, 32). Estas enzimas degradan la membrana basal del epitelio alveolar facilitando la invasión de fibroblastos a los espacios alveolares.

Posteriormente se examinó si el medio condicionado de las células epiteliales senescentes tenía un efecto sobre el comportamiento de los fibroblastos. Los resultados mostraron que las células epiteliales senescentes no influyen en la proliferación de fibroblastos. Sin embargo no se exploró si tenía algún efecto sobre la apoptosis. Se encontró que medio condicionado de las células senescentes inducen un incremento significativo de la síntesis de colágenas, incluyendo la colágena tipo I, que son los principales componentes de la matriz extracelular anormalmente remodelada durante el desarrollo de la fibrosis pulmonar.

En la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto se ha demostrado que hay un aumento en la resistencia a la apoptosis y un aumento en la producción de colágena (33). Contrario a lo que esperábamos, encontramos un aumento en la expresión de PTEN, el cual se ha reportado como un inhibidor de la diferenciación a miofibroblasto, por lo que el aumento de la expresión de colágena podría no estar relacionada con dicha diferenciación.

Conclusiones.

1. No se observaron diferencias en los niveles de expresión de PDGF-A, PDGF-B, TGF- β , Osteopontina y MMP-7 entre las células epiteliales control y senescentes.
2. Se encontró que la inducción de senescencia **aumenta significativamente la expresión de proMMP-2 y proMMP-9.**
3. El medio condicionado de las células senescentes no mostró efecto sobre la proliferación de los fibroblastos.
4. Este medio **provocó un aumento significativo en la síntesis de colágena.**
5. Asimismo, el medio de las células epiteliales senescentes **indujo la sobre-expresión de PTEN**, una molécula involucrada en la migración de fibroblastos y en la diferenciación a miofibroblastos.

Bibliografía.

1. Campisi, J. y D'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nature Rev Mol Cell Biol.** 2007. 8: 729-740.
2. Hayflick, L. y Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Cell Res.** 1961. 25: 585-621.
3. Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. **J. Clin. Invest.** 2004. 114: 1299-1307.
4. Ishikawa F. Cellular senescence, an unpopular yet trustworthy tumor suppressor mechanism. **Cancer Sci.** 2003. 94: 944-947.
5. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. **Cell.** 2005. 120: 513-522.
6. Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L., et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin dependent inflammatory network. **Cell.** 2008. 133: 1019-1031.
7. Coppé, J. P., Rodier, F., Patil, C. K., et al. Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence. **J. Biol. Chem.** 2011. 286: 36396-36403.
8. Rodier, F., Coppé, J. P., Patil, C. K., Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. **Nat. Cell Biol.** 2009. 11: 973-979.

9. Freund, A., Patil, C. K., Campisi, J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of de senescence-associated secretory phenotype. **EMBO J.** 2011. 30: 1536-1548.
10. Coppé, J. P., Desprez, P., Krtholika, A., Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppressor. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.** 2010. 5: 99-118.
11. Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic Ras and the p53 tummor suppressor. **PLoS Biol.** 2008. 6: 2853-2868.
12. Naylor, R. M., Baker, D. J. y van Deursen, J. M. Senescent cells: a novel therapeutic target for aging and aged-related diseases. **Clin. Pharmacol. Ther.** 2013. 93: 105-116.
13. Minagawa, S., Araya, J., Numata, T., et al. Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT-6 in TGF- β - induced senescence of human bronchial epithelial cells. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** 2011. 300: L391-L401.
14. Talmadge King Jr., Pardo, A., Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis. **The Lancet.** 2011. 378: 1949-1961.
15. Selman M., Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. **Respir Res.** 2002. 3: 3.
16. Selman, M., Pardo, A. Role of Epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. **Am Thorac Soc.** 2006. 3: 364-372.

17. Pardo, A., Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. **Int J Biochem Cell Biol.** 2002. 34: 1534-1538.
18. Pardo, A., Selman, M. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. **Front Biosci.** 2002. 7: d1743-d1761.
19. Selman M., Mejía, M., Pardo, A. Fibrosis pulmonar idiopática. **Rev Invest Clin.** 2009. 61: 233-242.
20. Pardo, A., Selman, M. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. **Am Thorac Soc.** 2006. 3: 383-388
21. Waghray, M., Cui, Z., Horowitz, J. C., et al. Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. **FASEB J.** 2005: 854-856.
22. Yoshizaki, K., Fujiki, T., Tsunematsu, T., et al. Pro-senescent effect of hydrogen peroxide on cancer cells and its possible application to tumor suppression. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 2009. 73: 311-315.
23. Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. **Cell.** 2008. 134: 657-667.
24. Hong, K. M., Belperio, J. A., Keane, M. P., et al. Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by Transforming Growth Factor- β and Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ . **J. Biol. Chem.** 2007. 282: 22910-22920.
25. S-J. O., Haymo K., Bodo C., et al. Platelet-derived growth factor-B induces transformation of fibrocytes into spindle-shaped myofibroblasts in vivo. **Histochem Cell Biol.** 1998. 109: 349-357.

26. Lozano, A., Mendoza, C., Cisneros, J., et al. Role of Sonic Hedgehog in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** 2012. 303: L978-L990.
27. Selman, M., Ruiz, V., Cabrera, S., et al. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment?. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 2000. 279: L562-L574.
28. Armanios, M. Y., Chen, J. J., Cogan, J. D., et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. **N Engl J Med.** 2007. 356: 1317-1326.
29. Alder, J. K., Chen, J. J., Lancaster, L., et al. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2008; 105:13051-13056.
30. Tsuji, T., Aoshiha, K. y Nagai, A. Alveolar cell senescence exacerbates pulmonary inflammation in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Respiration.** 2010. 80: 59-70.
31. Nagase, H. y Woessner, J. F. Matrix Metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 1999. 274: 21491-21494.
32. Pardo, A., Selman, M. Role of matrix metalloproteinases in pulmonary fibrosis. Matrix Metalloproteinases in tissue remodeling and inflammation. **Birkhäuser Verlag AC.** Germany. 2008. pp 39-55.
33. Withe E. Atrasz R. Hu b. Negative Regulation of Myofibroblast Differentiation by PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10). **Am J Respir Crit Care Med.** 2006. 173: 112-121.

Lista de abreviaturas.

°C- Grados Centigrados

Abs- Absorbancia

ATCC- American Type Cell Culture

ATS- Sociedad Americana de Tórax

cDNA- DNA complementario

CO₂-Dioxido de Carbono

DEPC- dietil-pirocarbonato

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

dNTP's- mix de Desoxirribonucleótidos

E2F- (Factor de transcripción)

EDTA- Ácido etilendiaminotetraacético

EPOC- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ERS- Sociedad Europea Respiratoria

FPI- Fibrosis Pulmonar Idiopática

IL- Interleucina

INER- Instituto Nacional de Enfermedades

Respiratorias

kD- Kilodalton

MEC- Matriz extracelular

MgCl₂- Cloruro de Magnesio

min- Minutos

ml- mililitro

mM- milimolar

MMP- Metaloproteinasas de matriz

n- Numero de muestras

ng- nanogramos

PCR- Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDGF- Factor de crecimiento derivado de plaquetas

pRB- Proteína de Retinoblastoma

PTEN- Homologo de fosfatasa y tensina

RNA- Ácido Ribonucleico

ROS- Especies Reactivas de Oxigeno

rpm- Revoluciones por Minuto

RT-PCR- Transcripción Reversa por PCR

SAFS- senescencia asociada a fenotipo secretor

SA- β -gal- Senescencia asociada a β -gal

seg- Segundos

SFB- Suero fetal bovino

TGF- β - Factor de crecimiento transformante tipo beta

TIMP- Inhibidor tisular de metaloproteinasas

WST- Sal de tetrazolio

α -SMA- α Actina de músculo liso

β -gal- β -galactosidasa

μ g- microgramos

μ l- microlitro

μ M- micromolar

Apéndice 1.

Sondas Taqman. Applied Biosystem:

GEN	No. Identificación	Fluorocromo
18S	Hs99999901_s1	FAM
Col1 α 1	Hs00164004_m1	FAM
PTEN	Hs02621230_s1	VIC
MMP-7	Hs01042796_m1	FAM
TIMP-3	Hs00165949_m1	FAM
TGF- β 1	Hs00998133_m1	FAM
PDGF-A	Hs00964426_m1	FAM
Osteopontina	Hs00959010_m1	VIC
TIMP-1	Hs00171558_m1	FAM
TIMP-4	Hs00162784_m1	FAM
α -SMA	Hs00909449_m1	FAM
PDGF-B	Hs00966522_m1	FAM
MMP-1	Hs00899658_m1	FAM
TIMP-2	Hs00234278_m1	FAM

Apéndice 2.

Anticuerpos.

Proteína	Casa Comercial	No. Catalogo	Tipo
β -Tubulina	Sta. Cruz	SC-9104	Conejo Policlonal
E-Cadherina	Sta. Cruz	SC-7870	Conejo Policlonal
P21	Millipore	MAB88058	Ratón Monoclonal