



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

TÍTULO DEL PROYECTO

**“EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE THY-1 EN FIBROBLASTOS PULMONARES
HUMANOS EN SU COMUNICACIÓN CON LAS CÉLULAS EPITELIALES
ALVEOLARES”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARÍA DEL JAZMÍN CALYECA GÓMEZ

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Annie Pardo Cemo
Facultad de Ciencias**

**COMITÉ TUTOR: Dra. Marina Macías Silva
Instituto de Fisiología Celular
Dra. Vilma Maldonado Lagunas
Facultad de Medicina**

MÉXICO, D.F. Octubre, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

TÍTULO DEL PROYECTO

**“EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE THY-1 EN FIBROBLASTOS PULMONARES
HUMANOS EN SU COMUNICACIÓN CON LAS CÉLULAS EPITELIALES
ALVEOLARES”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARÍA DEL JAZMÍN CALYECA GÓMEZ

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Annie Pardo Cemo
Facultad de Ciencias**

**COMITÉ TUTOR: Dra. Marina Macías Silva
Instituto de Fisiología Celular
Dra. Vilma Maldonado Lagunas
Facultad de Medicina**

MÉXICO, D.F. Octubre, 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/527/13

ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **9 de septiembre de 2013** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del (la) alumno (a) **CALYECA GÓMEZ MARÍA DEL JAZMÍN** con número de cuenta **303271505** con la tesis titulada **“Efecto de la expresión de Thy-1 en fibroblastos pulmonares humanos en su comunicación con las células epiteliales alveolares”**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. ANNIE PARDO CEMO:**

Presidente: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
Vocal: DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ
Secretario: DR. GUSTAVO RAMÍREZ MARTÍNEZ
Suplente: DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ
Suplente: DRA. MARINA MACÍAS SILVA

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

Atentamente

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 2 de octubre de 2013

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/grf*



Agradecimientos

- ❖ Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
- ❖ A los apoyos recibidos por parte de CONACYT (Becario)
- ❖ A mi tutora la Dra. Annie Pardo y a los miembros de mi comité tutoral, La Dra. Vilma Maldonado y la Dra. Marina Macías por su apoyo y consejos durante toda esta parte de mi formación académica.

Agradecimientos a título personal

A mis padres, que me dieron la vida y continúan apoyándome incondicionalmente. A mi abuelita Gloria que me educó; a mis hermanos, que sé que no importa donde estén, siguen a mi lado, y a toda mi familia.

Al amor de mi vida, que día a día me da un motivo para seguir esforzándome, me escucha y me soporta aún en días difíciles.

A la Dra. Annie que además de su apoyo académico, me ha brindado un gran apoyo moral; y es una fuente de admiración.

Al Dr. Gustavo Ramírez por todos sus consejos y su apoyo.

A todos mis compañeros del laboratorio de Bioquímica, en especial a la M. en C. Remedios por todos sus consejos y a David por su ayuda, aunque con regaños,

A mis amigos, Guillermo, Edgar y en especial a Jessica, que sin importar la distancia estamos siempre juntas.

Al maestro Yi, por mostrarme que cualquier cosa que desees debes hacerla sin importar que tan difícil se muestre el camino.

A mi Universidad que me dio la oportunidad de llegar hasta donde estoy.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
Matriz Extracelular del pulmón.....	5
Fibrosis Pulmonar.....	5
Fibrosis Pulmonar Idiopática.....	6
Neumonitis por Hipersensibilidad.....	7
Fibroblastos: diferentes subpoblaciones.....	8
Participación de los fibroblastos en la fibrosis pulmonar.....	10
Thy-1 en fibrosis.....	11
Interacción epitelio/mesénquima.....	11
OBJETIVOS.....	13
GENERAL.....	13
ESPECIFICOS.....	13
ANTECEDENTES.....	14
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIÓN.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31
ÁPENDICE I : ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación morfológica de fibroblastos Thy-1 positivos y negativos.....	19
Figura 2. Expresión de Thy-1 en fibroblastos pulmonares humanos.....	20
Figura 3. Expresión de colágena en fibroblastos pulmonares Thy-1 positivos y negativos.....	22
Figura 4. Expresión de Thy-1 en fibroblastos de pulmón derivados de ratones silvestres y de ratones deficientes de la MMP-19.....	23
Figura 5. Análisis de la expresión de MMP-2 y MMP-9 inducidas por TGF- β en fibroblastos pulmonares Thy-1 positivos y negativos.....	24
Figura 6. Expresión de MMP-1 en fibroblastos Thy-1 positivos y negativos inducidos con PMA o TGF- β	24
Figura 7. Expresión de MMP-7 mediada por TGF- β en fibroblastos Thy-1 positivos y negativos.....	25
Figura 8. Análisis de la producción de α -actina de músculo liso en fibroblastos Thy-1 positivos y negativos.....	26
Figura 9. Expresión de PPARgamma en fibroblastos Thy-1 positivos y negativos.....	26
Figura 10. Análisis de la expresión de MMP-1, MMP-2 y MMP-7 en células epiteliales alveolares A549 a las 12, 24 y 48 horas de cocultivo con fibroblastos Thy-1 positivos o negativos.....	27

RESUMEN

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad progresiva, irreversible y letal en la cual la mitad de los pacientes mueren dos a tres años después del diagnóstico. Se ha reportado, que los fibroblastos provenientes de pulmones con fibrosis pulmonar idiopática difieren de los fibroblastos de pulmón normal en su capacidad proliferativa y de supervivencia, y en la expresión de marcadores de superficie, incluyendo la glicoproteína Thy-1. La ausencia en la expresión de Thy-1 en los focos de fibroblastos del pulmón de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática ha sido asociada con el desarrollo de un fenotipo profibrosante.

En nuestro laboratorio contamos con una línea celular Thy-1 negativa que se immortalizó para evitar su pérdida. Entonces, el principal objetivo de este trabajo fue caracterizar a la línea de fibroblastos Thy-1 negativos immortalizada comparándola con la línea nativa.

Se analizó la expresión de Thy-1 por reacciones en cadena de la polimerasa y por citometría de flujo, la síntesis de colágena mediante una técnica colorimétrica, la expresión de las metaloproteasas 1, -2, -7 y -9 y la síntesis del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas gamma en la línea immortalizada y la nativa.

Nuestros resultados muestran que el proceso de immortalización no modificó las características de la línea nativa de fibroblastos Thy-1 negativa, nos permitió utilizar la línea immortalizada para los experimentos de co-cultivo con células epiteliales planteados originalmente en este trabajo.

Los resultados preliminares muestran que el tiempo óptimo de co-cultivo, son las 12 horas, en base a la expresión de metaloproteasas-1, -2 y -7.

ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis is a progressive, irreversible and usually lethal lung disease of unknown etiology in which two or three years after diagnosis half of the patients are dead. It has been reported that pulmonary fibroblasts from Idiopathic pulmonary fibrosis present different characteristics from normal lung fibroblasts including proliferation and survival and expression of some surface markers such as Thy-1 glycoprotein. Absence of the expression of Thy-1 in fibroblastic foci has been related with fibrotic phenotype development.

In our laboratory, we have obtained a Thy-1 negative fibroblast cell line, these fibroblasts were immortalized. In this context, the aim of this work was to characterize the immortalized Thy-1 cells and compare them with the original cell line.

Thy-1 was analyzed by polymerase chain reaction and cell cytometry, collagen synthesis by sircol colometer, matrix metalloproteinases -1, -2, -7 and -9 by quantitative polymerase chain reaction and peroxisome proliferative-activated receptor gamma synthesis.

Our results showed that immortalized and the parental cell line behaves similarly and presented some differences when compared to Thy positive cells. In summary, I found that the immortalization process does not affect the parental phenotype in the immortalized Thy-1 negative lung fibroblasts, we propose that the immortalized line will be used in co-culture with epithelial cells, the original experiment proposes for this work.

Our preliminary results show that cocultive best time is 12 hours based in matrixmetalloproteinases-1, -2 and -7 expression by epithelial cells.

INTRODUCCIÓN

Matriz extracelular.

La matriz extracelular (MEC) es un complejo supra-molecular altamente organizado y dinámico que está en constante remodelación. El arreglo de cada una de las moléculas que la forman y la interacción con los diferentes tipos celulares determinan la estructura, la información celular y el tipo de andamio que presentan los tejidos. La MEC además de participar en varios procesos celulares, provee principalmente, un ambiente biomecánico, en donde se lleva a cabo la comunicación e interacción a nivel celular o tisular, estableciendo la estructura y función de cada tejido. Las principales moléculas estructurales que la integran son las colágenas, glucosaminoglucanos y glucoproteínas no colagénicas (1). Las colágenas representan una familia de proteínas triméricas de cadenas α , que forman una triple hélice compuesta de tripletes peptídicos repetidos de glicina-X-Y- donde X-Y pueden ser cualquier aminoácido, pero frecuentemente los sitios X están ocupados por prolina y los Y por hidroxiprolina, un iminoácido casi exclusivo de las colágenas (2). Los proteoglicanos son moléculas cargadas, formadas por una proteína unida covalentemente a una o más cadenas de glucosaminoglucanos, clasificadas en tres familias que incluyen, a los proteoglicanos de agregados de condroitín sulfato o lecticanos, los proteoglicanos de condroitín sulfato ricos en leucina y los proteoglicanos unidos a heparán sulfato (3).

En el pulmón, los proteoglicanos de la MEC brindan un soporte estructural y propiedades biomecánicas y recientemente se ha demostrado que están involucrados en la homeostasis, reparación y desarrollo de este órgano por lo que desempeñan un papel muy importante en condiciones normales, así como en el desarrollo de diferentes patologías (3). Los GAG, por ejemplo, atraen cationes como el Na^+ , lo que permite formar una presión osmótica que al llenar el tejido de agua le brinda una capacidad de resistencia ante fuerzas de compresión. La elasticidad y la estabilidad alveolar se dan por

la interacción de los proteoglicanos con otras moléculas de la MEC, como colágenas, laminina y elastina; formando matrices estructuradas (4).

La lámina basal del epitelio alveolar, es una estructura compleja que contiene colágena tipo IV, laminina, fibronectina y proteoglicanos como el ácido hialurónico, tiene una participación dinámica en el mantenimiento de la integridad y diferenciación del epitelio alveolar; así como en la migración, diferenciación y adhesión de fibroblastos. Algunos de los compuestos esenciales en la lámina basal como fibronectina y laminina, los sintetizan los neumocitos tipo II. En la fibrosis pulmonar, los daños al epitelio alveolar producen alteraciones en la síntesis de los componentes de la lámina basal, resultando en la pérdida de la integridad de la misma (5).

Por otro lado, en el espacio intersticial se encuentran los condroitín sulfatos interactuando con el ácido hialurónico, permitiendo que los proteoglicanos se fijen en el tejido al formar agregados de alto peso molecular (1,5). Sin embargo, la colágena es la proteína fibrilar más abundante en el espacio intersticial, participa en la regulación de distintos procesos celulares como proliferación, migración y quimiotaxis; y regula la adhesión celular y la fuerza de tensión. Esta proteína es secretada por fibroblastos tanto residentes como reclutados de tejidos vecinos (5). En la fibrosis pulmonar, las colágenas tipo I y III, son las proteínas más abundantes en el tejido.

Además de las colágenas existen otras proteínas fibrilares que están muy expresadas en el tejido fibrótico, por ejemplo, la fibronectina; esta proteína además de organizar la MEC en el espacio intersticial, participa en la adhesión celular (3).

En conjunto, la alteración aberrante de los estados mecánicos y organización de la MEC, modifican la función y la organización del epitelio, promoviendo potencialmente enfermedades relacionadas con la edad como lo es la fibrosis (6).

Fibrosis Pulmonar

La fibrosis pulmonar es el resultado final que tienen en común un grupo de enfermedades pulmonares intersticiales. Este conjunto abarca varios tipos de daño pulmonar que van desde la inhalación de polvo, partículas orgánicas (neumonitis por hipersensibilidad o NH) e inorgánicas (asbestosis), el uso de radiación y de algunos medicamentos quimioterapéuticos, como la bleomicina, o bien asociada a enfermedades colágeno vasculares como la esclerosis sistémica (ES) y la artritis reumatoide (AR) hasta las enfermedades pulmonares intersticiales de la infancia. Por otro lado, alrededor del 50% de los desórdenes pulmonares intersticiales (ILD por sus siglas en inglés) son de etiología desconocida y son clasificados como neumonías intersticiales idiopáticas. De este grupo, la entidad más agresiva es la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) (6).

Se ha propuesto que existen dos vías para el desarrollo de la fibrosis pulmonar; la vía inflamatoria como es el caso de la neumonitis por hipersensibilidad (NH), y la otra es una vía epitelio-mesénquima, representada por la FPI (6).

Neumonitis por Hipersensibilidad

La neumonitis por hipersensibilidad también conocida como alveolitis alérgica extrínseca, es una enfermedad que se desarrolla por la inhalación repetida de hongos, bacterias, partículas orgánicas o de algunos componentes químicos y afecta a bronquiolos, alvéolos y al espacio intersticial. La respuesta inflamatoria está mediada principalmente por una reacción inmune exagerada que parece ocurrir en un huésped susceptible; dentro de los antígenos más comunes de esta patología se encuentran las proteínas de aves y bacterias termofílicas. Entre las manifestaciones clínicas que pueden o no presentarse se encuentra la pérdida de peso, mialgias y fiebre (17-18). Su etiología no es bien conocida; sin embargo, se sugiere que un vasto grupo de subpoblaciones de linfocitos T participan en el desarrollo y curso clínico de la enfermedad (19-20). Asimismo, existen evidencias clínicas en las que las citocinas tipo Th1 también contribuyen con la patogénesis de la NH (20).

En México se ha relacionado a la exposición de antígenos aviarios como la fuente más frecuente de NH, en especial provenientes de pichones, palomas, canarios y pericos australianos. En general, se sugiere que la Inmunoglobulina A (IgA), así como la mucina intestinal podrían ser las principales proteínas sensibilizadoras.

En la NH, existen tres tipos de manifestaciones clínicas que incluyen:

1. Fase aguda: en la existen una respuesta inflamatoria de macrófagos y células linfáticas en la zona activa de la enfermedad,
2. Fase subaguda: donde comienza la formación y desarrollo de granulomas,
3. Fase Crónica: en la que el daño al parénquima pulmonar es irreversible y se desarrolla la fibrosis pulmonar.

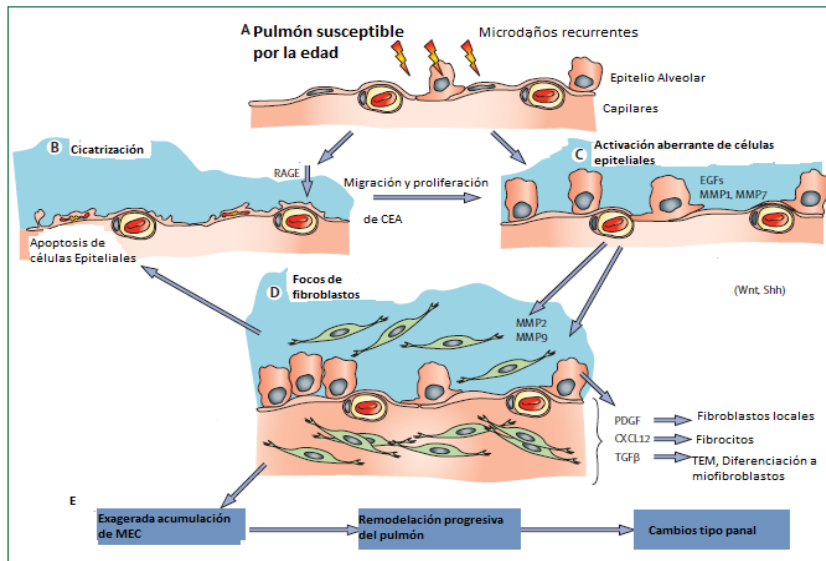
En los pacientes con NH que se encuentran en la fase crónica o presentan episodios repetidos de la fase subaguda, el 30-40% evolucionan hacia una fibrosis intersticial difusa (21). Recientemente, se han descrito tres patrones de fibrosis presentes en la NH:

1. Fibrosis periférica: presenta parches con distorsión de la arquitectura pulmonar, formación de focos de fibroblastos parecidos macroscópicamente a la neumonía intersticial usual.
2. Fibrosis intersticial homogénea
3. Fibrosis peribronquiolar.

Los mecanismos moleculares asociados a este proceso no han sido completamente esclarecidos. Se sabe, que esta vía involucra la pérdida de la resolución de la alveolitis linfática y de la regeneración tisular; se presenta una remodelación anormal de la MEC y un progreso hacia fibrosis (22).

Fibrosis Pulmonar Idiopática

La FPI es una enfermedad progresiva, irreversible y letal en la cual la mitad de los pacientes mueren dos a tres años después del diagnóstico (7). Este padecimiento afecta predominantemente a individuos de entre 50 y 70 años, y su frecuencia aumenta con la edad, sin embargo, se desconoce el proceso que la relacione con el envejecimiento y los mecanismos patogénicos no se conocen con precisión (8,9). Aunque se sabe que existe participación de células monoclonales del sistema inmune, tanto innato, como adaptativo, en regiones activas de la enfermedad, donde las células epiteliales que se están regenerando propagan algunas zonas de inflamación por medio de citocinas como la IL-17 (10), en los últimos 10 años se ha fortalecido la hipótesis de que la FPI representa un proceso fibrótico, independiente de la inflamación, caracterizado por una comunicación anormal entre células epiteliales y células mesénquimales (8, 9, 11-14). (Esquema 1).

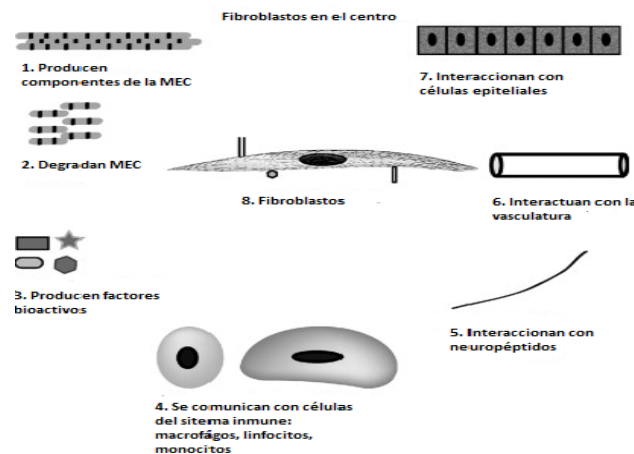


Esquema 1 Modelo de los procesos moleculares en Fibrosis Pulmonar Idiopática. El modelo fue propuesto por Selman *et al.*(14).

Existe una gran evidencia que sugiere que las células epiteliales son un factor crítico en la iniciación y progresión de la enfermedad. Se ha propuesto que los epitelios alveolar y bronquiolar estimulados, secretan aberrantemente las citocinas y factores de crecimiento responsables de la migración y proliferación de fibroblastos residentes (como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF por sus siglas en inglés), así como de progenitores circulantes (por ejemplo fibrocitos) a través de quimio-atrayentes como CXCL12, y su transición a miofibroblastos inducida por el factor de crecimiento transformante-beta1 (TGF-β1) (9,14-15). Estas citocinas son consideradas profibrosantes, ya que estimulan la expresión de proteínas componentes de la matriz extracelular (MEC), principalmente colágena tipo I (16).

Fibroblastos:

Los fibroblastos son células de gran relevancia en los procesos fibrosantes, ya que sintetizan de forma activa, proteínas de la MEC, principalmente colágenas fibrilares. La capacidad de producir y organizar a la MEC, y de comunicarse con otros tipos celulares, los convierte en un componente central en la biología de los tejidos (Esquema 2) (23). Los fibroblastos se encuentran ampliamente distribuidos entre los diferentes tejidos y se originan en el mesodermo mesénquima durante el desarrollo embrionario. Son los principales productores de componentes de la MEC como, diferentes tipos de colágena, fibronectina y proteoglicanos, además de metaloproteasas de matriz (MMP's) (24-25). Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de Zinc, y que como su nombre lo indica, tienen la capacidad en forma colectiva de degradar a todos los componentes de la MEC. Además de estar involucradas en distintos procesos celulares esenciales como la proliferación, migración, diferenciación y adhesión. Un ejemplo; es el equilibrio entre la producción y la degradación de los distintos componentes de la MEC; factor importante para mantener la homeostasis de los tejidos en condiciones normales o en la aparición de patologías (26-28).

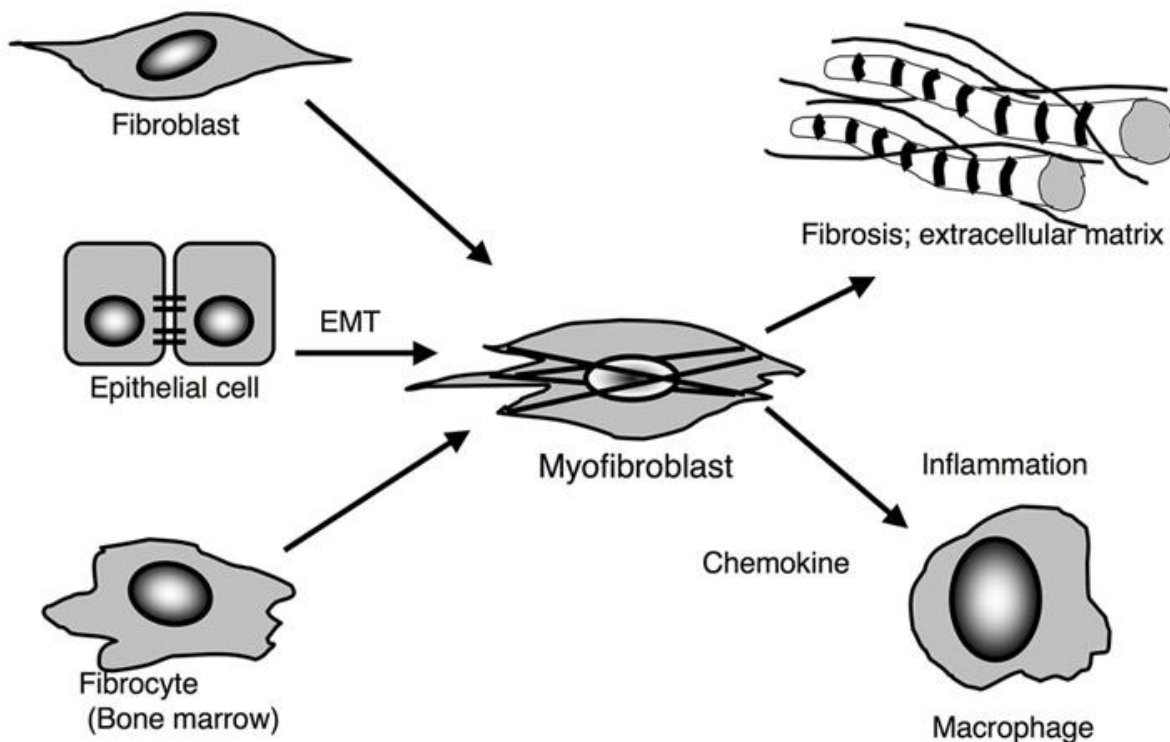


Esquema 2. Participación de los fibroblastos en la biología de tejidos. Esquema tomado de Sorrell *et. al.* (23).

En un principio se creía que los fibroblastos eran una población uniforme con características y funciones comparables independientemente del tejido del que provinieran (29). Sin embargo, en la actualidad muchos estudios fundamentan el concepto de la especificidad de los fibroblastos dependiente del tejido de origen, donde cada subpoblación está conferida por funciones únicas basadas en una gran variedad de características fenotípicas (30).

En la piel, existen al menos tres tipos de fibroblastos en la etapa adulta, cada uno ocupando un nicho distinto dentro de la dermis. Se ha demostrado, que existen diferencias específicas en la fisiología de los fibroblastos que son evidentes entre los fibroblastos que residen en la superficie de la dermis y entre los fibroblastos reticulares de la parte profunda de la dermis (29).

Los miofibroblastos son células mesénquimales que presentan características de fibroblastos y de células de músculo liso, su fenotipo se asocia con la producción de componentes de la MEC y con el proceso de cicatrización tanto en condiciones normales como en la fibrosis (Esquema 3)(23). En condiciones normales, después de la cicatrización, los miofibroblastos sufren apoptosis y desaparecen de la zona dañada; sin embargo, en el desarrollo de fibrosis, estas células presentan un estado quiescente alterno que les permite su persistencia en esta área (32). Durante el desarrollo embrionario del pulmón, la aparición de estas células coincide con la deposición de fibronectina, elastina y laminina. En la fibrosis pulmonar, el resultado de la acumulación de MEC en términos de la composición y cantidad de los componentes se ha asociado a múltiples factores, que incluyen el tiempo de daño así como, el efecto de citocinas y factores de crecimiento (25). En la FPI, se considera a los miofibroblastos como la principal fuente de producción de colágeno tipo I (33).



Esquema 3. Origen de fibroblastos. Esquema tomado de Shizuya *et. al.* 2009.

Otro tipo celular derivado de médula ósea pero con características mesénquimales son los fibrocitos. Los fibrocitos son una subpoblación de linfocitos que se caracteriza por la expresión de marcadores hematopoyéticos (CD45, CD34) y de células mesénquimales como colágeno I y fibronectina. En FPI, se ha demostrado que por medio de la expresión

en los fibrocitos del receptor quimioatrayente (CXCR4), provoca que estas células circulen hacia los pulmones (14).

Participación de los fibroblastos en la fibrosis pulmonar.

Como se indicó anteriormente, en la FPI, se ha sugerido que la población de fibroblastos deriva de distintas fuentes, que incluyen a los fibroblastos residentes, los progenitores circulantes derivados de médula ósea (fibrocitos) y de las células epiteliales a través de la transición epitelio-mesénquima (TEM) (16).

Estudios previos han demostrado que los fibroblastos provenientes de pulmones de pacientes con FPI, difieren de los fibroblastos de pulmón normal en la composición del citoesqueleto, la síntesis de colágena, en su capacidad proliferativa y de supervivencia, en el contenido lipídico y la expresión de algunos marcadores de superficie, entre otros. Una de las diferencias que caracteriza esta heterogeneidad de los fibroblastos, se basa en la expresión del antígeno de timocitos 1 (Thy-1 por sus siglas en inglés), generando la subpoblación Thy-1 positiva y la Thy-1 negativa (34). Thy-1 o CD90 (cluster de diferenciación 90) es una proteína N-glicosilada que se encuentra en la membrana celular anclada a través de glicofosfatidilinositol (GPI). Thy-1 fue originalmente descubierto como un antígeno de células T en 1964 por Reif and Allen (35), aunque ahora se sabe que se expresa en timocitos, pro-timocitos, neuronas, células musculares, endoteliales, células troncales mesénquimales, células troncales hematopoyéticas, células Natural Killer, células de melanoma, células dendríticas foliculares y subpoblaciones de fibroblastos y miofibroblastos (36). También, se ha detectado a Thy-1 en forma soluble en suero, fluido cerebro espinal, en el líquido sinovial en artritis reumatoide, y más recientemente en la orina (37-39).

Esta glicoproteína se encuentra conservada tanto en vertebrados como en invertebrados. La proteína tiene un peso de 25 kDa con 161 aminoácidos y el gen que la codifica está localizado en el cromosoma 11q22.3 en humanos (40). Thy-1 es considerado como un marcador de células troncales en gliomas, hematopoyéticas, mesénquimales y hepáticas (41-42).

La función exacta de Thy-1 no se conoce con precisión, aunque se ha especulado que interviene en la interacción y adhesión célula-célula y célula-matriz y que está involucrada en procesos celulares como apoptosis, metástasis, inflamación y fibrosis. Recientemente se ha demostrado que en forma soluble podría ser utilizado como biomarcador en diferentes patologías, ya que el Thy-1 encontrado en fluidos corporales tiene la capacidad de liberarse reteniendo su porción GPI, asociándose con vesículas o fragmentos membranales, lo que permite la generación de anticuerpos. Por otra parte, Thy-1 puede encontrarse en medios condicionados de fibroblastos pulmonares inducidos con diferentes citocinas sugiriendo la separación de Thy-1 de la membrana, como una respuesta a estrés (38-39).

En el caso de la fibrosis pulmonar , se considera que durante la formación de los focos de fibroblastos y el desarrollo del proceso fibrótico *per se*, los fibroblastos adquieren primero un fenotipo que les facilita la migración, la proliferación en el sitio de la lesión y su transformación a miofibroblastos, considerado estas características, como el fenotipo fibrótico que causa una exagerada producción y depósito de componentes de la MEC (43).

Particularmente, en el pulmón, se ha descrito, que la subpoblación de fibroblastos Thy-1 positiva en ratón expresa dos veces más colágena y fibronectina a nivel de RNA mensajero y corroborado por la proteína, en comparación con los fibroblastos Thy-1 negativos (44). Sin embargo, la ausencia de Thy-1 en los fibroblastos se ha asociado con un fenotipo profibrótico (45). Hagood y colaboradores, demostraron que el ratón modificado genéticamente deficiente de Thy-1 es viable y se desarrolla normalmente, y, presenta una respuesta GABAérgica inhibida. Sin embargo, estos ratones son más susceptibles que el ratón silvestre al desarrollo de fibrosis pulmonar inducido por la instilación de bleomicina (46).

Por otra parte, los miofibroblastos que se localizan en los focos de fibroblastos en los pulmones de pacientes con FPI son Thy-1 negativos a diferencia de la mayoría de los fibroblastos que provienen de pulmones normales que son Thy-1 positivos (45-49).

En nuestro laboratorio demostramos recientemente que la ausencia de esta glicoproteína en los fibroblastos pulmonares está asociada con un fenotipo resistente a la apoptosis, favorece la proliferación y migración de los fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos, además de expresar a la MMP-9 inducida por TGF- β a través de la vía de ERK. (50).

Interacción epitelio/mesénquima.

En condiciones normales los alveolos están delineados por una capa de neumocitos tipo I y de neumocitos tipo II, localizados en las esquinas del alveolo. Mientras que la lámina basal en los neumocitos tipo I es continua, los neumocitos tipo II pueden llegar a tener comunicación con los fibroblastos que se localizan en el espacio intersticial (51).

Uno de los cambios más evidentes en el epitelio pulmonar en la FPI, es la hiperplasia de los neumocitos tipo II, y la transición de neumocitos tipo II a tipo I; así como la ruptura de la estructura del epitelio en distintas áreas, visto microscópicamente. Los neumocitos tipo II aberrantemente activados, sintetizan una variedad de MMPs y citocinas profibrosantes (como el TGF- β 1) capaces de activar la proliferación y la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, llevando a la formación de los focos de fibroblastos. Se ha comprobado por inmunohistoquímica y microscopia electrónica que en estas zonas localizadas en el espacio intersticial se ha perdido la membrana basal y por lo tanto el alineamiento del epitelio alveolar (52).

En el proceso de cicatrización normal en la piel, después de un daño las células epiteliales se movilizan para restablecer la capa cutánea y los fibroblastos se transforman a miofibroblastos para restablecer la MEC; posteriormente desaparecen por muerte celular programada. En la FPI, se ha propuesto, por el contrario, que los fibroblastos/miofibroblastos son resistentes a la muerte celular programada.

Otra de las principales interacciones que existen entre el epitelio y las células del mesénquima se da durante la activación de la cascada de coagulación. Se ha demostrado que el ensamblaje del complejo del factor X-factor VIIa por las células epiteliales, permite la activación del factor X, el cual dirige un estímulo a los fibroblastos subyacentes a las regiones de los focos. Adicionalmente, la trombina y el factor X inducen la diferenciación de fibroblastos pulmonares a miofibroblastos a través de la vía del Receptor 1 activado por proteasas (PAR1) (54).

En este contexto, la interacción entre las células epiteliales y los fibroblastos es muy importante tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En particular, en la FPI, ésta interacción favorece la alta producción de componentes de la MEC y la destrucción de la arquitectura pulmonar. Sin embargo, el efecto de la presencia o ausencia de Thy-1 en la interacción entre los fibroblastos/miofibroblastos y las células del epitelio alveolar no ha sido estudiado, y se considera que los fibroblastos pulmonares de humano que no expresan Thy-1 tienen un efecto profibrosante sobre las células del epitelio alveolar.

HIPÓTESIS

Los fibroblastos pulmonares humanos que no expresan Thy-1 tienen un efecto profibrosante sobre las células del epitelio alveolar.

OBJETIVOS

General

Analizar la expresión múltiple de genes pro- y anti-fibrosantes en células epiteliales alveolares A549 co-cultivadas con fibroblastos Thy-1 negativos y positivos, para determinar posibles diferencias.

Específicos

1. Caracterizar una línea de fibroblastos Thy-1 negativa inmortalizada así como una línea nativa, y comparar ambas líneas, con los fibroblastos Thy-1 positivos.
2. Analizar por citometría de flujo los niveles de expresión de Thy-1 en fibroblastos de pulmón humano.
3. Corroborar la expresión génica de algunos de los genes diferencialmente expresados entre la línea nativa e inmortalizada, por PCR en tiempo real.

4. Determinar la expresión de las proteínas seleccionadas por Western blot
5. Determinar si existe una correlación entre la expresión de Thy-1 y de Colágena I en fibroblastos humanos
6. Estandarizar el tiempo de co-cultivo de las células epiteliales y los fibroblastos Thy-1 negativos y positivos.

ANTECEDENTES

La FPI es una enfermedad pulmonar relacionada con la edad pero de etiología desconocida, para la cual no existen terapias efectivas para su tratamiento y los mecanismos patogénicos no están bien esclarecidos. Los pacientes con esta enfermedad mueren de 2 a 3 años después del diagnóstico (12-14). Una vez que se inicia el desarrollo de fibrosis en el pulmón el proceso es irreversible. El trasplante de pulmón se ha sugerido como una alternativa para tratar esta enfermedad, sin embargo, sólo el 44% de los pacientes con trasplantes logran vivir al menos cinco años después del mismo (14). En este contexto, es necesario conocer cómo actúan las células activas en la enfermedad así como los posibles mecanismos moleculares en los que están involucrados; en particular, el papel de Thy-1 en fibroblastos pulmonares y su relación con la expresión de moléculas características de la fibrosis, incluyendo a las MMP's; así como la interacción de estos fibroblastos en co-cultivo con células epiteliales alveolares.

MATERIAL Y MÉTODOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Las diferentes líneas de fibroblastos se obtuvieron de biopsias de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y el proyecto fue aprobado por el comité de bioética con consentimiento escrito de los pacientes. El diagnóstico de fibrosis pulmonar se hizo con base en el consenso de la Sociedad Americana de Tórax y de la Sociedad Europea Respiratoria (ATS/ERS) confirmada por biopsia pulmonar a cielo abierto (55).

Las células epiteliales alveolares humanas A549 se obtuvieron de la compañía *American Type Cell Culture* (ATCC). Las células A549 son una línea celular hipotriploide obtenida inicialmente de un tejido pulmonar carcinomatoso por el Dr. Giard en 1972.

OBTENCIÓN DE FIBROBLASTOS

Los fibroblastos de pulmón se obtuvieron de una biopsia de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad se aislaron por tratamiento enzimático con Tripsina-

EDTA (Tripsina EDTA [1x] 0.5g de tripsina porcina y 0.2g de EDTA, SIGMA) a 37°C por 20 minutos (55). Posteriormente los fibroblastos se sembraron en cajas Falcon (COSTAR Cambridge MA) de 25cm² con medio HAM F-12K (Invitrogen, Carlsbad CA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (10% SFB, GIBCO, Grand Island, NY), 100ml de penicilina y 100mg/ml de estreptomycin (GIBCO, Grand Island, NY), a 37°C en 5% CO₂/ 95% O₂ como se describió previamente .

Se sembraron 3x10⁵ fibroblastos que se encontraban entre los pasajes 5-12 (con excepción de la línea inmortalizada) en cajas con pozos de 9.6 cm² de superficie (COSTAR Cambridge MA), en medio F-12 Hank suplementado con 10% de SFB por 24 horas para su adherencia, se retiró el medio y se hicieron dos lavados con medio sin suero; se sincronizó su ciclo celular mediante el uso de medio sin suero fresco por 24 horas y se estimularon con TGF-β1 a una concentración de 5 ng/ml o PMA (SIGMA) a 1x10⁻⁸M por 24 horas para extracción de RNA. Adicionalmente se sembraron fibroblastos en cajas de plástico de 25 cm² de superficie (COSTAR Cambridge MA), en medio F-12 Hank suplementado con 10% de SFB y cuando alcanzaron la confluencia, se mantuvieron en medio sin suero fresco sincronizando su ciclo celular por 24 horas y estimulándose con TGF-β (R & D Systems, MN USA) a la concentración antes mencionada por 48 horas para la obtención de lisados celulares y la recolección del medio condicionado para zimografía y tinción con rojo Sirio (Biocolor).

CITOMETRÍA DE FLUJO

Los fibroblastos se cultivaron a confluencia temprana (85-90%) y se realizó la tinción de 2.5 x 10⁵ células con anti-CD90-APC o anti-CD90-PECy5 (BD Pharmingen). Después de lavar con PBS 0.01%BSA a 500x g durante 10 minutos, los fibroblastos se resuspendieron en 50µl de Buffer con BSA al 1%. Los fibroblastos se incubaron con los anticuerpos monoclonales antes mencionados por 25 minutos en hielo y en la obscuridad. Se fijaron en 300µl p-formaldehído al 1%, después de previos con 1ml PBS a 500x g por 10 minutos cada uno. Se adquirieron y analizaron 40000 eventos, en un citómetro de flujo FACS Aria (BD Pharmingen, Palo Alto CA), equipado con un láser de 488 nm. Se utilizó el programa FACS Diva para el análisis de datos.

CO-CULTIVO

Se realizó un co-cultivo indirecto a través de un sistema Transwell con una membrana con poros de 0.4µm (Corning, Nueva York). En el día 0, los insertos se incubaron de 6 a 24h en medio HAM F-12K (Invitrogen, Carlsbad CA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (10% SFB), 100ml de penicilina y 100mg/ml de estreptomycin a 37°C. El primer día se sembraron 2 x 10⁵ células epiteliales (A549) en placas con pozos de 9.6 cm²; por separado se sembraron 3 x10⁵ fibroblastos en la cámara superior del sistema y se incubaron durante 24h a 37°C en medio HAM F-12 suplementado con 10% de SFB y antibióticos. Se sincronizó cada grupo celular por separado en medio de cultivo en ausencia de suero por 24h, a 37°C en 5% CO₂/ 95% O₂ (día 2). Finalmente se

estableció el sistema de co-cultivo con medio F-12 en ausencia de suero en el siguiente orden: células epiteliales en la cámara inferior y fibroblastos en la cámara superior. Los tiempos de co-cultivo fueron 6, 12, 24 y 48h para la extracción de RNA Total y de 48h para la obtención de extractos proteicos para Western blot.

EXTRACCIÓN DE RNA Y TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Se extrajo el RNA total de las células con el método de TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad CA), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. A cada muestra se le adicionó 1µl de glucógeno. El RNA total, se trató con DNAsa I. Al volumen equivalente a 1µg de RNA total se le adicionó H₂O DEPC para tener un volumen final de 8 µl. A esa mezcla se le agregó 1 µl de Buffer y 1 µl de DNAsa (Fermentas Life sciences) y se incubó a 37°C por 30 minutos en un Termociclador (Gene Amp PCR system 2400, Perkin Elmer). Se inactivó la enzima a altas temperaturas con ayuda de EDTA (1 µl) y se incubó a 65°C por 10 minutos. El RNA total libre de DNA se transcribió de forma inversa por medio de RT-PCR (High capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City CA) bajo las siguientes condiciones:

Componente	Volumen µl (1x)
Buffer RT 10x	2.0
dNTP mix 25x (100mM)	0.8
Random primers 10x	2.0
Transcriptasa Reversa	1.0
Inhibidor de RNasa	1.0
H ₂ O DEPC	2.2

Adicionando 9 µl de la mezcla de RT a cada tubo (20 µl de volumen final), en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Tiempo	10 min	120 min	5 min	∞

El cDNA se llevó a un volumen final de 50µl y se guardó a -20°C hasta su uso en PCR Tiempo Real.

PCR EN TIEMPO REAL

Para llevar a cabo las reacciones de PCR se adquirieron sondas fluorogénicas específicas para la Colágena I (Col Iα1), Metaloproteasa de matriz 1 (MMP-1), Metaloproteasa de matriz 7 (MMP-7), Metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9) y (PPARγ) en (PE Applied Biosystems, Foster City,CA). Se utilizó como control endógeno al gen para el rRNA 18s para normalizar la expresión y comparar las diferencias en la cantidad de RNA total en cada muestra. La sonda de rRNA 18s fué adquirida de Applied

Biosystems. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (CFX96 Real Time System, Bio-Rad) con las siguientes condiciones:

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C	4°C
Tiempo	5 min	10 min	5 seg	1 min	∞

Repetiendo del Paso 3 a Paso 4, durante 40 ciclos. Los resultados se expresaron como el número de copias de cada gene normalizado con el número de copias del RNA ribosomal 18S con el método de *Delta-delta ct*.

Para el caso de Thy-1, se utilizaron cebadores específicos:

Cebador	Secuencia
Thy-1 sentido	CATCGCTCTCCTGCTAACAGTC
Thy-1 antisentido	TGGTATTCTCATGGCGGCAGTC
HPRT1 sentido	AAGGACCCACGAAGTGTG
HPRT1 antisentido	GGCTTTGTATTTTGCTTTTCCA

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C	4°C
Tiempo	5 min	10 min	5 seg	1 min	∞

Repetiendo del Paso 3 a Paso 4, durante 40 ciclos. Los resultados se expresaron como el número de copias de cada gene normalizado con el número de copias de HPRT1 con el método de *Delta-delta ct*.

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Para determinar la presencia de las proteínas de las células epiteliales alveolares cocultivadas con fibroblastos Thy-1 positivos y negativos, así como para la caracterización de la línea Thy-1 negativa inmortalizada, se utilizaron los extractos proteicos o medios condicionados dependiendo de la proteína blanco. Para extraer las proteínas de las células epiteliales se usó el Buffer RIPA (150mM NaCl, 10 mM Tris, 0.1% SDS, 1.0% Tritón X-100, 1.0% deoxicolato, 5mM EDTA). Las proteínas extraídas se cuantificaron por el método de Bradford y se separaron electroforéticamente 30µg en geles de poliacrilamida-SDS al 10-15%. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF utilizando una cámara húmeda. Una vez transferidas las proteínas, las membranas se bloquearon con una solución de leche al 5% en PBS-T 0.1% (Tween 20) y se incubaron con los anticuerpos de interés anti-αSMA (SIGMA, Dilución 1:500) así como el control de carga utilizando un anticuerpo anti-β-Actina (1:1000). Posteriormente se

hicieron 4 lavados con TBS-T 0.01% y se incubaron con un segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa (anti-conejo o anti-ratón, según el caso 1:10000; SIGMA) y se usó el sistema de detección por quimiluminiscencia Immobilon Western (Millipore, Billerica MA). Las imágenes fueron captadas en un sistema Molecular Imager Chemidoc XR+ con el programa Quantity One v4.6.9 (BIO-RAD laboratorios, Hercules, CA).

DETECCIÓN DE GELATINASAS POR ZIMOGRAFÍA.

El medio condicionado obtenido de los fibroblastos en cultivo se dializó en membranas para diálisis (Spectra MWCO 3,500) en agua destilada con presencia de inhibidores de proteasas (EDTA 1M, NaN_3 1%, PMSF 100mM y NEM 2M) y se dieron lavados exhaustivos también con agua destilada. Los medios condicionados se liofilizaron y resuspendieron para su cuantificación con el método de Bradford. Se cargó el equivalente a 2µg de proteína total de cada muestra y heparina en una concentración final de 0.3 mg/ml. La separación electroforética se realizó en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 10% conteniendo 1mg/ml de gelatina. Después de la electroforesis (180-200V por 45 minutos aproximadamente), los geles se incubaron dos veces en una solución de Tritón X-100 al 2.5% por 15 minutos cada uno en agitación moderada y un último lavado en agua destilada. Los geles se incubaron a 37°C toda la noche en glicina 100mM pH 8.0, con CaCl_2 10mM y Zn CaCl_2 50mM. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 al 1% en isopropanol al 25% y ácido acético. Se destiñeron en una solución de ácido acético al 10% y metanol al 40%. Las zonas de actividad se observaron como bandas claras contra un fondo azul y se utilizaron como controles positivos medios condicionados de fibroblastos de pulmones normales (para MMP-2) y de células U2OS (para MMP-9).

CUANTIFICACIÓN DE COLÁGENA

Se cuantificó Colágena I en medios condicionados obtenidos de fibroblastos estimulados con TGF-β1 (5ng/ml) con un estuche comercial sensible para su detección mediante colorimetría, siguiendo las instrucciones del fabricante (Biocolor). 50µl de medio condicionado de fibroblastos con TGF-β por 48 h se agregó a 1ml de Rojo sirio y se centrifugó a 1200rpm por 10 minutos. El pellet se lavó con 750µl de solución salina de fría, se centrifugó a 1200rpm por 10 minutos y se secó cuidadosamente el pellet. Se resuspendió el pellet en 250µl de solución alcalina y se leyeron 200µl en un microplaca a 555nm. La cantidad de colágena se expresa en microgramos por microgramo de proteína en base al blanco y una curva estándar de concentración.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados con ANOVA de una vía (más de dos grupos) o con t de student (dos grupos) utilizando Prisma como programa de análisis. (*) Se utilizó para significancias de $p \leq 0.05$ y (***) para $p \leq 0.001$.

Todos los resultados provienen de triplicados de dos o tres experimentos independientes; los datos fueron expresados como medias \pm su desviación estándar.

RESULTADOS

En nuestro laboratorio se obtuvo una línea de fibroblastos derivada de un cultivo primario que no expresa Thy-1. Estos fibroblastos presentaron una mayor tasa de proliferación y migración que la mayoría de los fibroblastos que son Thy-1 positivos (más de 80% de expresión) además de expresar *in vitro* a la MMP-9 (50).

Este cultivo primario fue obtenido de una biopsia tomada a una paciente con neumonitis por hipersensibilidad de 54 años de edad quién mostró un patrón funcional restrictivo moderado al momento del diagnóstico (capacidad vital forzada de 58%) con hipoxemia en reposo ($\text{PaO}_2 = 60\text{mmHg}$, cuyos valores normales a la altitud de la Ciudad de México son de $67 \pm 3\text{ mmHg}$) que empeoraba con ejercicio (sPO_2 en reposo del 90% y al término de caminar durante 6 minutos disminuía a 81%) y que a pesar del tratamiento con Prednisona y Azatriopina (terapia inmunomoduladora común en el tratamiento de enfermedades fibrosantes inflamatorias) la paciente empeoró y murió 5 años después del diagnóstico (50).

Para evitar perder la línea de fibroblastos Thy-1 negativos debido a un proceso de senescencia replicativa, los fibroblastos fueron sometidos a un proceso de inmortalización mediante la sobreexpresión de la telomerasa TERT (de Telomerase reverse Transcriptase), siguiendo las instrucciones del fabricante (pLenti hTERT, abm).

Como se muestra en la siguiente figura 1, los fibroblastos Thy-1 negativos inmortalizados (A), tienen un tamaño menor que la línea de fibroblastos Thy-1 positiva (B) como se había reportado anteriormente (50); demostrando que el proceso de inmortalización no afectó esta parte de su fenotipo.

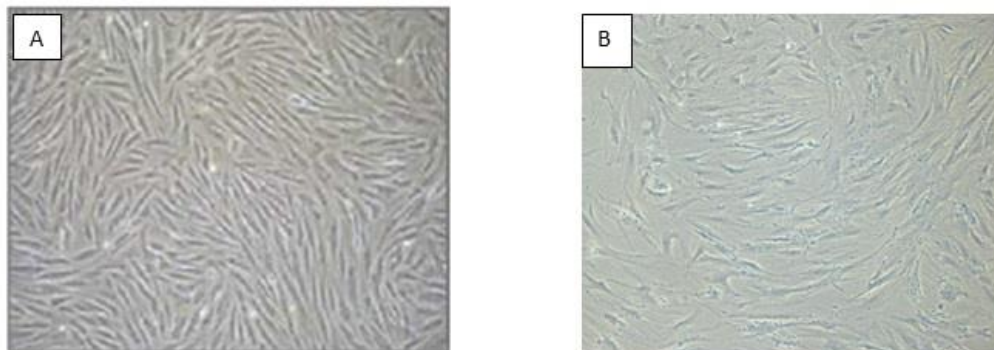


Figura 1. Comparación morfológica de fibroblastos Thy-1 positivos y negativos. Los fibroblastos Thy-1 negativos (A) son células más pequeñas y uniformes, comparadas con los fibroblastos Thy-1 positivos que son células más grandes y de extensión variada (B).

Expresión de Thy-1.

Para poder determinar el porcentaje de expresión de Thy-1 en las diferentes líneas de fibroblastos pulmonares humanos, así como en la línea inmortalizada se hizo la caracterización mediante citometría de flujo (Fig 2).

Como ya se ha reportado en una alta proporción de fibroblastos de cultivo primario la expresión de Thy-1 varía entre 75%-95% a excepción de la línea 201 que expresa menos del 5% (de ahora en adelante línea Thy-1 negativa nativa), y como se muestra en la Figura 2B, la línea inmortalizada se comporta de forma semejante a la nativa.

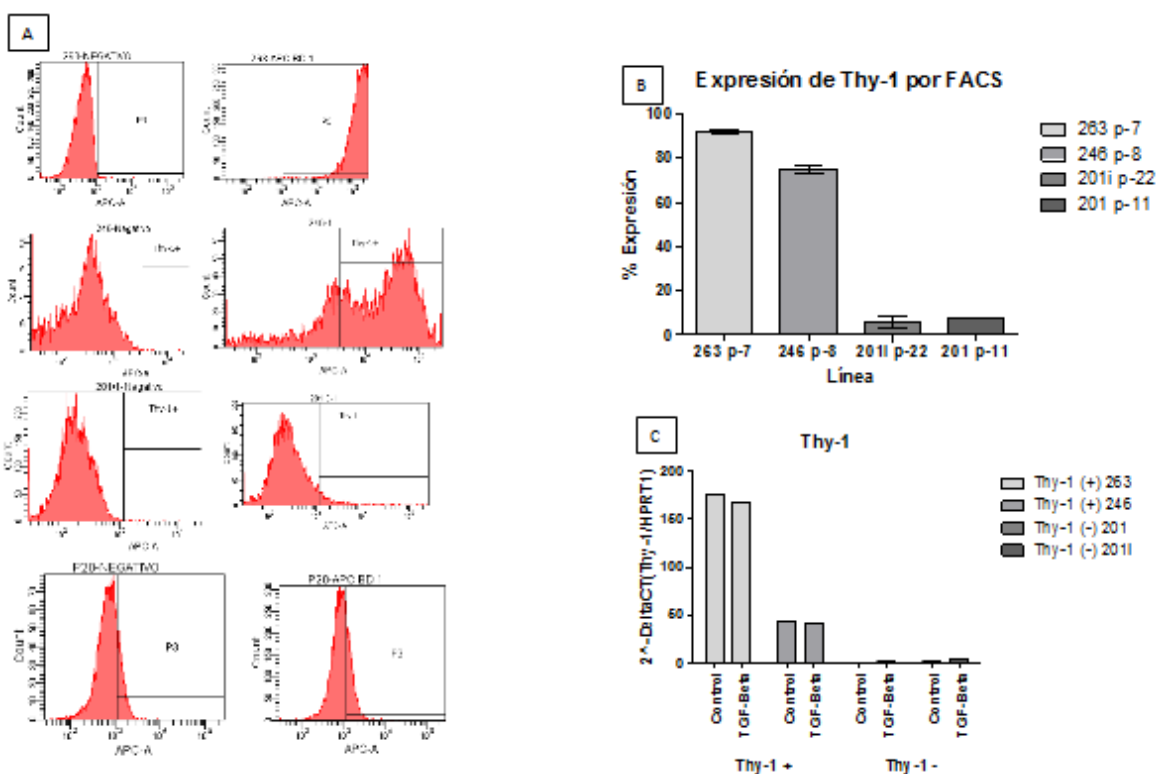
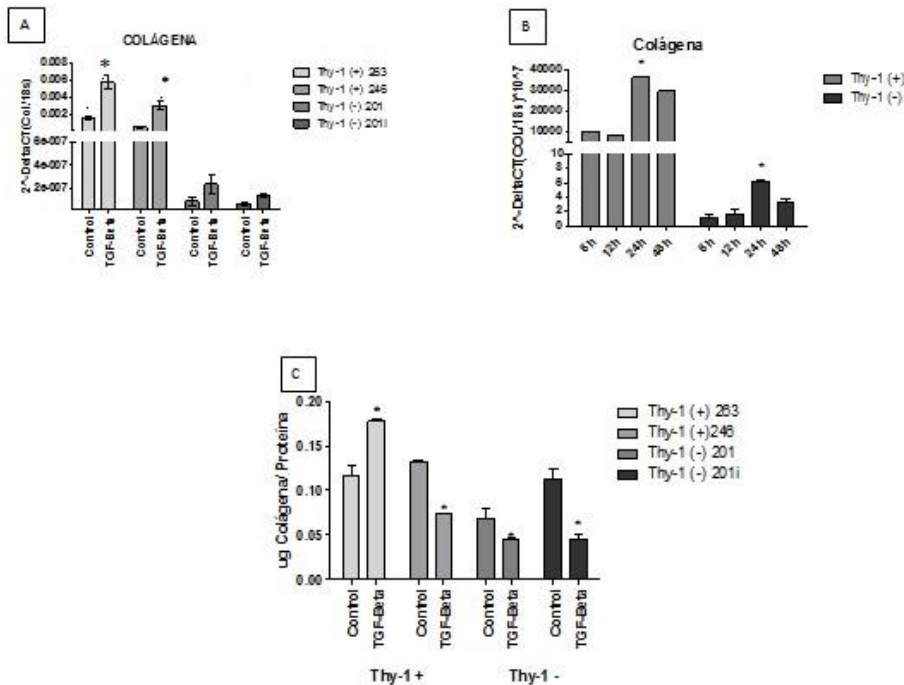


Figura 2. Expresión de Thy-1 en fibroblastos pulmonares humanos (porcentaje). Gráficas de expresión de Thy-1 en cuatro líneas de fibroblastos pulmonares humanos, (B) Análisis gráfico de la expresión de Thy-1 en cuatro líneas de fibroblastos pulmonares humanos, incluyendo la línea inmortalizada. (C) Corroboración de la expresión de Thy-1 mediante PCR en tiempo real.

Efecto de TGF- β en la expresión de colágena I.

Se ha demostrado que el TGF- β 1, conocido como la principal molécula profibrosante, altamente implicada en la patogénesis de la fibrosis pulmonar, induce la expresión de colágena I en fibroblastos.

Por esta razón, se evaluó el efecto de TGF- β 1 en la expresión de colágena 1 α 1 en cultivos de fibroblastos primarios Thy-1 positivos y negativos (línea nativa e inmortalizada) mediante PCR en tiempo real y utilizando una técnica colorimétrica. Como se muestra en la figura 3A y C los fibroblastos Thy-1 positivos expresan significativamente más colágena que los Thy-1 negativos, sin haber diferencia significativa entre la línea nativa e inmortalizada. Para determinar si esa diferencia era independiente de la mayor tasa de proliferación de la línea Thy-1 así como del tiempo óptimo de detección de la enzima, se midió la expresión del mensajero de colágena 1 α 1 por medio de un curso temporal de expresión (en 6, 12, 24 y 48 horas), sin embargo, tanto para los fibroblastos Thy-1 negativos como para los positivos se observó el mayor tiempo de expresión a las 24 horas después del estímulo (Figura 3B). Finalmente, observamos una tendencia de correlación positiva entre la expresión de Thy-1 y colágena 1 α 1 (Figura 3 D y E).



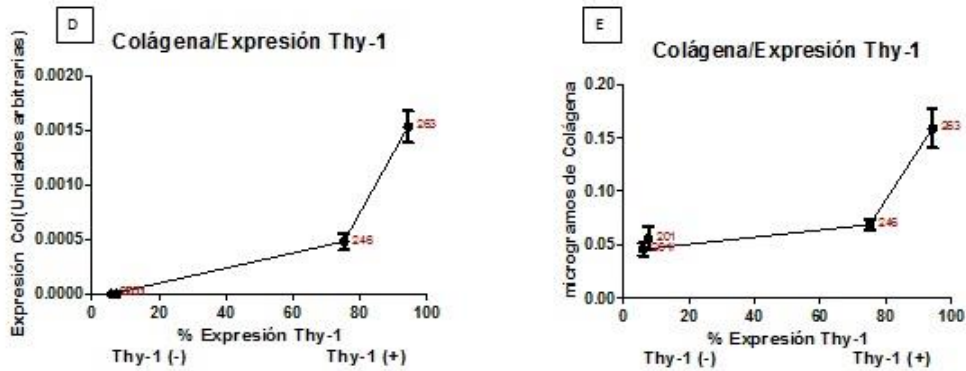


Figura 3. Expresión de colágena 1 α 1 en fibroblastos pulmonares humanos. (A) Análisis representativo de la expresión de colágena 1 en dos líneas celulares pulmonares humanas derivadas de biopsias de pacientes obtenidas en nuestro laboratorio (B) Curso temporal de la expresión de colágena en fibroblastos Thy-1 positivos y negativos. (C) Producción de colágena por fibroblastos Thy-1 (+) y (-). (D y E) Análisis de correlación positiva entre la expresión de Thy-1 y colágena a nivel de RNA mensajero (D) y de proteína (E). Todos los datos están representados como medias \pm la desviación estándar de triplicados, (*) $p \leq 0.05$.

Correlación entre la expresión de Thy-1 colágena 1 α 1 en fibroblastos pulmonares de ratones modificados genéticamente deficientes de MMP-19 y silvestres.

Estudios recientes han demostrado que los fibroblastos derivados de ratones deficientes de MMP19 expresan más colágena 1 α 1* en comparación con ratones silvestres (WT). Basados en estos hallazgos, decidimos evaluar si existía una correlación positiva entre la expresión de colágena de estos fibroblastos MMP19 KO y la expresión de Thy-1 mediante citometría de flujo. En el ratón, de forma similar al humano, los fibroblastos derivados de ratones deficientes de MMP19, que expresan más colágena 1 α 1 respecto a ratones WT, también tiene mayor expresión de Thy-1.

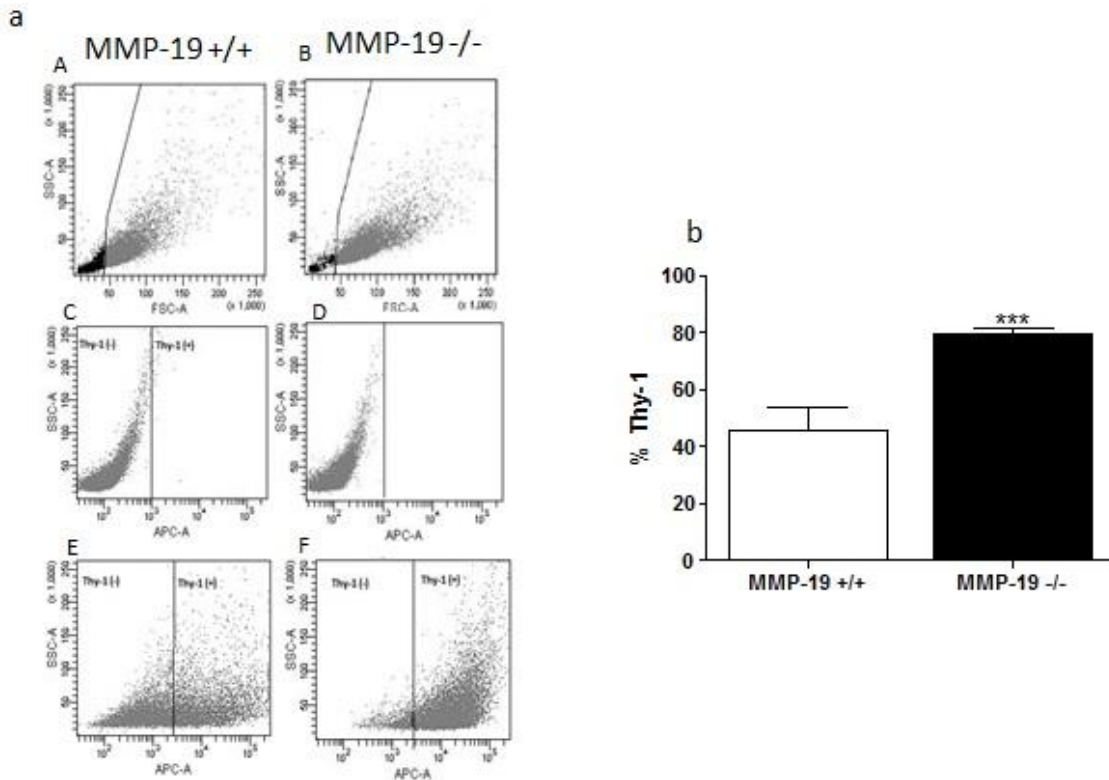


Figura 4. Expresión de Thy-1 en fibroblastos de pulmón derivados de ratones silvestres (WT) y de ratones deficientes de la MMP-19 (KO). Los datos están representados como medias \pm la desviación estándar de triplicados, (*) $p \geq 0.0001$.**

*Datos obtenidos del trabajo de Luis Antonio Plácido titulado “Evaluación del PPAR γ en la fibrosis pulmonar”

Expresión y actividad de gelatinasas A (MMP-2) y B (MMP-9) por zimografía.

Como se ha reportado, solo los fibroblastos Thy-1 negativos expresan *in vitro* a la MMP-9 (gelatinasa B) después de un estímulo profibrosante. Entre la línea immortalizada y la nativa por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de MMP-9 (Figura 5 A y C). En relación a la gelatinasa A (MMP-2) se observó que los fibroblastos Thy-1 negativos expresan significativamente más MMP-2 que los Thy-1 positivos, comportándose de forma semejante los immortalizados y los nativos (Figura 5 B).

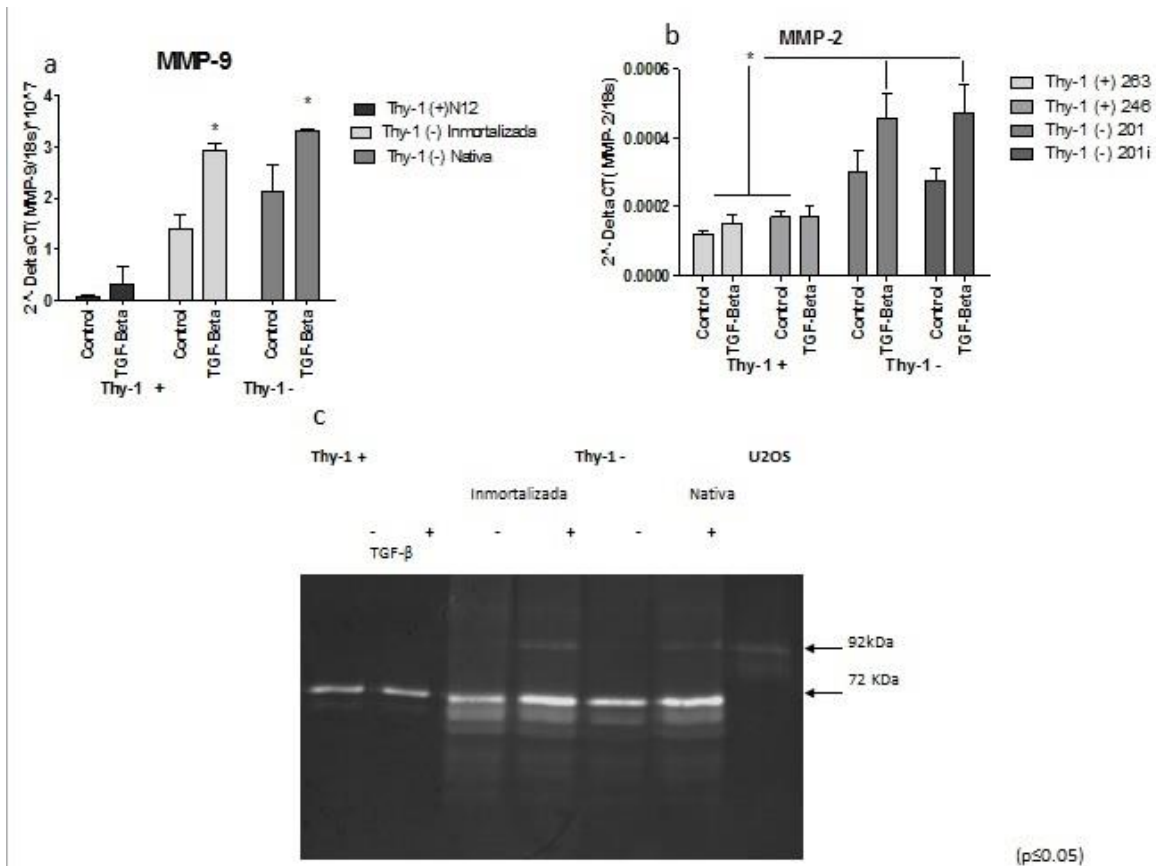


Figura 5. Análisis de la expresión de MMP-2 y MMP-9 inducidas por TGF-β en fibroblastos pulmonares Thy-1 positivos y negativos. (A,B) Expresión del RNA mensajero de la gelatinasas B y A, respectivamente. C, Zimograma que muestra la actividad de la gelatinasa B en fibroblastos pulmonares, (*) $p \leq 0.05$.

Expresión de MMP-1 y MMP-7

Pardo y colaboradores en 1992, reportaron que la expresión de la colagenasa 1 o MMP-1 es heterogénea e independiente en fibroblastos pulmonares fibróticos o normales; sin embargo, su respuesta al supresor de tumores Acetato de forbol miristato (PMA) es positiva en ambos grupos, siendo significativamente mayor en los fibroblastos fibróticos. Para evaluar si había diferencias en el nivel de MMP1 después del estímulo con PMA o TGF-β1 entre los fibroblastos Thy-1 + y Thy-1 -, se cuantificó su expresión por PCR en tiempo real en ambos grupos.

Sorpresivamente, ni los fibroblastos Thy-1 negativos inmortalizados, ni los nativos expresan MMP-1 independientemente del estímulo utilizado (figura 7 A y B). Por otra parte, todos los fibroblastos Thy-1 positivos presentan una expresión basal que es significativamente aumentada con PMA, Figura 7 A.

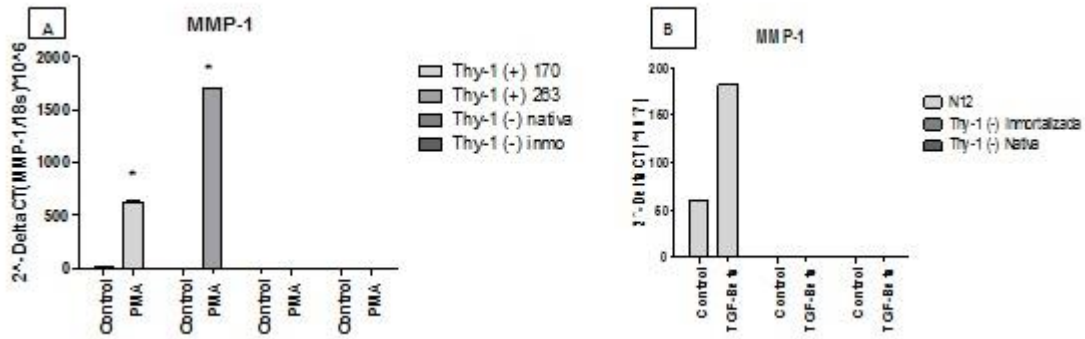


Figura 6. Expresión de MMP-1 en fibroblastos Thy-1 negativos y positivos inducidos con PMA o TGF-β. (A) Expresión de MMP-1 en fibroblastos Thy-1 positivos y negativos estimulados con PMA; (B) Expresión de MMP-1 en fibroblastos Thy-1 positivos y negativos estimulados con TGF-β. Los datos representan medias ± su desviación estándar, p≤0.05.

Otra de las MMPs más significativamente expresadas en FPI es la MMP-7. Los fibroblastos Thy-1 positivos expresan MMP-7 y responden significativamente a TGF-β a diferencia de los negativos que no la expresan, sin encontrarse diferencias entre los fibroblastos inmortalizados o nativos (Figura 7).

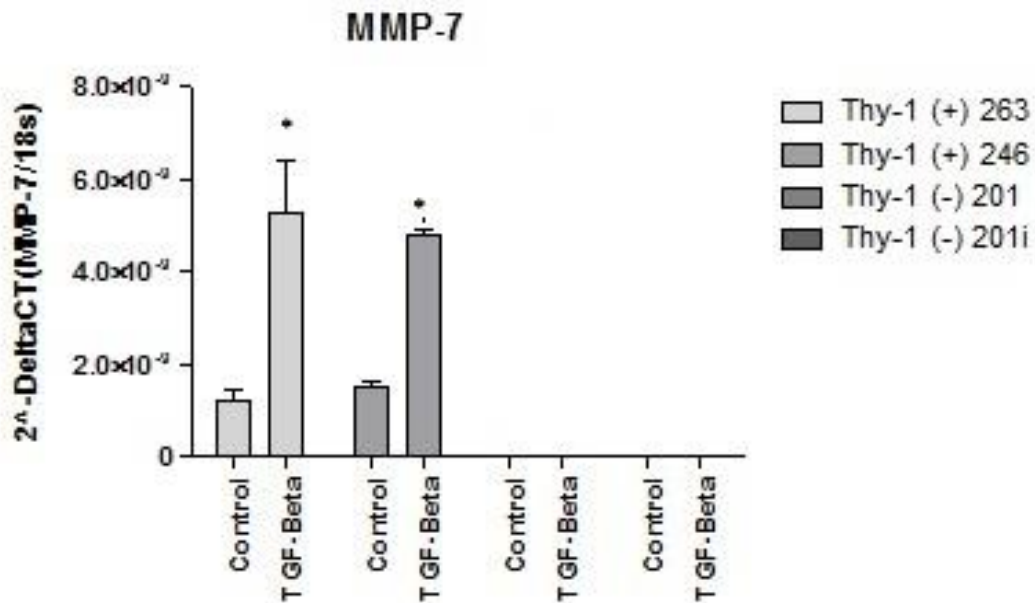


Figura 7. Expresión de MMP-7 mediada por TGF-β1 en fibroblastos Thy-1 positivos y negativos. Los datos representan medias ± su desviación estándar, p≤0.001.

Expresión de α-actina de músculo liso.

La actina es una proteína altamente conservada en eucariontes; forma parte de los filamentos del citoesqueleto y participa en la regulación y movimiento de las células. Se ha propuesto que la expresión de α -actina de músculo liso (α -SMA de sus siglas en inglés), aumenta la contracción en fibroblastos, además de ser un marcador de miofibroblastos, células mesenquimales que producen una gran cantidad de componentes de la MEC. Se ha reportado que los fibroblastos de pulmones fibróticos provenientes de ratones modificados genéticamente deficientes de Thy-1 tratados con bleomicina, expresan in vitro, significativamente más α -SMA tras un estímulo proinflamatorio (como TNF- α), comparados con los fibroblastos pulmonares de los ratones silvestres. Como se muestra en la figura 9; los fibroblastos pulmonares de humanos Thy-1 negativos y positivos tienen la misma expresión basal de esta proteína, pero la presencia de Thy-1 en los fibroblastos favorece su respuesta a un estímulo profibrosante, como es el TGF- β 1. Por otra parte, en la expresión de α -SMA es diferente entre la línea nativa y la inmortalizada (Figura 8).

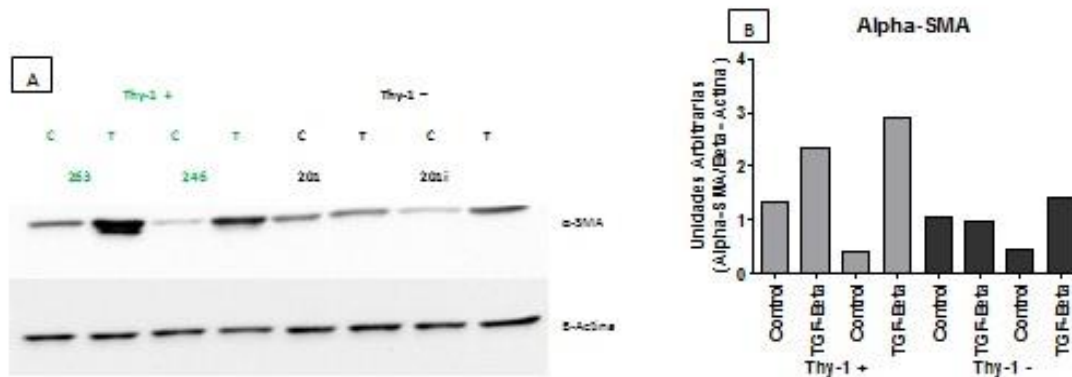


Figura 8. Análisis de la producción de α -actina de músculo liso en fibroblastos Thy-1 positivos y negativos. (A) Inmunoblot de α -SMA en fibroblastos Thy-1 positivos y negativos (B) Resultados de expresión de α -SMA por densitometria en fibroblastos Thy-1 positivos y negativos. Para normalizar los datos, se utilizó la expresión constitutiva de β -actina.

Expresión del receptor nuclear PPAR γ .

Recientemente se ha propuesto que la expresión de Thy-1 está relacionada y favorece la diferenciación de fibroblastos a lipofibroblastos a través de PPAR γ , y que en los fibroblastos pulmonares del ratón modificado genéticamente deficiente de Thy-1, el nivel de PPAR γ es significativamente menor en comparación con los fibroblastos del ratón silvestre, tanto a nivel de RNA mensajero como de proteína (56).

Para determinar cómo se encontraban los niveles de expresión de este receptor nuclear en los fibroblastos pulmonares humanos Thy-1 positivos y negativos, se midió su expresión por PCR en tiempo real. Como se muestra en la figura 9, la expresión de PPAR γ está ausente en los fibroblastos Thy-1 negativos; en los fibroblastos Thy-1 positivos, por otra parte, hay una expresión basal y de acuerdo a lo reportado en la

literatura, bajo el estímulo de TGF- β 1, la expresión del receptor nuclear es significativamente menor.

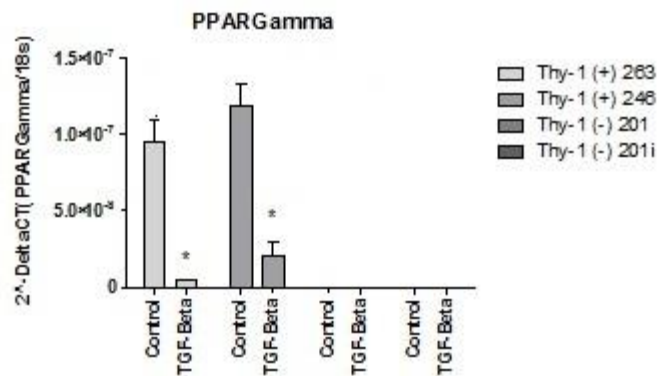


Figura 9. Expresión de PPAR γ en fibroblastos Thy-1 positivos y negativos derivados de pulmón humano. Ausencia de la expresión de RNA mensajero de PPAR γ 1 en las dos líneas de fibroblastos Thy-1 negativos, nativa e immortalizada. Los datos representan medias \pm su desviación estándar, $p \leq 0.05$.

Cocultivo de células epiteliales alveolares A549 con fibroblastos Thy-1 negativos o positivos.

Por medio de PCR en tiempo real, se midió la expresión de distintas MMPs en células epiteliales alveolares A549 después de haber sido co-cultivadas por 12, 24 o 48 horas con fibroblastos Thy-1 positivos, con fibroblastos Thy-1 negativos o sin fibroblastos, generando curvas de expresión tiempo-respuesta de la MMP-1, MMP-2 y MMP-7.

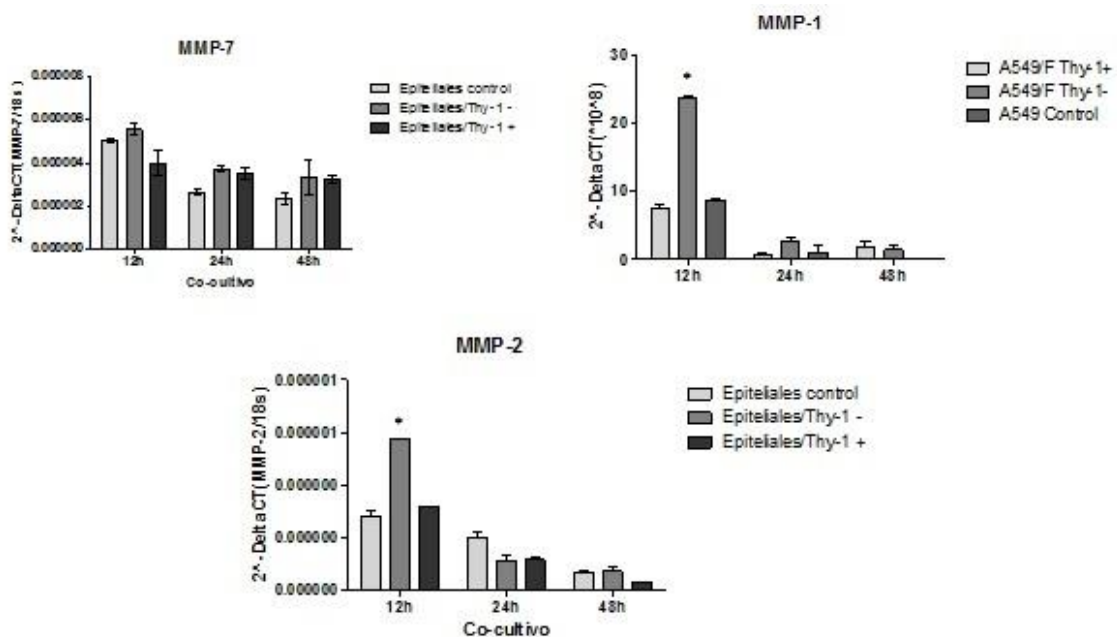


Figura 10. Análisis de la expresión de MMP-1, MMP-2 y MMP-7 en células epiteliales alveolares después de 12, 24 y 48 horas de co-cultivo con fibroblastos Thy-1 positivos o negativos, y sin fibroblastos.

DISCUSIÓN

En nuestro laboratorio se obtuvo a partir de un cultivo primario una línea de fibroblastos pulmonares que no expresan la glicoproteína Thy-1 (50). Está fuertemente documentado, que las líneas celulares derivadas de cultivos primarios tienen un número finito y pre-determinado de divisiones celulares en cultivo; después de las cuales (el número depende de la especie, tipo celular o de las condiciones de cultivo) las células entran a un estado donde no se replican más (estado de senescencia replicativa). Una vez en este estado, las células sufren una serie de cambios morfológicos asociados al tamaño celular y al desarrollo de múltiples núcleos; incluyendo cambios en la expresión génica y en su actividad metabólica y, la activación de supresores de tumores como p53 (57). Esta línea de fibroblastos Thy-1 negativos fue sometida a un proceso de inmortalización para evitar su pérdida por el proceso de senescencia replicativa. En este contexto, no sólo se buscó extender el tiempo de replicación de la línea por medio de la sobreexpresión de la proteína de la transcriptasa reversa de la telomerasa (TERT por sus siglas en inglés), sino mantener las mismas características fenotípicas y funcionales de la línea nativa de la cual proceden.

Como se mostró en la caracterización, la inmortalización de la línea de fibroblastos pulmonares humanos Thy-1 negativo no modificó las características fenotípicas reportadas anteriormente (50), tal y como se muestra con la ausencia de expresión de Thy-1 medida por citometría de flujo y por PCR en tiempo real así como la expresión de MMP-9 inducida con TGF- β 1 tanto a nivel del mensajero como de la proteína, siendo semejantes a la línea nativa.

Se ha descrito que la expresión de colágenas fibrilares I y III es una característica de los fibroblastos. Sorpresivamente se observó, que los fibroblastos Thy-1 positivos que se utilizaron, expresan significativamente más colágena tipo I a nivel de RNA mensajero y de proteína, que la subpoblación negativa, independientemente del proceso de inmortalización, y aunque a nivel de proteína la expresión basal es distinta, su respuesta a TGF- β 1 es similar, observándose una tendencia de correlación positiva entre la expresión de Thy-1 y colágena tipo I (tanto del mensajero como de la proteína) como se mostró en la figura 3 en los resultados.

Anteriormente, se había reportado que fibroblastos pulmonares de ratón Thy-1 positivos expresan dos veces más colágena y fibronectina que la subpoblación negativa. Por otra parte, en nuestro laboratorio se vio, que los fibroblastos de ratones KO de la MMP-19 tienen una mayor expresión de colágena tanto del RNA mensajero como de la proteína*, comparada con la del ratón silvestre, y por citometría de flujo se comprobó que estos

fibroblastos también tienen una mayor expresión de Thy-1. De acuerdo a ello, se pudo sugerir que la expresión de colágena tipo I y Thy-1 está correlacionada tanto en humanos como en el ratón. Se sabe que las cascadas de señalización JNK-AP-1 y ERK-NFκβ modulan la expresión de colágena tipo I y de MMP-1 en fibroblastos del ligamento periodontal cuando son sometidos a tensión mecánica, lo que podría sugerir que alguna de estas vías también podría ser la que module la expresión de ambos genes, MMP-1 y Col1α1 en los fibroblastos pulmonares (58).

En general, se considera que los genes de las MMPs son inducibles, en base a distintos experimentos que demuestran un aumento significativo de su expresión cuando los grupos celulares que las expresan son expuestos a un estímulo externo. Se ha reportado que no todas las líneas de fibroblastos de pulmón fibrótico o normal expresan MMP-1 en condiciones basales, pero ambos responden de forma positiva al PMA (59). Sorpresivamente, en este trabajo, se observó que ambas líneas Thy-1 negativas (nativa e inmortalizada) no expresan MMP-1 ni en condiciones normales, ni con el estímulo de PMA o TGF-β1, a diferencia de los fibroblastos Thy-1 positivos, que independientemente de la heterogeneidad en su expresión basal, responden de forma positiva al PMA, que induce la síntesis de pro-colagenasa I; concordando con lo reportado en la literatura (59). Una posible explicación es la que resuelve la paradoja sobre la expresión de la MMP-1 en enfermedades fibrosantes como la FPI, donde la principal característica es la exagerada acumulación de MEC, a diferencia de las enfermedades reumáticas donde existe una exagerada degradación de la MEC y distintas MMPs (entre ellas la MMP-1) están sobreexpresadas. La explicación propuesta, es que la expresión de esta enzima se limita a las células epiteliales, mientras que en los focos de fibroblastos, donde se sabe que la subpoblación es Thy-1 negativa, la colagenasa I está ausente. Interesantemente, la línea Thy-1 negativa tiene una mutación en el cromosoma 11 (que impide la expresión del gen de Thy-1), cromosoma donde el gen de la MMP-1 se localiza (específicamente en 11q22.3). Sin embargo, no se ha estudiado si existe una asociación entre la mutación de Thy-1, con alteraciones en el gen de MMP1.

Además, también se midió la expresión de la MMP-7 que junto con la MMP-1 se ha sugerido como un biomarcador en FPI (27-28) y que se localiza en el mismo locus (11q22.3); obteniendo el mismo resultado; las líneas Thy-1 positivas tienen una expresión basal que es significativamente mayor tras un estímulo pro-fibrosante comparadas con las líneas Thy-1 negativas, destacando una vez más, que la línea inmortalizada se comporta de forma semejante a la nativa.

Anteriormente en este trabajo se mencionó que el proceso de inmortalización no modificó la característica de la línea nativa de expresar MMP-9 tanto a nivel de mensajero como de proteína. Aunado a estos datos, se observó que ambas líneas Thy-1 negativas, expresan significativamente más MMP-2. Esta otra gelatinasa está también aumentada significativamente tanto en condiciones basales como después de la estimulación con TGF-β1, comparadas con las líneas de fibroblastos Thy-1 positivas. Se ha descrito que estas gelatinasas además de degradar componentes de la lámina basal, sitio donde se

anclan las células epiteliales; también podrían estar involucradas en la TEM, proceso muy relevante en FPI al fomentar el aumento de la población de fibroblastos en esta patología (25).

Se sabe que el PPAR γ es un receptor nuclear que participa en la homeostasis de insulina y de ácidos grasos, y que además disminuye los efectos fibróticos en el pulmón del ratón ocasionados con el modelo de bleomicina. Aunque aún se desconoce el papel dentro de la FPI, se ha propuesto que el PPAR γ tiene un efecto antagónico al del TGF- β 1 en fibrosis, ya que en fibroblastos de piel derivados de biopsias de pacientes con escleroderma, agonistas del PPAR γ disminuyen la expresión de colágena I y fibronectina (59). También, se sabe que la presencia de Thy-1 favorece la diferenciación a lipofibroblastos a través de PPAR γ , y que la expresión de este receptor nuclear está disminuida en fibroblastos de ratón pulmonares carentes de Thy-1 (56,61-62). En este contexto, en fibroblastos pulmonares derivados de humano, se vio que la subpoblación negativa (tanto nativa como inmortalizada) no expresa el mensajero de PPAR γ , mientras que en la positiva, la expresión es constitutiva pero heterogénea dependiendo de la línea y responden de forma negativa al TGF- β 1.

Como parte de la caracterización de las líneas Thy-1 negativas nativa e inmortalizada y al compararlas con los fibroblastos positivos, se midió la expresión de α -SMA, proteína de citoesqueleto y marcador celular de miofibroblastos. En este experimento, la expresión α -SMA entre la línea nativa e inmortalizada es diferente, destacando que al ser un único experimento, no se puede realizar un análisis estadístico de la expresión de esta proteína presente en cada grupo celular estudiado.

Para establecer el tiempo óptimo en el que deben estar las células epiteliales en co-cultivo con los fibroblastos Thy-1 positivos y negativos, y poder observar la expresión de moléculas pro- o anti-fibrosantes por las células epiteliales en un análisis múltiple de genes en una placa de *Affimetrix*, se realizó un análisis curso temporal de co-cultivo. En las primeras 12 horas, hay un aumento significativo en la expresión de MMP-1 y MMP-2 en las células epiteliales co-cultivadas con los fibroblastos Thy-1 negativos, en comparación con aquellas cultivadas con los fibroblastos Thy-1 positivos, o cultivadas sin fibroblastos.

Transcurridas las 24 horas, la expresión de MMP-7, MMP-1 y MMP-2 en los tres grupos (células epiteliales co- cultivadas con fibroblastos Thy-1 positivos, con fibroblastos Thy-1 negativos o sin fibroblastos, como condición control del experimento) va disminuyendo, siendo similares a las 48 horas, sugiriendo de forma preliminar con los datos obtenidos que la expresión de esta proteasa por las células epiteliales está favorecida por la presencia de fibroblastos Thy-1 negativos *in vitro*. Además, se consideró a las 12 horas de co-cultivo como el tiempo óptimo para realizar el análisis de expresión global por microarreglos, y completar uno de los objetivos de este trabajo.

Además de secretar proteínas de la matriz con un efecto fibrosante, los fibroblastos activados tienen un papel importante en el reclutamiento de más fibroblastos a través de la secreción de factores profibrosantes específicos en respuesta a la activación mediada

por TGF- β . Adicionalmente, los fibroblastos Thy-1 negativos, a diferencia de los fibroblastos Thy-1 positivos; tienen la capacidad de activar la forma latente de TGF- β en respuesta a estímulos profibrosantes (45). Recientemente, se ha sugerido que la activación de las células epiteliales del pulmón durante la fibrogénesis es una hipótesis atractiva, basada en la susceptibilidad del epitelio pulmonar a daños ambientales así como, los estudios que sugieren que un aumento en el número de células epiteliales como la pérdida de la integridad del epitelio alveolar, son fenotipos que prevalecen en la FPI. Aunado a esto, estudios confirman que en las primeras etapas en el desarrollo de fibrosis, las células epiteliales expresan proteínas mesénquimales, incluyendo la colágena tipo I (62). En este contexto, la activación de TGF- β , podría ser la vía por la cual los fibroblastos Thy-1 negativos activen a las células epiteliales en el desarrollo de fibrosis.

CONCLUSIÓN

El proceso de inmortalización no afectó las características de la línea de fibroblastos Thy-1 comparada con la línea nativa, lo cual se comprobó analizando la expresión de distintas moléculas:

Estímulo	Molécula analizada*	Fibroblastos Thy-1 +		Fibroblastos Thy-1 – Nativos		Fibroblastos Thy-1 – Inmortalizados	
		Basal	Estímulo	Basal	Estímulo	Basal	Estímulo
Sin	Thy-1	++++	++++	-	-	-	-
TGF- β	MMP-9	+	+	+++	++++	+++	++++
TGF- β	MMP-2	++	++	+++	++++	+++	++++
TGF- β	Colágena I	++	++++	+	++	+	++
TGF- β / PMA	MMP-1	++	++++	-	-	-	-
TGF- β	MMP-7	++	++++	-	-	-	-
TGF- β	PPAR γ	++++	++	-	-	-	-
TGF- β	α -SMA	++	++++	+	+++	+	++

Tabla 1. Comparación de ambas líneas de fibroblastos Thy-1 negativos nativos e inmortalizados y de fibroblastos Thy-1 positivos.*Donde (-) sin expresión, y (+) baja expresión hasta (++++) expresión muy alta.

En conclusión, existe una posible correlación positiva entre la expresión de Thy-1 y de colágena tipo I en fibroblastos pulmonares de humano y de ratón. La expresión de las gelatinasas podría estar al menos parcialmente regulada por la expresión de Thy-1, a diferencia de la MMP-1 y MMP-7 que están significativamente más expresadas en los fibroblastos Thy-1 positivos, concordando con la literatura, que reporta la ausencia de estas metaloproteasas en los focos de fibroblastos en el pulmón fibrótico de pacientes con

FPI, además la ausencia de PPAR γ corrobora la diferenciación de los fibroblastos Thy-1 negativos a miofibroblastos.

Así como, la ausencia de Thy-1 en los fibroblastos humanos de pulmón favorece en las células epiteliales a partir de las 12 horas de co-cultivo la expresión de MMP's sobrepresadas en el análisis inmunohistoquímico, así como en la firma transcripcional de pulmones de pacientes con FPI comparado con pulmones control, incluyendo a la MMP-7, MMP-1 y MMP-2.

En este contexto, estos resultados muestran que la ausencia de la expresión de Thy-1 en los fibroblastos pulmonares favorece el desarrollo de un fenotipo pro-fibrosante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pizzo A, Kokni K, Vaughn L, Waisner B and Voytik-Harbin. Extracellular matrix (ECM) microstructural composition regulates local cell-ECM biomechanics and fundamental fibroblast behavior: a multidimensional perspective. **J Appl Physiol.**2005, 98:1909-1921.
2. Gordon m y Hahn R. Collagens. **Cell Tissue Res.**2010;31:247-257
3. Frevert C and Sannes P. Matrix proteoglycans as effector molecules for epithelial cell function. **Eur Respir Rev.** 2005.14:137-144.
4. McGowan S. Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair. **The FASEB J.**1992.6:2895-2904.
5. Li, H. The alveolar epithelium and pulmonary fibrosis.**J Epithelial Biol and Pharmacol.**2009, 2:30-35.
6. Selman M, Pardo A. The Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis. In Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders, 4th edition, McGraw-Hill, New York, pp. 371-383, 2008.
7. Olsen AL, Swigris J, Lezotte D, Norris J, Wilson C, Brown K. Mortality from pulmonary fibrosis increased in the United States from 1992 to 2003. **Am J Respir Crit Care Med.** 2007;176:277–84
8. Selman M, Pardo A. The Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis. In **Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders**, 4th edition, McGraw-Hill, New York, pp. 371-383, 2008.
9. Selman M, Rojas M, Mora AL, Pardo A. Aging and interstitial lung diseases: unraveling an old forgotten player in the pathogenesis of lung fibrosis. **Semin Respir Crit Care Med** 2010; 31:607-617.

10. Nuovo G, Hagood J, Magro C, Chin N, Kapil R, Davis L, Marsh CB, Folcik VA. The distribution of immunomodulatory cells in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. **Mod Pathol**. 2012, 25:416-33
11. Selman S, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolution hypothesis about its pathogenesis and implications for therapy. **Ann Intern Med** 2001; 134:136-51.
12. Pardo A and Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. **Int J Biochem Cell Biol** 2002; 34:1534-1538.
13. Selman M, Thannickal V, Pardo A, Zisman D, Martínez F y Lynch J III. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. **Drugs** 2004; 64:405-430.
14. King E, Pardo A y Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. **Seminars** 2011,11: 1-14.
15. García-de-Alba C, Becerril C, Ruiz V, González Y, Reyes S, García-Alvarez J, Selman M, Pardo A. Expression of matrix metalloproteases by fibrocytes: possible role in migration and homing. **Am J Respir Crit Care Med** 2010; 182:1144-1152.
16. Brigham C. Willis, Janice M. Liebler, Katherine Luby-Phelps, Andrew G. Nicholson, Edward D. Crandall, Roland M. du Bois, Zea Borok. Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor- β 1 : Potential Role in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Am J Pathol**. 2005, 166: 1321–1332.
17. Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin J, Ando M, Morel F, Erkinjuntti-Pekkanen R, Muller n, Colby T, Schuyler M, Cormier Y. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. **Am J Respir Crit Care Med**. 2003, 168:952-958.
18. Selman M. Hypersensitivity pneumonitis: a multifaceted deceiving disorder. **Clin Chest Med**. 2004, 25:531-547.
19. Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson S, Wilson K, Aziz N, Kaminski N, Zlotnik A. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. **Am J Respir Crit Care Med**. 2006, 173:188-198.
20. Hirschmann J, Pipavath S y Godwin J. Hypersensitivity pneumonitis: A historical, clinical and radiologic review. **RadioGraphics**. 2009, 29: 1921-1938.
21. Raghu G, Collard H, Egan J, Martinez F, Behr J, Brown K. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence-based

- guidelines for diagnosis and management. **Am J Respir Crit Care Med.** 2011;183: 788–824.
22. Stijn W, Verleden S, Vanaudenaerde B, Marijke W, Christophe D, Jonas Y, Jana S, Verbeken E, Verleden G, Wuyts W. Multiplex protein profiling of bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis. **Ann Thorac Med.** 2013, 8: 38-45.
 23. Sorrell J y Caplan A. Fibroblasts a diverse population at the center of it all. **Int Rev Cell Mol Biol.** 2009; 276:161-214.
 24. Pardo A and Selman M. Matrix Metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. **Proc Am thorac Soc.**2006.3:383-388.
 25. Pardo A and Selman M. Matrix Metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. **Proc Am thorac Soc** 2006; 3:383-388.
 26. Fanjul M, Folgueras A, Cabrera S y López-Otín C. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models **Biochem Biophys Acta** 2009; 1-17.
 27. Pardo A y Selman M. Role of matrix metalloproteases in idiopathic pulmonary fibrosis. **Fibrogenesis Tissue Repair.**2012;5: S9.
 28. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becerril C, Yousem S, Herrera I, Ruiz V, Selman M, Kaminski N. Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. **PLoS Med** 2005; 2(9):e251.
 29. Sorrell M and Caplan A. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **J Cell Sci.**2004,117: 667-675.
 30. Linder D, Zietsch C, Becher M, Schulze K, Schultheiss H-P, Tschöpe C y Westermann D. Differential expression of matrix metalloproteases in Human Fibroblasts with Different origins. **Biochem Res Int.** 2012; 2012: 1-10.
 31. Fries K, Blieden t, Looney R, Sempowski G, Silvera M, Willis R y Phipps R. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulation in Fibrosis. **Clin Immunol Immunopathol.** 1994;72: 283-292.
 32. Desmoulière A, Chaponnier C and Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. **Wound Repair Regen.**2005,13:7-12.
 33. Hinz B, Phan S, Thannickal V, Galli A, Bochaton-Piallat M and Gabbiani G. The myofibroblast one function, multiple origins. **Am J Pathol.**2007,170:1807-1816.

34. Bradley, J. E., Ramirez, G. and Hagood, J. S. Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype. **BioFactors** 2010, 35: 258–265
35. Reif AE and Allen JM. The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissue. **J. Exp. Med** .1964. 120, 413-433.
36. Shan B, Hagood Js, Zhou Y, Nguyen Ht, Macewn M, Morris Gf Laskyja. Thy-1 attenuates tnf-alpha-activated gene expression in mouse embryonic fibroblasts via SRC family Kinase. 2010. **Plos One** Jul 19:5(7) .
37. Kukulansky T, Abramovitch S y Hollander. Cleavage of the Glycosylphosphatidylinositol Anchor Affects the Reactivity of Thy-1 with Antibodies. **J Immunol**. 1999;162: 5993-5997.
38. Saalbach A, Wetzig T, Haustein U y Anderegg U. Detection of human soluble Thy-1 in serum by ELISA: Fibroblasts and activated endothelial cells are a possible source of soluble Thy-1 in serum. **Cell Tissue Res**.1999;298:307-315.
39. Bradley J, Chan J y Hagood j. Effect of the GPI anchor of human Thy-1 on antibody recognition and function. **Lab Invest**. 2013;1-10.
40. Rus e, Giguère V, Hurst J, Agthoven T, Kessel A, Goyert S y grosveld F. Chromosomal localization of the human Thy-1 gene. **Proc Natl Acad Sci**. 1985;5832-5835.
41. Parry PV, Engh JA. CD90 is identified as a marker for cancer stem cells in high grade gliomas using tissue microarrays. 2012. **Neurosurgery** 70:N23-4
42. Hez, Feng M. Activation , isolation, identification and culture of hepatic stem cells from porcine liver tissues. **Cell Prolif**. 2011;6:558-66
43. Hardie W, Glasser S y Hagood J. Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. **Am J pathol**. 2009, 175:3-16.
44. Derdaks, Penney D, Keng P, Felch M, Brown D y Phipps R. Differential collagen and fibronectin production by Thy 1⁺ and Thy 1⁻ lung fibroblast subpopulations. **Am Physiol Soc**. 1992;L283-L290.
45. Hagood J, Prabhakaran P, Kumbla P, Salazar L, MacEwen M, Baker T, Ortiz L, Schoeb T, Siegal G, Alexander B, Pardo A, Selman M. Loss of Fibroblast Thy-1 expression Correlates with Lung Fibrogenesis. **Am J of Pathol** 2005;2.365-379.

46. Rege T, Hagood J. Thy-1 is a regulator of cell-cell and cell interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer and fibrosis. 2006. **FASEB** 20:1045-54.
47. Sanders Y, Kumbla P, Hagood J. Enhanced myofibroblastic differentiation and survival in Thy-1 (-) lung fibroblasts. **Am J Respir cell Mol Biol** 2007;36: 226-325.
48. Bradley J, Ramírez G, Hagood J. Roles and regulation of Thy-1, context-dependent modulator of cell phenotype. **Biofactors** 2009; 35:258-265.
49. Sanders Y, Pardo A, Selman M, Nuovo J, Tollefsbol T, Siegal G y Hagood J. Thy-1 Promoter Hypermethylation: A novel Epigenetic Pathogenic Mechanism in Pulmonary Fibrosis. **Am J Respir Cell Mol Biol** 2008; 39:610-618.
50. Ramírez G, Hagood J, Sanders Y, Ramírez R, Becerril C, Segura L, Barrera L, Selman M, Pardo A. Absence of Thy-1 results in TGF- β induced MMP-9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts. **Lab Invest**. 2011.
51. Bowden D and Adamson I. Fibroblasts interactions with epithelial cells in lung injury and repair. **Monographs on Pathol of Lab Animals**. 1996, 259-265.
52. Selman M and Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder Review. **Respir Res**. 2002,3:1-8.
53. Horowitz J and Thannickal V. epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. **Semin Respir Crit Care Med**. 2006,27:600-612.
54. Chapman H. Epithelial-Mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. **Annu Rev Physiol**. 2011,73: 413-435.
55. American thoracic society: idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. **American thoracic society (ats) and the european respiratory society (ers)**. **Am j respir crit care med**. 2000; 161:646-664.
56. Milam J, Keshamouni, Phan S, Hu B, Gangireddy S, Hogaboam C, Standiford T, Thannickal V y Reddy R. PPAR γ agonists inhibit profibrotic phenotypes in human lung fibroblasts and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 2008;294:L891-L901.
57. Hahn W, Meyerson M. Telomerase activation, cell immortalization and cancer. **Ann Med**. 2001, 33: 123-129.
58. Sung-Ho K, Yong-Suk y Jeong-Chae. Involvement of JNK-AP-1 and ERK-NF κ B signaling in tension-stimulated expression of Type I collagen and MMP-1 in human periodontal ligament fibroblasts. **J Appl Physiol**. 2011, 111:1575-1583.

59. Pardo a, Selman M, Ramírez R, Ramos C, Montaña M, Stricklin G y Raghu G. Production of Collagenase and Tissue inhibitor of Metalloproteinases by Fibroblasts derived from Normal and Fibrotic Human Lungs. **Chest**.1992;102: 1085-1089.
60. Koumas L, Smith T, Feldon S, Blumberg N y Phipps R. Thy-1 Expression in Human Fibroblast Subsets Defines Myofibroblastic or Lipofibroblastic Phenotypes. **Am J Pathol**.2003; 163: 1291-1300.
61. Varisco B, Ambalavanan n, Whitsett J y Hagood J. Thy-1 Signals through PPAR γ to promote lipofibroblast differentiation in the developing lung. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 2012, 46:765-772
62. Yang J, Wheeler S, Velikoff M, Kleaveland K, LaFemina M, Frank J, Chapman H, Christensen P and Kim K. Activated epithelial cells initiate fibrosis through secretion of mesenchymal proteins. **Am J Pathol**.2013; 183 (5).

ÁPENDICE I : ABREVIATURAS UTILIZADAS

°C Grados centígrados

μ l Microlitro

aa amino ácido

Abs Absorbancia

APC Aloficocianina (por sus siglas en inglés)

AR Artritis Reumatoide

CD Cluster de diferenciación

cDNA Ácido desoxirribonucleico complementario

DEPC Dietil-pirocarbonato

DNA Ácido Desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés)

dNTP Desoxirribonucleotidos Trifosfato (por sus siglas en inglés)

EDTA Ácido Etilendiaminotetraacético (por sus siglas en inglés)

FACS Sorteo de células activadas por fluorescencia (por sus siglas en inglés)

FPI Fibrosis Pulmonar Idiopática

IDL Enfermedades Pulmonares Intersticiales (por sus siglas en inglés)

IgA Inmunoglobulina A

IL-17 Interleucina 17

INER Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

MEC Matriz Extracelular

MgCl₂ Cloruro de Magnesio

ml Mililitro

mM Milimolar

MMPs Metaloproteasas de la Matriz (por sus siglas en inglés)

mRNA Mensajero del Ácido Ribonucleico

NaN₃ Azida de sodio

NEM N-Etilmaleimida

ng Nanogramos

nm Nanometros

PBS Buffer de Fosfatos (por sus siglas en inglés)

PBS-T Buffer de Fosfatos con Tween 20 (por sus siglas en inglés)

PCR Reacciones en cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés)

PDGF Factor de crecimiento Derivado de Plaquetas (por sus siglas en inglés)

PMA Forbol 12-Miristato 13-Acetato (por sus siglas en inglés)

PMSF Fluoruro Fenilmetilsulfonil (por sus siglas en inglés)

PPAR γ Receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas (por sus siglas en inglés)

RNA Ácido Ribonucleico

rpm Revoluciones por Minuto

RT-PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Reversa

SFB Suero Fetal Bovino

TEM Transición Epitelio-Mesénquima

TGF- β Factor de Crecimiento Transformante β

TNF α Factor de Necrosis Tumoral α (por sus siglas en inglés)

α -SMA α -actina de músculo liso (por sus siglas en inglés)