



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“Análisis del efecto del inductor de autofagia resveratrol,  
en la fibrosis pulmonar experimental inducida por  
bleomicina en ratones (*Mus musculus* CEPA C57BL6)”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**MARIANA MACIEL HERRERÍAS**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MA. SANDRA CABRERA BENÍTEZ**

**2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1. Datos del alumno

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Teléfono

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Carrera

Número de cuenta

### 1. Datos del alumno

Maciel

Herrerías

Mariana

55 33 40 98 71

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Biología

307204947

### 2. Datos del tutor

Grado

Nombre(s)

Apellido paterno

Apellido materno

### 2. Datos del tutor

Dra

María Sandra

Cabrera

Benítez

### 3. Datos del sinodal 1

Grado

Nombre(s)

Apellido paterno

Apellido materno

### 3. Datos del sinodal 1

Dr

José Luis

Arreola

Ramírez

### 4. Datos del sinodal 2

Grado

Nombre(s)

Apellido paterno

Apellido materno

### 4. Datos del sinodal 2

Dr

René de Jesús

Cárdenas

Vázquez

### 5. Datos del sinodal 3

Grado

Nombre(s)

Apellido paterno

Apellido materno

### 5. Datos del sinodal 3

Dr

José Guadalupe

Cisneros

Lira

### 6. Datos del sinodal 4

Grado

Nombre(s)

Apellido paterno

Apellido materno

### 6. Datos del sinodal 4

Dr

Jorge Antonio

García

Álvarez

### 7. Datos del trabajo escrito.

Título

Subtítulo

Número de páginas

Año

### 7. Datos del trabajo escrito.

“Análisis del efecto del inductor de autofagia resveratrol, en la fibrosis pulmonar experimental inducida por bleomicina en ratones (Mus musculus cepa C57BL6)”

70 p

2014





## RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por haberme brindado la oportunidad de tener una educación de calidad y formarme dentro de sus instalaciones. Me siento orgullosa de pertenecer a esta institución.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), al laboratorio de biología molecular, al personal del bioterio y al encargado de éste último, el Dr. Alberto Pizaña por la asistencia en el cuidado, reproducción y mantenimiento así como las facilidades brindadas para la realización de mis experimentos con los ratones.

Al patólogo del INER, Dr. Miguel Gaxiola, quién realizó todas las evaluaciones histológicas presentadas en este trabajo.

A mis profesores de taller: Dra. Annie Pardo Cemo, Dr. Moisés Selman Lama, M. en C. Remedios Ramírez Rangel y Dr. Jorge Antonio García Álvarez.

Al laboratorio de bioquímica de la Facultad de Ciencias en el cual realicé todos mis experimentos

A la Dra. Sandra Cabrera Benítez por sus enseñanzas y paciencia durante todo este tiempo.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento de la beca incluida en el proyecto **IA202613-2** *Evaluación del papel de la autofagia y la proteasa Autofagina 1 en el desarrollo de fibrosis pulmonar.*

A mis sinodales, por su disposición, observaciones y críticas para la mejora de mi tesis:

Dr. José Luis Arreola Ramírez

Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez

Dr. Jorge Antonio García Álvarez

Dr. José Guadalupe Cisneros

## AGRADECIMIENTOS

Al eje de mi vida, a la razón por la que he salido adelante y la persona que a pesar de todo sé que jamás me dejará sola, a mi mamá, por ser más que una guerrera, porque en los peores momentos ella jamás dejó a sus hijas, y a pesar de todo lo que pasaba a nuestro alrededor ella nunca dejó de enseñarnos a ser felices, a ser mejores personas cada día, a superarnos, ella me ha enseñado levantarme, a ser fuerte siempre y a entender que yo puedo hacer todo lo que me proponga. Gracias por todas esas risas, esos regaños, esas exigencias que me hicieron lo que soy ahorita, sin ti no hubiera podido salir adelante, gracias por no darte por vencida conmigo ni con nadie, fuiste mamá y papá a la vez, tu nos supiste educar, orientar y darnos todo lo que necesitábamos sin necesidad de nadie más. Gracias por ser mi mamá pero también mi amiga, cada paso que he dado siempre has estado conmigo, eres el amor de mi vida, y doy gracias a la vida por haberme dado una madre como tú.

A Beymar, por haber llegado a nuestras vidas, porque el también nos ha enseñado muchas cosas, por ayudarme y apoyarme siempre que lo necesité, por darme un consejo o una palabra que por pequeños que fueran, causaban un gran impacto en mí. Eres y serás como un padre para mí. Gracias por estar siempre con nosotras, te quiero mucho.

A mi hermana Jazmín, porque siempre has parecido la hermana mayor, eres un gran ejemplo para mí, gracias por estar siempre ahí, por esa complicidad que hay entre nosotros, me has enseñado que nada se compara con el amor que hay entre hermanos, eres y serás parte esencial de mi vida, gracias por haberme dado a la sobrina más hermosa que me ha cambiado la vida y me ha sacado tantas sonrisas.

A la Dra. Sandra Cabrera, porque desde el primer día que empecé a trabajar con ella me sentí muy afortunada por estar con una excelente tutora como ella, gracias por todo lo que me ha enseñado, por sus exigencias, su enorme paciencia y apoyo, pero sobretodo porque nunca dejó de confiar en mí y gracias a ella he llegado a donde ahora estoy.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Fabián y Teresa por esos momentos tan divertidos que hemos pasado dentro y fuera del laboratorio.

A todos mis amigos porque formaron parte de una de las mejores etapas de mi vida, porque me han enseñado el verdadero valor y significado de la amistad, por todas esas risas, viajes, momentos buenos y malos que hemos compartido juntos, y sé que seguiremos haciéndolo, gracias por formar parte de mi vida.

## ÍNDICE

---

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS.....      | 1  |
| RESUMEN.....                | 3  |
| ANTECEDENTES.....           | 4  |
| INTRODUCCIÓN.....           | 5  |
| JUSTIFICACIÓN.....          | 32 |
| HIPÓTESIS.....              | 32 |
| OBJETIVO GENERAL.....       | 33 |
| OBJETIVOS PARTICULARES..... | 33 |
| MATERIAL Y MÉTODOS.....     | 34 |
| RESULTADOS.....             | 40 |
| DISCUSIÓN.....              | 58 |
| CONCLUSIÓN.....             | 62 |
| REFERENCIAS .....           | 64 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

**Figura 1.** Formación de los autofagosomas.

**Figura 2.** Autofagia y estrés.

**Figura 3.** Autofagia y apoptosis.

**Figura 4.** Diversos moduladores de la autofagia.

**Figura 5.** Inducción de la autofagia por rapamicina.

**Figura 6.** Mecanismo por el cual la espermidina prolonga la vida en levaduras.

**Figura 7.** Modo de acción hipotético del resveratrol y la espermidina como inductores de la autofagia.

**Figura 8.** Modelos de acción del resveratrol.

**Figura 9.** Modelo experimental de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

**Figura 10.** Grupos experimentales.

**Figura 11.** Imágenes representativas de pulmones de ratones control obtenidos a los 28 días.

**Figura 12.** Imágenes representativas de pulmones de ratones control obtenidos a los 28 días.

**Figura 13.** Imágenes representativas de pulmones obtenidos a los 28 días post-instilación.

**Figura 14.** Imágenes representativas de pulmones obtenidos a los 28 días post-instilación.

**Figura 15.** Evaluación de los parámetros histológicos.

**Figura 16.** Análisis del *índice de fibrosis*.

**Figura 17.** Niveles de hidroxiprolina pulmonar.

**Figura 18.** Imágenes representativas de pulmones obtenidos a los 28 días post-instilación.

**Figura 19.** Imágenes representativas de pulmones obtenidos a los 28 días post-instilación.

**Figura 20.** Evaluación de los parámetros histológicos.

**Figura 21.** Análisis del *índice de fibrosis*.

**Figura 22.** Niveles de hidroxiprolina pulmonar.

**Figura 23.** Conversión de LC3-I a LC3-II.

**Figura 24.** Análisis del flujo autofágico grupos control + vehículo y control + resveratrol.

**Figura 25.** Análisis del flujo autofágico experimento 1. LC3.

**Figura 26.** Análisis del flujo autofágico experimento 2. LC3.

---

## ÍNDICE DE TABLAS

---

**Tabla 1.** Proteínas involucradas en la formación de los autofagosomas en mamíferos.

## RESUMEN

---

La autofagia es un proceso de degradación intracelular y juega un papel crucial en el control de calidad de proteínas y organelos, así como en la homeostasis de la energía necesaria para las funciones celulares. La autofagia ha sido implicada en diversas patologías como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas e infecciosas. Recientemente, los estudios sobre autofagia se han enfocado en la alteración que existe de este proceso en las patologías pulmonares. Se ha demostrado que la actividad autofágica está disminuida en el pulmón de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI). La Fibrosis Pulmonar Idiopática es una enfermedad de etiología desconocida caracterizada por la acumulación excesiva de moléculas de la matriz extracelular principalmente colágenas fibrilares. Por otro lado, el uso de inductores de autofagia se ha utilizado como terapia en diversas patologías asociadas con una deficiencia en autofagia. En este trabajo se evaluó el efecto del inductor de autofagia resveratrol, en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratón. Observamos que aquellos ratones a los cuales se les administró resveratrol a partir del día 0, mostraban una disminución significativa en los niveles de hidroxiprolina en el pulmón así como una menor extensión del daño pulmonar inducido por la instilación con bleomicina. Por otro lado, los ratones instilados con bleomicina y tratados con resveratrol a partir del día 14 mostraron una disminución significativa en el porcentaje de fibrosis, pero no se encontraron diferencias en el contenido de hidroxiprolina. Así mismo se encontró que el resveratrol a una concentración de 10 $\mu$ M indujo la conversión de la proteína LC3-II, mostrando con ello un aumento en el flujo autofágico en el pulmón. La inducción de la autofagia por medio del resveratrol podría tener un papel protector durante la patogénesis de esta enfermedad.

## ANTECEDENTES

---

La fibrosis pulmonar es el resultado final de un grupo heterogéneo de padecimientos respiratorios, agrupados bajo el término de Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas (EPID). La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) representa la entidad más común y agresiva de las EPID; es una enfermedad crónica, progresiva y letal, de etiología desconocida (King, Pardo, & Selman, 2011; Pardo & Selman, 2002; Selman & Pardo, 2002, 2006). La FPI es caracterizada por un depósito excesivo de los componentes de la matriz extracelular (MEC), principalmente, colágenas fibrilares tipo I y III. Actualmente el trasplante pulmonar es el único tratamiento efectivo para alargar la vida y mejorar el estado funcional pulmonar de los pacientes que padecen esta enfermedad. Sin embargo, los pacientes transplantados tienen una expectativa de vida limitada.

Estudios recientes han sugerido que la FPI es una enfermedad desarrollada por daño epitelial crónico y por la activación progresiva de procesos de cicatrización/ fibrosis. Por lo tanto, las estrategias terapéuticas contra la Fibrosis Pulmonar Idiopática, tendrán que estar dirigidas hacia la prevención del daño epitelial, así como el uso de agentes antifibróticos, en substitución de corticoesteroides e inmunosupresores, cuya efectividad demostrada, ha sido baja o casi nula (Pardo & Selman, 2002).

En este proyecto de investigación, se propone analizar el efecto del inductor de autofagia resveratrol *in vivo*, en un modelo experimental de fibrosis pulmonar, ya que se han hecho diversos estudios con este polifenol mostrando efectos benéficos y protectores en enfermedades cardiovasculares, metabólicas y cáncer. Así mismo se ha sugerido que el resveratrol actúa como un agente profiláctico ya que se ha recomendado una ingesta diaria de 350ml de vino (principal compuesto donde se encuentra el resveratrol) para que este polifenol pueda prevenir el desarrollo de diversas patologías (Baur & Sinclair, 2006).

## INTRODUCCION

---

### AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso de degradación intracelular, caracterizado por la formación de vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas, estas vesículas secuestran material citoplásmico, lo dirigen y liberan a los lisosomas, formando una estructura denominada autofagolisosoma, en donde se da la degradación del material citoplásmico invaginado. La autofagia juega un papel crucial en el control de calidad de proteínas y organelos, eliminando aquellos organelos dañados, p.ej mitocondrias, proteínas de larga vida y biomoléculas oxidadas. Los aminoácidos y moléculas pequeñas que son generadas por autofagia, son devueltos al citoplasma para su reciclaje y para la generación de energía (Mizushima & Komatsu, 2011).

La autofagia es un proceso genéticamente regulado y conservado evolutivamente desde levaduras hasta mamíferos. La ejecución de la autofagia involucra a un conjunto de genes conservados evolutivamente, conocidos como proteínas Atg, que son requeridas para la formación de la membrana de aislamiento y el autofagosoma. Niveles basales de autofagia son necesarios para la homeostasis celular. La autofagia juega un papel crucial en la supervivencia celular frente a diversos tipos de estrés como la privación de nutrientes y factores de crecimiento, la acumulación de agregados de proteínas y durante el estrés del retículo endoplásmico. En este contexto, la supresión de la autofagia ha sido asociada frecuentemente con patologías como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes y enfermedades crónico-degenerativas (Levine & Kroemer, 2008)

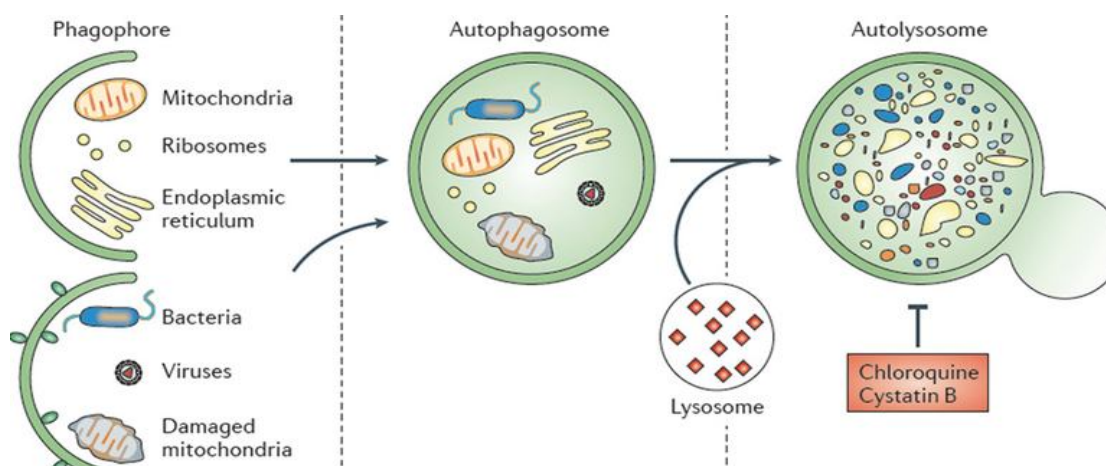
El inductor de autofagia mejor caracterizado es la privación de nutrientes, tanto en células en cultivo, como en organismos completos. Además del estrés metabólico, ha sido demostrado que la autofagia es inducida por diversos tipos de estrés citotóxico como la deficiencia de energía, hipoxia, estrés del retículo endoplásmico, daño mitocondrial alta temperatura, estimulación hormonal y agentes farmacológicos (Wong & Cuervo, 2010)

#### ***Formación de los autofagosomas***

Después de la inducción de la autofagia, la formación de los autofagosomas se divide en tres etapas: La *Iniciación*, en la cual se da lugar a la formación de la membrana de aislamiento o fagóforo, la cual puede derivarse a partir del retículo endoplásmico, el



aparato de Golgi, la mitocondria o la membrana plasmática (Tooze & Yoshimori, 2010). En la etapa de *Elongación*, el fagóforo comienza a reconocer y secuestrar organelos dañados, proteínas mal plegadas o de larga vida, y se va alargando hasta cerrarse por completo y formar una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma (etapa de *Maduración*). Finalmente, el autofagosoma se fusionará posteriormente con el lisosoma dando lugar a los autolisosomas, dentro de los cuales existen hidrolasas lisosomales como catepsinas y lipasas que son capaces de degradar todo el contenido que se encuentra dentro de estas vesículas permitiendo de esta manera reciclar aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos (Fig. 1) (Itakura & Mizushima, 2011).



**Fig. 1. Formación de los autofagosomas.** Se divide en 3 etapas: a) iniciación en la que se forma la membrana de aislamiento o fagóforo, b) elongación o expansión del fagóforo y cierre total de la doble membrana para formar el autofagosoma, c) maduración de los autofagosomas para fusionarse con el lisosoma y generar un autolisosoma en el que enzimas lisosomales llevarán a cabo la degradación del material (Rubinsztein, Codogno, & Levine, 2012).

Gracias a los trabajos que se han realizado en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se han descubierto alrededor de 35 genes involucrados en la autofagia, los cuales están bien conservados desde las levaduras hasta los mamíferos (Mariño & López-Otín, 2004). Estos descubrimientos han podido brindar la información necesaria sobre todos los efectores o proteínas que participan en este proceso.

Hay distintos complejos o vías de señalización que participan en la iniciación de la autofagia, en la maduración de los autofagosomas, en la unión de éstos con los lisosomas y finalmente en la degradación de las vesículas. El complejo Atg1-ULK1 (que incluye a las proteínas ULK1, Atg13, FIP200 y ATG101) juega un papel importante en la inducción de la autofagia, actuando río abajo del complejo mTOR (mTORC1). Cuando mTOR es inhibido por diversos factores como deficiencia de nutrientes, factores de crecimiento, oxígeno y energía, este complejo se disocia del complejo ULK, dando lugar a una desfosforilación de residuos específicos de la cinasa ULK1 y Atg13, (los cuales están

fosforilados por mTOR), permitiendo de esta manera la activación del complejo Atg1-ULK1 (Kroemer, Mariño, & Levine, 2010; Mizushima & Komatsu, 2011). La abundancia de nutrientes, incluyendo factores de crecimiento, glucosa y aminoácidos activan a mTOR y por tanto la autofagia esta inhibida. La depleción de nutrientes inhibe a mTOR permitiendo la activación de la autofagia.

Otro complejo involucrado en la formación de los autofagosomas en mamíferos incluye a las proteínas Beclin 1, Vps15 y Vps34. Durante condiciones ricas en nutrientes, Beclin 1 está asociado a Bcl 2. Tras la inducción de la autofagia, Bcl 2 es fosforilado por JNK1 permitiendo así la liberación de Beclin 1 para que pueda integrarse al complejo PI3K (Kroemer, Mariño y Levine, 2010). Este complejo multiproteico activa a la clase III de PI3K para generar fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P). PI3K es una cinasa lipídica que fosforila al fosfatidilinositol (PI) en la posición 3' del anillo de inositol para generar PI3P el cual es esencial para la formación y maduración de los autofagosomas (Wu et al., 2010).

Durante el proceso de elongación y maduración de los autofagosomas, participan dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina, el primero es el sistema ATG-12-ATG5 el cual requiere la participación de las enzimas ATG7 y ATG10 para formar un dímero con ATG16L1 (Levine, Mizushima, & Virgin, 2011). El segundo es el sistema Atg8-fosfatidiletanoalmina (PE), que tiene diversos ortólogos en mamíferos como LC3, LC3A, LC3B, GABARAP, GABARAPL, GATE16, y AT8L. Atg8 es sintetizada como proAtg8, el cual sufre un corte proteolítico en el carboxilo terminal por la cisteín proteínasa Atg4 para exponer un residuo de glicina. Posteriormente, Atg7 y Atg3 participarán en la conjugación de Atg8 con la PE para formar Atg8-PE (Nair et al., 2012). Atg8-PE se localiza en el fagóforo así como en los autofagosomas, por lo que es utilizado como biomarcador para monitorear el flujo autofágico.

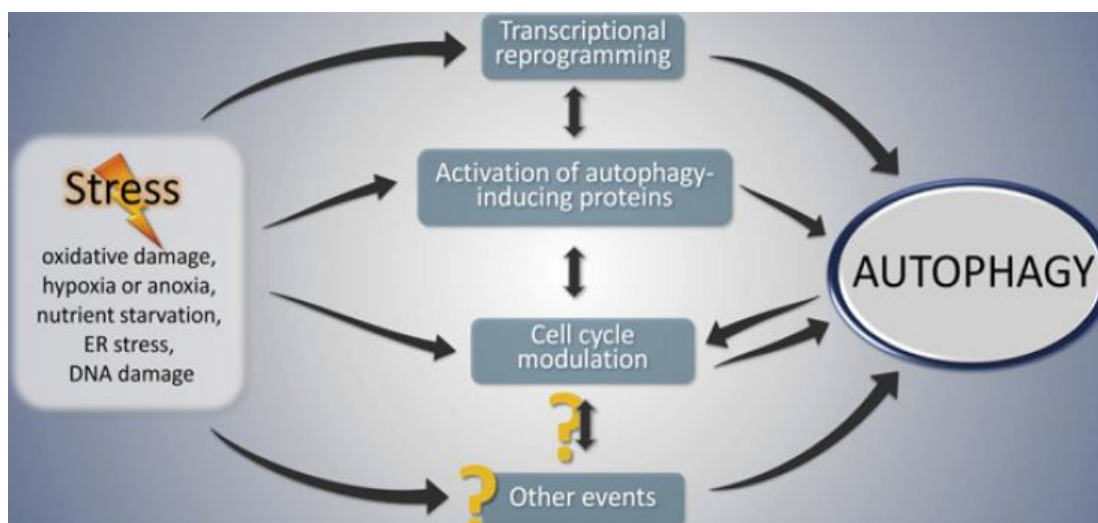
En la última etapa de la autofagia, ocurre la maduración y la degradación de los autofagosomas, lo que involucra la fusión de los mismos con el lisosoma para formar el autolisosoma y de esta manera degradar todo el contenido. Dentro de los autolisosomas se da un ambiente ácido, el cual es esencial para que las enzimas hidrolíticas puedan llevar a cabo su función catalítica. Para que ocurra la fusión, se requiere una serie de moléculas como son Rab7, proteínas ESCRT y SNARES así como los microtúbulos, los cuales en conjunto actuarán para que la membrana externa del autofagosoma se fusione con los lisosomas. En los autolisosomas hidrolasas lisosomales como catepsinas y lipasas llevarán a cabo la degradación del contenido intra-autofagosomal (Zhou et al., 2013). A continuación a manera de resumen, se muestran algunas de las proteínas involucradas en la formación de los autofagosomas:

**Tabla 1. Proteínas involucradas en la formación de los autofagosomas en mamíferos.**

| COMPLEJO PROTEICO   | PROTEÍNAS PARTICIPANTES                             | FUNCIÓN EN LA AUTOFAGIA   |
|---|---|---|
| <b>INICIACIÓN</b>   |   |   |
| <b>ATG1-ULK1</b>  | ULK1<br>ATG13<br>FIP200<br>ATG101                   | Este complejo se encuentra fosforilado por mTOR cuando hay un ambiente rico en nutrientes. FIP200 y ATG13 están fosforilados por ULK1. Al inducirse la autofagia, este complejo se transloca hacia el retículo endoplásmico para comenzar la formación de la membrana de aislamiento. |
| <b>PI3K</b>   | Beclin1<br>Vps15<br>Vps34                           | La formación de PI3P por este complejo multiproteico es crucial para la formación de la membrana de aislamiento o fagóforo.   |
| <b>ELONGACIÓN</b>   |   |   |
| <b>Sistema de conjugación tipo ubiquitina ATG-12-ATG5</b> | ATG-12<br>ATG5<br>ATG16L1<br>AT7<br>ATG10           | Formación de un dímero entre ATG12-ATG5 y ATG16L1 es importante para la formación de enlaces covalentes y posterior conjugación entre LC3 y PE.   |
| <b>Sistema de conjugación tipo ubiquitina ATG8</b>        | ATG8 (LC3, GATE16, GABARAP)<br>ATG4<br>ATG7<br>ATG3 | La conjugación de LC3-PE es necesaria para la formación del fagóforo, la elongación y su posterior cierre. LC3 se encuentra en la membrana interna y externa de los autofagosomas.  |
| <b>MADURACIÓN</b>   |   |   |
|   | Rab7<br>SNARES<br>Microtubulos                      | Las proteínas SNARES, Rab7 y los microtúbulos actuarán en conjunto para regular la correcta y eficiente fusión de los autofagosomas con los lisosomas y de este modo formar los autolisosomas.  |

## INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA POR DISTINTOS TIPOS DE ESTRÉS CELULAR.

La autofagia es inducida por una variedad de estímulos de estrés, incluyendo el estrés de nutrientes y de energía, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y daño asociado a patrones moleculares, así como la hipoxia y anoxia, estrés oxidativo, y daño mitocondrial. La inducción de la autofagia por estos estímulos involucra distintas señales que además de participar en la autofagia también participan en el control de otras respuestas de la célula frente al estrés (fig. 2) (Kroemer, Mariño, & Levine, 2010).



**Fig. 2. Autofagia y estrés.** Diversos estímulos de estrés como el daño oxidativo, hipoxia, anoxia, deficiencia de nutrientes, estrés de retículo endoplásmico y daño al DNA pueden activar la autofagia como una respuesta de la célula para restaurar la homeostasis celular (Kroemer et al., 2010).

### ***Autofagia y estrés de retículo endoplásmico***

El Retículo endoplásmico (RE) no sólo está implicado en la síntesis de proteínas y su maduración (incluyendo un plegamiento correcto), sino también puede constituir una importante fuente de la membrana de aislamiento del autofagosoma. Alteraciones en la homeostasis del RE interrumpen la maquinaria de plegamiento de proteínas y se da como resultado una acumulación de proteínas no plegadas en el lumen del RE, activando de este modo la respuesta UPR (*Unfolded Protein Response* por sus siglas en inglés), ésta respuesta es la principal vía de estrés del RE y por tanto un potente estímulo de la autofagia (Kroemer, Mariño, & Levine, 2010)

Al inducirse la autofagia durante el estrés de RE, se da una respuesta esencial a favor de la supervivencia celular, ya que es necesario la eliminación de proteínas mal

plegadas, así como agregados de las mismas, para restablecer la homeostasis del RE. La respuesta UPR atenúa la síntesis de proteínas y restaura la homeostasis celular a través de la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de genes que codifican para chaperonas, componentes asociados para la degradación del RE, así como un aumento en la transcripción de genes relacionados con la autofagia (Deegan, Saveljeva, Gorman, & Samali, 2013).

### ***Hipoxia y Anoxia***

La hipoxia y la anoxia (con concentraciones de oxígeno menores al 3% y menores al 0,1%, respectivamente) inducen la autofagia a través de diferentes mecanismos. La autofagia inducida por hipoxia depende del factor inducible por hipoxia, HIF (*Hypoxia-inducible factor*), mientras que la autofagia inducida por anoxia es independiente de HIF. HIF es un heterodímero con una subunidad  $\beta$  y una subunidad  $\alpha$  reguladas por oxígeno. Estas subunidades se expresan cuando la concentración de oxígeno disminuye por debajo del umbral de 5%. Después de la hipoxia, HIF activa la transcripción de BNIP3 y BNIP3L, dos proteínas que pueden romper la interacción inhibitoria entre Beclin 1 y Bcl-2 y por tanto inducir autofagia. La hipoxia incrementa la transcripción de genes clave que participan en la autofagia como LC3 y ATG5 (Kroemer, Mariño, & Levine, 2010)

### ***Estrés oxidativo***

El estrés oxidativo induce autofagia a través de múltiples mecanismos. El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) exógeno puede activar y estimular la fosforilación de proteínas involucradas en la regulación transcripcional de otras proteínas que participan en la autofagia como LC3 y ATG5. Además, las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden regular la autofagia mediante el control de la actividad de la cisteín proteasa Atg4, la cual es un objetivo directo de la oxidación por  $H_2O_2$ , con lo que se promueve la lipidación de LC3 y por tanto un aumento en el flujo autofágico (Gibson, 2013; Kroemer et al., 2010).

### ***Daño mitocondrial***

Las células deben eliminar a las mitocondrias dañadas para evitar la acumulación de ROS. Este proceso de control de la calidad mitocondrial es mediado por la mitofagia, la cual significa la eliminación selectiva de las mitocondrias por medio de la autofagia. El control de la calidad mitocondrial juega un papel importante en la prevención del envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas, y otras patologías (Kroemer, Mariño, & Levine, 2010) Las mitocondrias generan ROS a partir de diferentes mecanismos como son la cadena respiratoria y otras vías metabólicas. El oxígeno generado en las

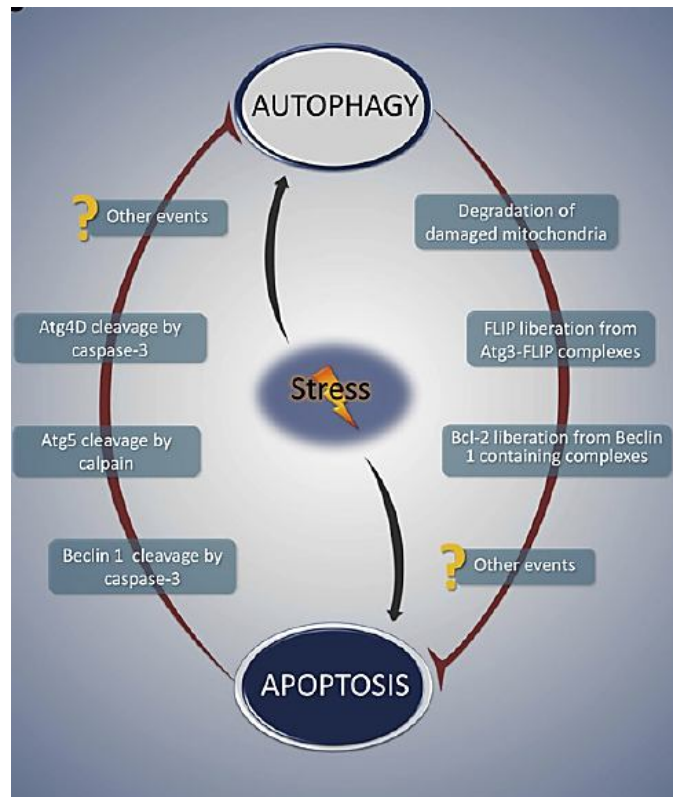
mitocondrias produce ROS al convertirse en peróxido de hidrógeno, a niveles altos de ROS, las proteínas mitocondriales son susceptibles a sufrir daños a causa de la concentración de lípidos y proteínas oxidables los cuales pueden aumentar el daño oxidativo. Por lo que la autofagia es esencial para regular la eliminación de las proteínas defectuosas generadas por ROS y para la eliminación de la mitocondria (Lee, Giordano, & Zhang, 2012).

En respuesta al estrés o daño, las membranas mitocondriales se permeabilizan a través de distintas rutas bioquímicas. La permeabilización de la membrana mitocondrial constituye una de las características de la muerte celular apoptótica o necrótica. Sin embargo, algunas veces sólo una fracción de las mitocondrias se permeabilizan, por lo que la eliminación de las mitocondrias dañadas por medio de la autofagia puede rescatar la célula de la muerte celular programada (Kroemer, Mariño, & Levine, 2010)

### **AUTOFAGIA Y APOPTOSIS.**

La apoptosis es una parte esencial de la vida de los organismos multicelulares que juega un papel importante en el desarrollo y en la homeostasis de los tejidos. La apoptosis está regulada y equilibrada dentro de un contexto fisiológico. Fallas en la regulación de la apoptosis, implica condiciones patológicas tales como defectos en el desarrollo, enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas o cáncer. Las características de la apoptosis incluyen la formación de burbujas en la membrana celular, contracción celular, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN, y por último la llegada de macrófagos o células vecinas, para evitar de este modo una respuesta inflamatoria en los tejidos. La apoptosis es distinta de la necrosis ya que las células sufren un daño mayor, lo que lleva a una pérdida de integridad de la membrana, hinchazón y ruptura de las células. Durante la necrosis, los contenidos celulares se liberan en el medio extracelular lo que da como resultado un daño hacia las células circundantes y una respuesta inflamatoria en los tejidos (Jin & El-deiry, 2005).

La activación de la autofagia puede representar un intento de la célula para mitigar el estrés y no “recurrir” a la apoptosis. Si el estrés se soluciona, las células suelen restaurar la autofagia a los niveles basales y volver a su estado inicial. Sin embargo, si el estrés persiste, la autofagia ya no es una opción para la supervivencia celular, por lo que las células responden mediante la activación de la apoptosis con el fin de asegurar una controlada y eficiente eliminación de la célula, sin provocar inflamación local (fig. 3).



**Fig. 3. Autofagia y apoptosis.** La activación de la autofagia representa un intento de la célula para mitigar el estrés celular y no recurrir a la muerte celular. La respuesta autofágica es una vía citoprotectiva para eliminar estímulos proapoptóticos tal como la mitocondria dañada (Kroemer et al., 2010).

Recientemente se ha tratado de elucidar el papel que existe entre la autofagia y la apoptosis. En hepatocitos humanos expuestos a estrés oxidativo, se incrementaron los niveles de ROS, autofagia y apoptosis, sin embargo al inhibir la autofagia, el potencial de membrana mitocondrial disminuyó y los niveles de apoptosis aumentaron significativamente. En este mismo estudio se observó que hepatocitos extraídos de hígados que fueron tratados previamente con quimioterapia, mostraban niveles constantes de autofagia por lo que al someterlos al estrés oxidativo mostraban una mayor resistencia a la muerte celular, mientras que aquellos hepatocitos que fueron aislados de pacientes alcohólicos no mostraban una respuesta autofágica durante el estrés oxidativo, lo que probablemente reflejaba un extenso daño a los tejidos. Por otro lado en hepatocitos provenientes de pacientes sanos o con cirrosis biliar mostraron una respuesta autofágica similar a la acumulación de ROS, por lo que las variaciones en la acumulación de ROS en hepatocitos humanos se correlacionan con los niveles de autofagia, lo que sugiere implicaciones importantes de la autofagia en las patogénesis del hígado. Este estudio propone que las ROS activarían la vía PI3K lo cual posteriormente desencadenaría la activación de toda la maquinaria de la autofagia, con lo que se sugiere que la inducción de

la autofagia en hepatocitos humanos, durante el estrés oxidativo, es un mecanismo que juega un papel protector y esencial para la supervivencia de las células (Bhogal, Weston, Curbishley, Adams, & Afford, 2012).

Por otro lado, Zou & Xie (2013) investigaron la interacción entre la autofagia y la apoptosis en la cardiomiopatía diabética, ya que en la diabetes los cardiomiocitos presentan apoptosis, lo que da lugar a una disminución en la masa cardiomuscular, fibrosis intersticial y un decremento en la función cardiaca. La inducción de la autofagia en cardiomiocitos de ratón, sugiere que este proceso tiene un papel protector contra la apoptosis de las células, la pérdida estructural cardiaca y el daño funcional inducido por la diabetes.

La conectividad entre la autofagia y apoptosis se manifiesta en un equilibrio entre la vida y la muerte en respuesta al estrés celular. Una relación entre la autofagia y la apoptosis le puede conferir una ventaja evolutiva a las células, permitiendo un mayor control y una respuesta precisa ante una señal de estrés (Rubinstein & Kimchi, 2012).

Aunque la autofagia y la apoptosis representen dos procesos celulares distintos y con diferencias bioquímicas todo parece indicar que hay una conexión entre las proteínas que regulan y ejecutan ambos procesos (Rubinstein & Kimchi, 2012).

## **AUTOFAGIA Y SU ALTERACION EN PATOLOGIAS PULMONARES.**

Debido a que en el pulmón se presentan diversos procesos como el intercambio de gases, así como la inspiración de diversas partículas provenientes del ambiente, se genera un ambiente que causa daño al tejido pulmonar, por lo que, debido al daño externo que recibe, aunado con la predisposición genética de cada individuo, el pulmón emplea diversos mecanismos para mantener su homeostasis, entre ellos la autofagia, la cual ha tomado gran importancia debido al papel que juega en la patogénesis de las enfermedades pulmonares como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), fibrosis quística, asma, enfisema, cáncer, enfermedades infecciosas y fibrosis pulmonar idiopática (Ryter, Nakahira, Haspel, & Choi, 2012).

### ***Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)***

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se caracteriza por una destrucción de los alveolos, obstrucción bronquial, daño a las células epiteliales de los espacios aéreos, inflamación crónica (bronquitis), enfisema pulmonar, y por tanto una limitación en el flujo aéreo (Ryter et al., 2012). La EPOC es causada principalmente por



los efectos del humo del cigarro el cual contiene más de 4000 sustancias tóxicas que incrementan la respuesta inflamatoria y las ROS en respuesta al daño. En nuestro país, la EPOC ocupa el cuarto lugar en mortalidad anual, siendo más frecuente la enfermedad en personas mayores de 45 años. La EPOC es una de las enfermedades más estudiadas en el contexto de la autofagia, sin embargo existe controversia de su papel en esta enfermedad.

Estudios recientes, han mostrado que la autofagia puede estar jugando un papel importante en la patogénesis de esta enfermedad, ya que se ha observado gran cantidad de autofagosomas, una alta expresión de la proteína LC3B-II, así como un incremento en la expresión de marcadores autofágicos tales como ATG5, ATG7 y ATG12 en tejidos de pulmón de pacientes con EPOC. En modelos *in vitro* con células epiteliales y fibroblastos, se ha mostrado que la exposición crónica al extracto del humo de cigarro, induce la autofagia, ya que se observa acumulación de autofagosomas y altos niveles de expresión en la proteína LC3B-II, resultados similares a los observados en los tejidos de pulmón (Z. Chen et al., 2010). La autofagia, en especial la proteína LC3B-II puede tener un rol importante en la apoptosis de células epiteliales, a través de la interacción con proteínas como FAS y caveolina-1, sugiriendo con esto funciones proapópticas de la autofagia, y por tanto teniendo una participación importante en el desarrollo de la EPOC (Z.-H. Chen et al., 2008).

Sin embargo, Fujii et al (2012), observaron acumulación de p62, proteínas ubiquitinadas, así como una disminución de LC3-II en extractos de pulmón provenientes de pacientes con EPOC, sugiriendo con esto una insuficiencia de la autofagia, y que si bien el extracto de humo de cigarro induce la activación de la autofagia en células bronquiales epiteliales, ésta parece ser transitoria e insuficiente y probablemente podría estar ligada a la senescencia celular asociada al humo de tabaco. Por tanto, la autofagia y la senescencia celular tendrían una participación muy importante en la patogénesis de la EPOC (Fujii et al., 2012).

### ***Fibrosis quística***

La fibrosis quística es causada por mutaciones en el gen CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* por sus siglas en inglés) que codifica para un canal de cloruro regulado por AMPc, el cual se localiza principalmente en la membrana apical de las células epiteliales. Esta mutación da como resultado agregados proteicos que se localizan en el retículo endoplásmico. Al no llegar a la membrana plasmática, estos agregados son degradados prematuramente provocando así inflamación local, aumento

de la susceptibilidad a las infecciones bacterianas respiratorias, sobreproducción de ROS, insuficiencia crónica pulmonar y digestiva, así como un fenotipo proinflamatorio en las vías respiratorias con activación constitutiva de NFκB (Vilella et al., 2013). En el epitelio alveolar humano y de ratón se encontró que hay deficiencia de la autofagia al observarse pocos autofagosomas, así como un defecto en la despolarización de la membrana mitocondrial, acumulación de p62 y una disminución en la expresión de varios genes de la autofagia. De igual manera, el complejo Vps34, que incluye a la proteína Beclin1, se encuentra secuestrado en agregados proteicos lo que resulta en una inhibición de la autofagia. La activación de la autofagia con fármacos como la cistamina disminuye la inflamación crónica en el pulmón. Al investigar el posible efecto protector que podría tener la autofagia en la patogénesis de la fibrosis quística, se abren posibilidades para el desarrollo de agentes terapéuticos que restauren la autofagia en esta enfermedad (Luciani et al., 2010)

### ***Asma***

El asma es una enfermedad respiratoria causada por inflamación crónica de las vías aéreas. La patogénesis del asma implica la constricción de los bronquios, respuestas alérgicas, secreción de citocinas, inflamación (Y. Xu & Eissa, 2010). La producción excesiva de ROS se cree que desempeña un papel clave en la patogénesis del asma, en donde altos niveles de ROS se correlacionan positivamente con la gravedad de la enfermedad. Se ha sugerido que la autofagia está relacionada con la patogénesis del asma, por lo que se han realizado estudios genéticos en los que se ha observado que Atg5 presenta una variante polimórfica en el alelo G, lo que aumenta el riesgo de asma moderada a grave. En el mismo estudio se observaron autofagosomas en células epiteliales y fibroblastos de pacientes con asma, lo cual sugeriría una asociación entre la autofagia y la disminución de la función pulmonar en pacientes asmáticos (Poon, Chouiali, et al, 2012)(Manuscript, 2013). En este caso, la participación de la autofagia exacerba la enfermedad, contrario al papel protector que juega en diversas enfermedades.

### ***Tuberculosis***

Además de degradar proteínas mal plegadas y organelos dañados, la autofagia degrada patógenos intracelulares de forma selectiva, lo que se conoce como xenofagia. Las vacuolas que se forman para la degradación de las bacterias intracitoplasmáticas son similares a los autofagosomas, y su formación requiere de la maquinaria de la autofagia (Levine et al., 2011). Se ha sugerido que las proteínas de la autofagia funcionan de una manera más general, no sólo en la macroautofagia clásica, sino también en el proceso de

maduración de los fagolisosomas durante la presentación de antígenos y la invasión microbiana. *Mycobacterium tuberculosis* es el agente causal de la tuberculosis. En el contexto de la infección por *M. tuberculosis*, la autofagia no sólo actúa como un mecanismo antibacteriano para la degradación del patógeno intracelular, sino también limita la secreción de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , y de este modo evita la inflamación excesiva (X. Yu, Li, Hong, Pan, & Xie, 2013). Ratones deficientes en Atg5 en el linaje mieloide (de donde provienen los macrófagos, principales blancos de *M. tuberculosis*) al ser infectados con *M. tuberculosis*, mostraron un aumento en la carga bacteriana, excesiva inflamación pulmonar y una alta tasa de mortalidad (Castillo et al., 2012). La autofagia parece estar jugando un papel fundamental en la inmunidad innata contra *M. tuberculosis* al regular la producción de citocinas, y evitar el exceso de inflamación. El tratamiento con antibióticos inductores de la autofagia puede contribuir a equilibrar la respuesta inflamatoria y anti-micobacteriana (X. Yu et al., 2013).

Como he descrito previamente, la autofagia ha sido implicada en diversas patologías como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas e infecciosas. Recientemente, los estudios sobre autofagia se han enfocado en la alteración que existe de este proceso en las patologías pulmonares. Está claro que la autofagia juega un papel complejo en el pulmón en donde al parecer podría estar teniendo efectos de protección o perjudiciales sobre la progresión de la enfermedad pulmonar (tal es el caso del asma). Cuando no hay defectos en la activación de la autofagia, se promueve la supervivencia de la célula. La actividad autofágica es responsable de la eliminación de agregados de proteínas y de organelos dañados, así como de bacterias y virus por medio de la xenofagia (ej. Tuberculosis). Por otro lado, si hay una deficiencia en el flujo autofágico o en la activación de la autofagia, esta podría ser perjudicial para la célula, ya que agregados de autofagosomas y proteínas, que se acumulan dentro de la célula, promueven vías de muerte celular (Mizumura, Cloonan, Haspel, & Choi, 2012). Sin embargo, aún quedan muchos estudios por hacer para conocer los mecanismos por los cuales la autofagia está teniendo una participación en las patologías pulmonares y de esta manera poder utilizar diversos moduladores autofágicos que mejoren los efectos terapéuticos que actualmente existen para las diversas enfermedades pulmonares (Nakahira & Choi, 2013).

## **AUTOFAGIA EN FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA**

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) es una enfermedad de etiología desconocida caracterizada por la acumulación excesiva de moléculas de la matriz extracelular (principalmente de colágenas fibrilares) y por la presencia de focos de fibroblastos y miofibroblastos en el parénquima pulmonar. La regulación controlada entre la síntesis y la degradación de la matriz extracelular es crucial para la manutención de la homeostasis pulmonar. En este contexto, la fibrosis pulmonar puede ser conceptualizada como la pérdida de la regulación en el metabolismo de la matriz extracelular. Las principales alteraciones en el metabolismo de la matriz extracelular, en la fibrosis pulmonar son: depósito excesivo de colágenas fibrilares en los espacios intersticial y alveolar, y la ruptura y desintegración de las membranas basales. Se ha estimado que en etapas avanzadas de la enfermedad, el pulmón fibrótico puede contener de 2 a 3 veces más moléculas de matriz extracelular por encima del nivel fisiológico. Por otro, lado el rompimiento de la membrana basal es un evento muy importante en la patología, y ha sido postulado que la migración de fibroblastos y miofibroblastos hacia los espacios alveolares ocurre a través de la membrana basal desintegrada. Además, existen evidencias de que la desorganización de la membrana basal, es un estímulo inicial que induce un cambio en el fenotipo de las células epiteliales transformándolas en células mesenquimales por un proceso denominado transición epitelio-mesénquima (Kage & Borok, 2012; Selman & Pardo, 2002)

La FPI, subclasificada como neumonía intersticial usual es una patología heterogénea en el contexto temporal, esto significa que en el pulmón existen regiones con una apariencia normal, que se encuentran mezcladas con áreas de fibrosis madura y con áreas focales fibróticas menos densas o inmaduras. Dentro de esta matriz inmadura existen focos de fibroblastos proliferativos y productores dinámicos de colágena. En una biopsia pulmonar, existe una correlación directa entre el número de focos de fibroblastos y la degeneración progresiva del parénquima pulmonar, reduciendo las áreas de intercambio gaseoso, resultando en el acortamiento en la supervivencia de los individuos diagnosticados con FPI (King et al., 2011). Se ha sugerido que la acumulación de los fibroblastos se da a través de tres mecanismos: la proliferación y la diferenciación de fibroblastos de pulmón residentes; la transición epitelio-mesénquima, y la transición de los fibrocitos derivados de la médula ósea o de células circulantes progenitoras de los fibroblastos. La transición epitelio-mesénquima es uno de los varios mecanismos propuestos a través de las cuales se generan los fibroblastos y los miofibroblastos, ya que los fibroblastos expresan características mesenquimales las cuales les confieren resistencia a la apoptosis. La

transición epitelio-mesénquima está asociada con el estrés de retículo endoplásmico y tiene gran relevancia en la FPI ya que está relacionada con la liberación de citocinas por las células epiteliales dañadas creando de este modo un ambiente profibrogénico (Kage & Borok, 2012).

La fibrosis puede ocurrir a cualquier edad, sin embargo el riesgo de desarrollar esta enfermedad aumenta en relación a la edad. Por ejemplo la FPI es raramente diagnosticada a individuos menores de 40 años, y su incidencia y prevalencia aumenta de manera proporcional al envejecimiento.

Los mecanismos que asocian el envejecimiento con el desarrollo de enfermedades fibrosantes aún no están bien esclarecidos. Varias patologías asociadas al envejecimiento han sido relacionadas con alteraciones en los telómeros. Estudios recientes han mostrado que casos de FPI familiar o esporádica están relacionados al acortamiento de telómeros, validando el concepto de que la FPI es un proceso degenerativo relacionado con el envejecimiento. El acortamiento de telómeros puede inducir senescencia celular, e influenciar el fenotipo y comportamiento tanto de células epiteliales, como mesenquimatosas en el pulmón adulto. La senescencia fue originalmente definida como un arresto irreversible en el ciclo celular en fibroblastos humanos diploides. Después fue demostrado que el arresto en ciclo celular se debía esencialmente al acortamiento en los telómeros, el cuál activaba de manera persistente una señal de daño al DNA. Actualmente se sabe que la senescencia no está restringida a la desregulación en los telómeros. Además de las evidencias claras que relacionan el desarrollo de FPI, con el acortamiento de telómeros, senescencia y envejecimiento, se han encontrado otros factores que predisponen a los individuos ancianos al desarrollo de FPI; por ejemplo cambios morfológicos y fisiológicos en el pulmón, modificaciones en la respuesta inmune innata y adaptativa, aumento del estrés oxidante, además de una exposición acumulativa a factores ambientales tóxicos como el humo de tabaco y agentes infecciosos (Pardo & Selman, 2002).

En nuestro laboratorio hemos evaluado el papel de la autofagia en el desarrollo de fibrosis pulmonar, y hemos demostrado que niveles bajos de autofagia contribuyen a una mayor susceptibilidad en el desarrollo de fibrosis pulmonar experimental, utilizando un ratón deficiente de la proteasa autofagina 1. Estos ratones nulos en autofagina 1, presentan mayor mortandad cuando son tratados con bleomicina, pierden más peso, y tienen una respuesta inflamatoria y fibrosante más severa en comparación con sus respectivos controles (ratones silvestres), revelando que la autofagia juega un papel protector en la fibrosis pulmonar. Además, al evaluar la expresión de autofagina 1 en

pulmones de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática por inmunohistoquímica, hemos observado que esta proteasa se expresa principalmente en el epitelio bronquial y alveolar. De forma similar, hemos observado la presencia de autofagina 1 en el epitelio alveolar y bronquial, en el pulmón fibrótico de ratones silvestres tratados con bleomicina. Aún no se ha definido cuál es el papel de esta proteasa en el epitelio alveolar, pero es muy probable que la autofagia sea inducida en las células epiteliales, en respuesta al estrés oxidante inducido por la bleomicina. Además se ha demostrado que la autofagia puede modular negativamente la respuesta inflamatoria. Estos datos sugieren que la autofagia puede jugar un papel protector en la fibrosis pulmonar.

Por otro lado, en un estudio reciente, se observó que en tejidos de pulmón provenientes de pacientes con FPI, los niveles de estrés de RE están elevados comparados con tejidos de pulmón provenientes de pacientes sanos. Como ya se mencionó antes, el estrés de RE induce autofagia, sin embargo los niveles de LC3-II están significativamente más bajos en homogenizados de pulmón con FPI, comparado con pulmones control. De igual manera, los niveles en la proteína p62 que se correlacionan inversamente con la actividad de la autofagia, están aumentados en pulmones con FPI. Al observar la formación de autofagosomas por microscopía electrónica, se ha visto que los pulmones de pacientes con FPI muestran pocos autofagosomas, lo que en conjunto indica que no hay actividad autofágica en los pulmones de pacientes con FPI, a pesar de la presencia de factores (como el estrés de RE) que incrementan los niveles de autofagia en los tejidos. En el mismo estudio se demostró que TGF- $\beta$ , un potente agente pro-fibrótico inhibe la conversión de LC3-I a LC3-II en fibroblastos de pulmón humano y en células epiteliales inhibe la formación de autofagosomas. TGF- $\beta$  también activa a mTOR al inducir su fosforilación y a TIGAR otro inhibidor de la autofagia que actúa a través de la modulación de ROS. Por tanto, la inducción de mTOR y de TIGAR pueden ser mecanismos por los que la actividad autofágica está siendo regulada. La inhibición de proteínas clave en la autofagia como Beclin1 y LC3, da como lugar a un aumento en la expresión de fibronectina y de alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) en los fibroblastos como respuesta al tratamiento con TGF- $\beta$ , estos resultados indican que la inhibición de la autofagia sin haber un cambio en la actividad de mTOR altera la respuesta de los fibroblastos a TGF- $\beta$ . Como conclusión en este estudio, se demostró que la autofagia no está inducida en la FPI, y que la molécula TGF- $\beta$  parece ser el principal mediador en la inhibición de la autofagia que conlleva a una alta producción de moléculas de matriz extracelular por los fibroblastos. En este contexto, la inhibición de la autofagia tiene un impacto en el desarrollo de la fibrogénesis en la FPI (Patel et al., 2012).

Por otro lado, Araya y colaboradores (2012), propusieron que la autofagia podría estar involucrada en la regulación de la senescencia celular en células epiteliales así como en la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos en la FPI. Estos autores observaron que en células HBEC, (*human bronchial epithelial cells*, por sus siglas en inglés) el estrés de RE inducido con tunicamicina incrementaba el porcentaje de células senescentes y que la inducción de la autofagia con Torin1, un inhibidor de mTOR disminuyó el porcentaje de senescencia celular y activaba la autofagia. El silenciamiento de la proteína LC3B, daba como resultado una acumulación de p62 lo que demostraba una insuficiencia en la autofagia, así como un incremento en los niveles de las proteínas BIP y phospho-eIF2, ambos marcadores de estrés de RE. Estos datos indicaron que la inducción de la autofagia protegía a las células de la senescencia celular y del estrés de RE en HBEC. De igual manera, en fibroblastos de pulmón se silenciaron específicamente los genes que codifican para LC3B y ATG5, para determinar el papel de la autofagia en la diferenciación de los miofibroblastos. Contrario al estudio anterior, se observó que el TGF- $\beta$  induce la autofagia al incrementar los niveles de LC3B-II y disminuir los de p62. La inhibición de la autofagia y el tratamiento con TGF- $\beta$  inducían una mayor expresión de  $\alpha$ -SMA y de colágena tipo 1. La activación de la autofagia disminuía significativamente los niveles de  $\alpha$ -SMA y de colágena tipo 1, proponiendo con esto que la autofagia regula negativamente la diferenciación de los miofibroblastos, sorprendentemente y contrario a las HBEC, la inhibición *in vitro* de la autofagia no estaba involucrada en la senescencia celular de los fibroblastos de pulmón.

En este estudio se hicieron análisis de inmunohistoquímica para evaluar el estatus de la autofagia en pulmones con FPI y se encontró que LC3 está en el citoplasma de las células alveolares epiteliales tipo II (AECII) en aquellas áreas de pulmón con FPI que no han sufrido una distorsión estructural, y en otras áreas del pulmón, con diversos grados de fibrosis la expresión de LC3 ya no era detectada, por otro lado en pulmones normales no había expresión de LC3. Por otra parte, se observó que la proteína Beclin1 se expresaba de manera difusa en el pulmón normal, sin embargo en pulmones con FPI, Beclin1 se expresaba de la misma manera que LC3B en AECII. Por el contrario, la proteína p62 en el pulmón normal solo se expresaba en AECII, en pulmones con FPI se observó que además de expresarse también en estas células, era detectada en aquellas zonas del pulmón que ya habían sufrido una remodelación del parénquima pulmonar y que tenían diversos grados de fibrosis, desde moderada hasta severa.

Por último, estos autores proponen un modelo en el que explican que la insuficiencia de la autofagia podría ser la causa de alteraciones fenotípicas de los

fibroblastos y que además esta insuficiencia es un mecanismo por el cual se acelera la senescencia celular en las células epiteliales y se promueve la diferenciación de los fibroblastos hacia miofibroblastos, sugiriendo que la inducción de la autofagia puede ser un nuevo enfoque médico para prevenir la acumulación de células epiteliales senescentes y de miofibroblastos en aquellas áreas con mayor grado de fibrosis en pulmones con FPI (Araya et al., 2013).

Son pocos los estudios que han estudiado la relación entre la autofagia y el desarrollo de la FPI, sin embargo, es claro que este proceso podría jugar un papel clave en la patogénesis de esta enfermedad, sin embargo, los mecanismos por los cuales hay una deficiencia o defectos en el flujo autofágico aún no están claros. Se requieren más estudios en los que se investigue si la activación de la autofagia puede tener un impacto en el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática.

## **INDUCTORES FARMACOLÓGICOS DE LA AUTOFAGIA.**

Dado el valor terapéutico de la modulación de la autofagia, muchos estudios se han centrado en la identificación de moléculas pequeñas que potencian o inhiben la autofagia.

Manipulaciones genéticas o farmacológicas diseñadas en prolongar la vida de diversos organismos, están centradas en inducir autofagia en múltiples modelos experimentales, incluyendo levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), nematodos (*Caenorhabditis elegans*), mosca (*Drosophila melanogaster*) y ratón (*Mus musculus*); contrariamente, la inhibición de la autofagia previene la extensión de la longevidad en dichos modelos (Eisenberg et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, en condiciones basales, la autofagia contribuye a mantener la homeostasis celular, a través de la eliminación de mitocondrias dañadas que son potencialmente peligrosas para la célula (así como otros organelos dañados) y la eliminación de agregados de proteínas mal plegadas o dañadas. La actividad autofágica tiene entonces efectos anti-envejecimiento, elevando el umbral de acumulación de daños celulares que finalmente conducen al envejecimiento y a la muerte celular.

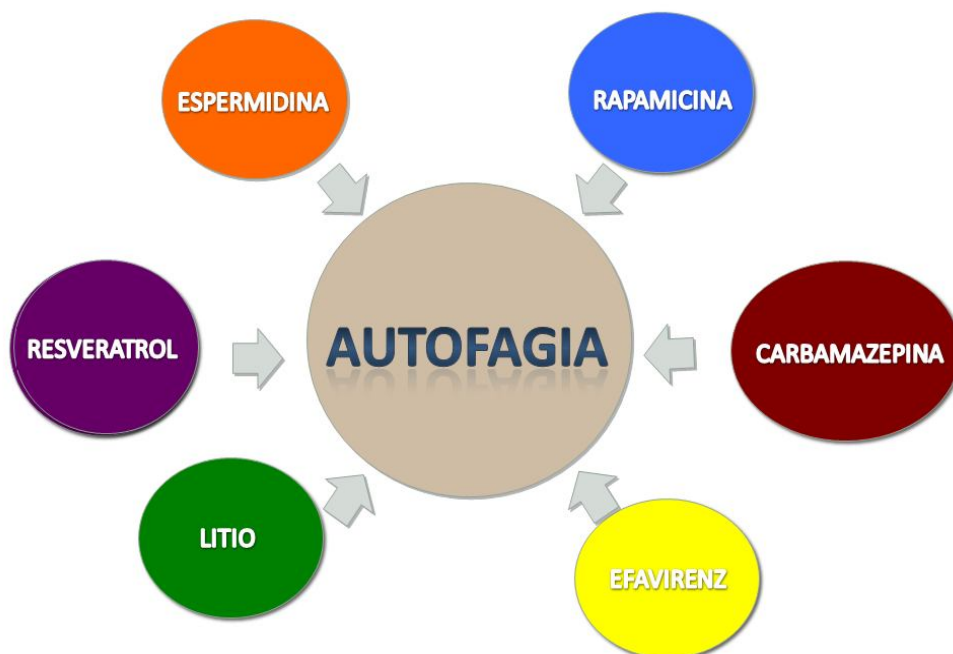
La autofagia puede ser inducida por:

- Restricción calórica
- Activación genética o farmacológica de la Sirtuina 1 (SIRT1)
- Por el polifenol **Resveratrol**
- Inhibición de la cinasa mTOR por **Rapamicina**,
- Inhibición de acetilasas de histonas inducida por la **Espermidina**



Además de los inductores arriba mencionados, existen también otros fármacos que al igual que los anteriores inducen la autofagia, tal es el caso del litio, la carbamazepina, la calpastatina, Torina1, tamoxifen, efavirenz, entre otros. Por el contrario, moléculas como 3-metiladenina (3-MA), y wortmanina inhiben el flujo autofágico actuando a nivel de la vía de PI3K, impidiendo con esto la formación de los autofagosomas. Otras drogas como la Cloroquina, hidroxiclороquina o Bafilomicina A1, actúan impidiendo la unión de los autofagosomas con los lisosomas inhibiendo con esto la formación de los autolisosomas (fig. 9) (Rubinzen et al., 2007).

A continuación describiré cuál es la naturaleza de los inductores de autofagia rapamicina, espermidina y resveratrol, así como generalidades de los mecanismos moleculares y celulares, mediante los cuales cada uno de ellos induce la autofagia.

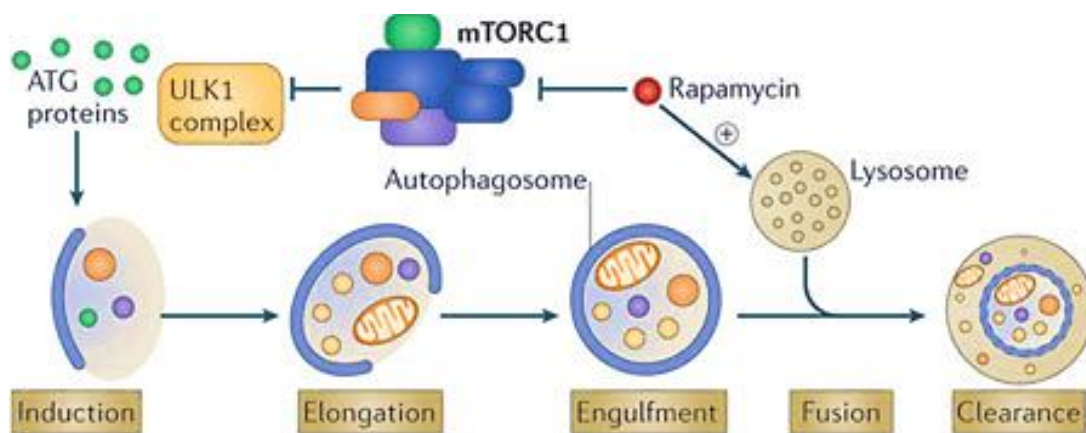


**Fig. 4. Diversos moduladores de la autofagia.** Debido al valor terapéutico que ha adquirido la modulación de la autofagia, muchos estudios se han centrado en identificar moléculas pequeñas que potencien o inhiban la autofagia. La autofagia puede ser inducida por la restricción calórica principalmente, sin embargo, la activación genética o farmacológica de la Sirtuina 1 (SIRT1) inducida por el resveratrol, la inhibición de la cinasa mTOR por rapamicina, o la inhibición de acetilasas de histonas inducida por la espermidina, así como el litio, la carbamazepina y el anti-retroviral efavirenz, han sido estudiados debido a la participación que tienen en la inducción de la autofagia.

### **RAPAMICINA.**

La cinasa de serina y treonina mTOR (*mammalian target of rapamycin*, por sus siglas en inglés) es un componente principal de la vía PI3K; presenta dos isoformas C1 y C2, y regula la tasa de crecimiento celular, la proliferación, la síntesis de proteínas en

diversos tipos celulares como fibroblastos, células de músculo liso y células epiteliales. Inhibidores de mTOR como la rapamicina, se une al receptor intracelular citoplásmico FK506-binding protein-12. La actividad de mTOR puede ser inhibida por la rapamicina, un antibiótico aislado de *Streptomyces hygroscopicus*. La rapamicina y sus análogos (CCI-779, RAD001, AP23573, entre otros) son potentes inductores de la autofagia en levaduras, líneas celulares de mamíferos y en cultivos primarios (Fleming, Noda, Yoshimori, & Rubinsztein, 2011). En células de mamíferos, la rapamicina estabiliza la asociación raptor-mTOR formando un complejo con la proteína de unión a FK506 de 12 kDa (FKBP12), y por ello, inhibe la actividad de la cinasa mTOR y activa la autofagia (fig. 5) (Fleming et al., 2011).



**Fig. 5. Inducción de la autofagia por rapamicina.** Bajo condiciones ricas en nutrientes o libres de estrés, mTOR se encuentra fosforilando y formando un complejo con ULK1 y otras proteínas ATG. Al estar formando este complejo, la autofagia se encuentra inhibida. Por el contrario, el tratamiento con rapamicina inhibe a mTOR permitiendo la desfosforilación del complejo ULK1 y activando la autofagia (Bové, Martínez-Vicente, & Vila, 2011).

Cuando las células se encuentran en proliferación, el complejo formado después interactúa con mTOR e inhibe su función, causando arresto celular en G1, mostrando con ello efectos anti-proliferativos de la rapamicina. La inhibición de mTORC1 y la inducción de la autofagia por rapamicina está asociada con una reducción de la fosforilación de dos de sus efectores río abajo: S6K1 (también conocidos como p70S6K) y el factor de inicio de la traducción 4E-BP1 (también conocido como PHAS-1). Los niveles de fosforilación de estas dos proteínas se utilizan en las investigaciones farmacológicas para demostrar la inhibición de la mTORC1 (Fleming et al., 2011). Además de bloquear la proliferación celular, se ha demostrado que los inhibidores de mTOR pueden tener propiedades anti-inflamatorias, anti-tumorales y anti-fibrosantes. En modelos animales de fibrosis renal y cirrosis, el tratamiento con rapamicina ha revertido o prevenido el desarrollo de fibrosis. En modelos de fibrosis pulmonar, el análogo de la rapamicina SDZ RAD, previene la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, aunque no ha sido definido, si este análogo de

la rapamicina podría tener un efecto anti-inflamatorio, al cual pudiera ser atribuido al mejoramiento. La administración de rapamicina al ratón CCSP-TGF $\alpha$  previene el desarrollo y progresión de la fibrosis pulmonar (Simler et al., 2002)

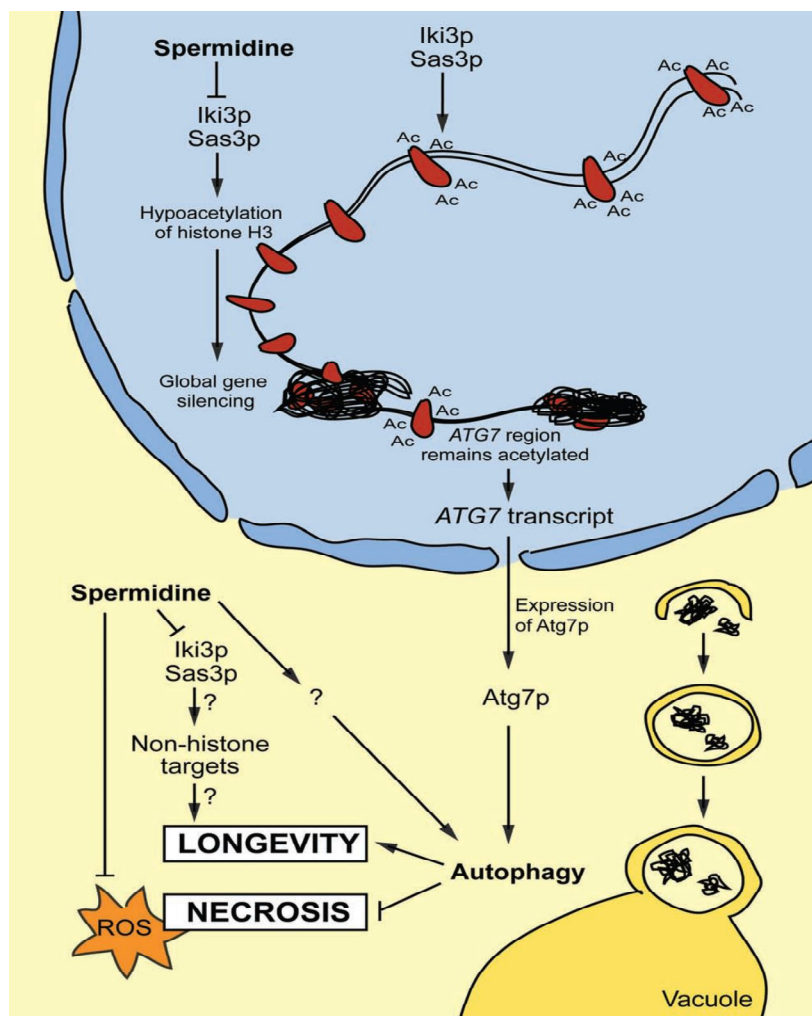
## **ESPERMIDINA.**

La espermidina es una poliamina, abundante en el líquido espermático. El nivel celular de las poliaminas como la espermidina, es regulado por un balance entre la biosíntesis, el catabolismo, y la excreción. La espermidina se sintetiza a partir de la putrescina y sirve como un precursor de la espermina. Las poliaminas naturales como la putrescina (PUT: 1,4-butano diamina), espermidina (SPD: *N*-(3-(aminopropil)-1,4-butano diamina) y espermina (SPM: *N, N'*-bis (3-aminopropil)-1,4-butano diamina) son conocidas como reguladores indispensables de diversos procesos celulares incluidos: la estabilidad del DNA, la transcripción, traducción, crecimiento celular, proliferación, diferenciación y apoptosis (Wallace, Fraser, & Hughes, 2003).

La soya o soja tiene un nivel alto de las poliaminas espermidina y espermina (Thomas & Thomas, 2003; Wallace et al., 2003). La espermidina y espermina no son enzimáticamente degradadas en el tracto digestivo, así que si se administran de forma oral son rápidamente absorbidas en el lumen intestinal y distribuidas a todos los órganos y tejidos. De hecho se ha demostrado en humanos y en modelos animales, que el consumo de alimentos ricos en poliaminas, por un tiempo prolongado, aumenta gradualmente el nivel de estos componentes en la sangre y esto tiene efectos profilácticos ante diversas patologías. Específicamente, se ha demostrado en un modelo de osteoporosis desarrollado en ratón, que la administración de espermidina y espermina inhibe la activación de osteoclastos, la reabsorción de hueso y la pérdida de masa ósea en ratones hembra sometidas a ovariectomía (extirpación de los ovarios) (Yamamoto et al., 2012). Se ha demostrado que la espermidina y la espermina inhiben la inflamación y esto está asociado con la supresión de la expresión de citocinas pro-inflamatorias (Eisenberg et al., 2009).

El suministro exógeno de espermidina prolonga la vida media de varios organismos modelo incluyendo la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), nemátodos (*Caenorhabditis elegans*) y moscas (*Drosophila melanogaster*) y reduce significativamente el daño oxidativo de proteínas relacionadas con la edad en los ratones, lo que indica que este agente puede actuar como una droga anti-envejecimiento (Eisenberg et al., 2009;

Eugenia Morselli et al., 2009). También se ha demostrado que la espermidina induce la autofagia en levaduras cultivadas y en células de mamíferos, así como en nematodos y moscas. Además de su efecto pro-autofágico, la espermidina suprime diversos factores relacionados con el envejecimiento, tal como la producción de ROS y la disminución de muerte celular necrótica. En levaduras viejas, el tratamiento con espermidina, desencadena la desacetilación epigenética de la histona H3 a través de la inhibición de las acetil-transferasas de histonas (HAT *histone acetyltransferases*, por sus siglas en inglés), esto afecta la regulación epigenética de la transcripción de genes permitiendo la inducción de la autofagia. Por otro lado, la inactivación genética de los genes esenciales para la autofagia en estos organismos suprime los efectos de la espermidina (fig. 6) (Eisenberg et al., 2009).

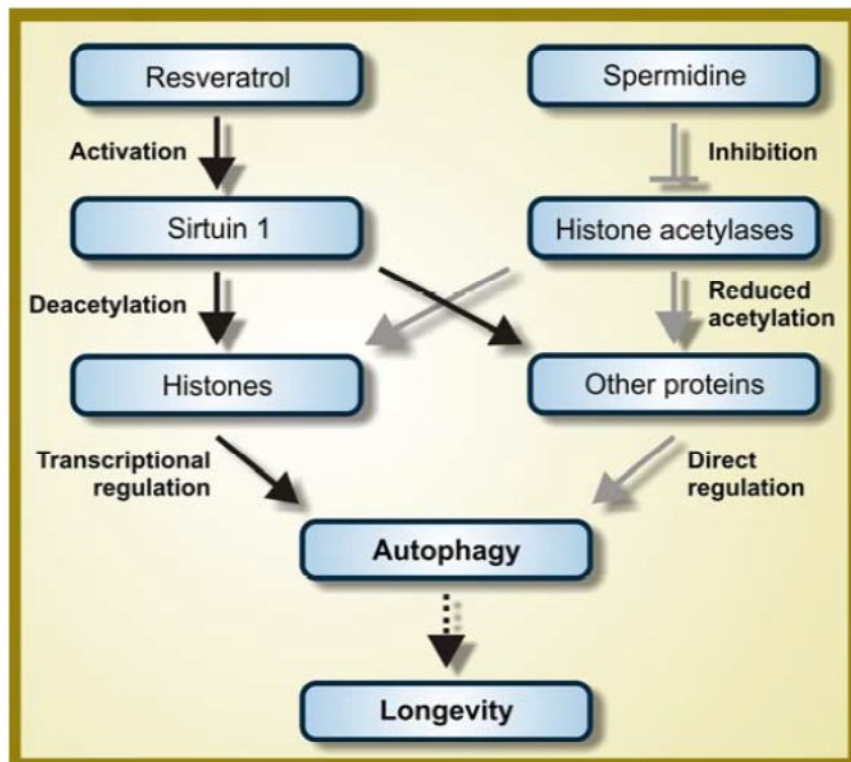


**Fig. 6. Mecanismo por el cual la espermidina prolonga la vida en levaduras.** La espermidina inhibe a las HATs desencadenando con esto, una reducción en la acetilación de la histona H3. Esto permite una reprogramación epigenética dando como resultado un aumento en la expresión de genes relacionados con la autofagia, la cual tiene un efecto en la prolongación de vida (Madeo, Eisenberg, Ruckenstuhl, & Kroemer, 2010).

## RESVERATROL

El resveratrol (3,4'5-trihidroxi-transestilbeno) es un potente inductor de autofagia, es un polifenol derivado de las uvas, las moras azules, cacahuates y otras fuentes vegetales; además, evidentemente es un componente del vino tinto (Baur & Sinclair, 2006). El resveratrol, al igual que la espermidina prolonga la vida de organismos en diferentes modelos experimentales. El resveratrol actúa a través de la Sirtuina-1 (Sirt-1), una desacetilasa dependiente de  $\text{NAD}^+$ , Sirt-1 puede ser activada por restricción calórica o por el resveratrol. Sirt-1 induce la autofagia a través de la desacetilación de factores clave de la autofagia como ATG5 y ATG7 y promueve la conversión de LC3-I a LC3-II. La activación de esta desacetilasa por el resveratrol extiende la vida en organismos como *C. elegans* y en células de mamífero a través de la inducción de la autofagia (E Morselli et al., 2010). En ratón y en células humanas, la espermidina y el resveratrol provocan múltiples cambios (aumento o disminución) en la acetilación de la lisina de cientos de proteínas.

La espermidina y el resveratrol modulan la acetilación de más de 100 proteínas que forman parte de la red central de reguladores o ejecutores autofágicos. Esto sugiere que ambos agentes estimulan la autofagia a través de un mecanismo multifacético que implica un gran número de reacciones de acetilación y desacetilación. Estos dos fármacos estimulan la desacetilación de proteínas citosólicas como ATG5 y LC3, y la acetilación de proteínas nucleares, entre ellas las histonas (fig. 7) (Eugenia Morselli et al., 2011).



**Fig. 7. Modo de acción hipotético del resveratrol y la espermidina como inductores de la autofagia.** El resveratrol funciona como un activador de Sirtuina-1, desacetilando componentes esenciales de la autofagia. La espermidina inhibe las acetilasas de histonas. Ambos agentes actúan de una manera sinérgica estimulando la activación de la autofagia (Eugenia Morselli et al., 2009).

Durante la última década se ha demostrado que el resveratrol posee un amplio espectro de propiedades farmacológicas, incluyendo efectos antioxidantes, cardioprotectores y anti-cancerígenos. El resveratrol es bien tolerado en humanos y en animales como la rata y el ratón, sin embargo no existe información de los efectos del resveratrol cuando es administrado a largo plazo. Indirectamente, se han demostrado los beneficios del resveratrol, por ejemplo, el consumo moderado y constante del vino tinto previene enfermedades cardiovasculares y tiene un efecto positivo en la longevidad. El resveratrol es absorbido rápidamente y metabolizado, principalmente como sulfo- y gluco-conjugados que son secretados en la orina (Cottart, Nivet-Antoine, Laguillier-Morizot, & Beaudeau, 2010)

El resveratrol y sus análogos han sido estudiados *in vitro* e *in vivo* en una gran variedad de enfermedades en humanos, y en modelos animales. *In vitro* se ha demostrado que el resveratrol interactúa con múltiples blancos moleculares y tiene distintos efectos en células de cáncer de piel, colon, esófago, próstata y páncreas. *In*

vivo, se ha demostrado que la aplicación tópica de resveratrol en ratones antes y después de la exposición a radiación UVB, inhibe el daño de la piel y disminuye la incidencia de cáncer, sin embargo el tratamiento oral con resveratrol no fue efectivo en prevenir el desarrollo de metástasis en ratones inoculados con células de melanoma (Guan, Singh, Singh, Nagarkatti, & Nagarkatti, 2012)

Por otro lado, el resveratrol inyectado intraperitonealmente a una concentración de 2.5 y 10 mg/kg peso, disminuyó el desarrollo de carcinoma pulmonar en ratones inoculados con células de Lewis (Kimura & Okuda, 2001). El resveratrol administrado en una dosis de 1mg/kg en rata, redujo el número de tumores en esófago en ratas tratadas con carcinógenos (Z. G. Li et al., 2002). Adicionalmente se ha demostrado que el resveratrol administrado en dosis pequeñas, reduce o previene el desarrollo de tumores en intestino y colon en ratas tratadas con diferentes carcinógenos. Por lo tanto agentes naturales no tóxicos, pueden ser muy útiles solos, o en combinación con la terapia convencional para el tratamiento y la prevención de la progresión tumoral (Sengottuvelan, Senthilkumar, & Nalini, 2006)

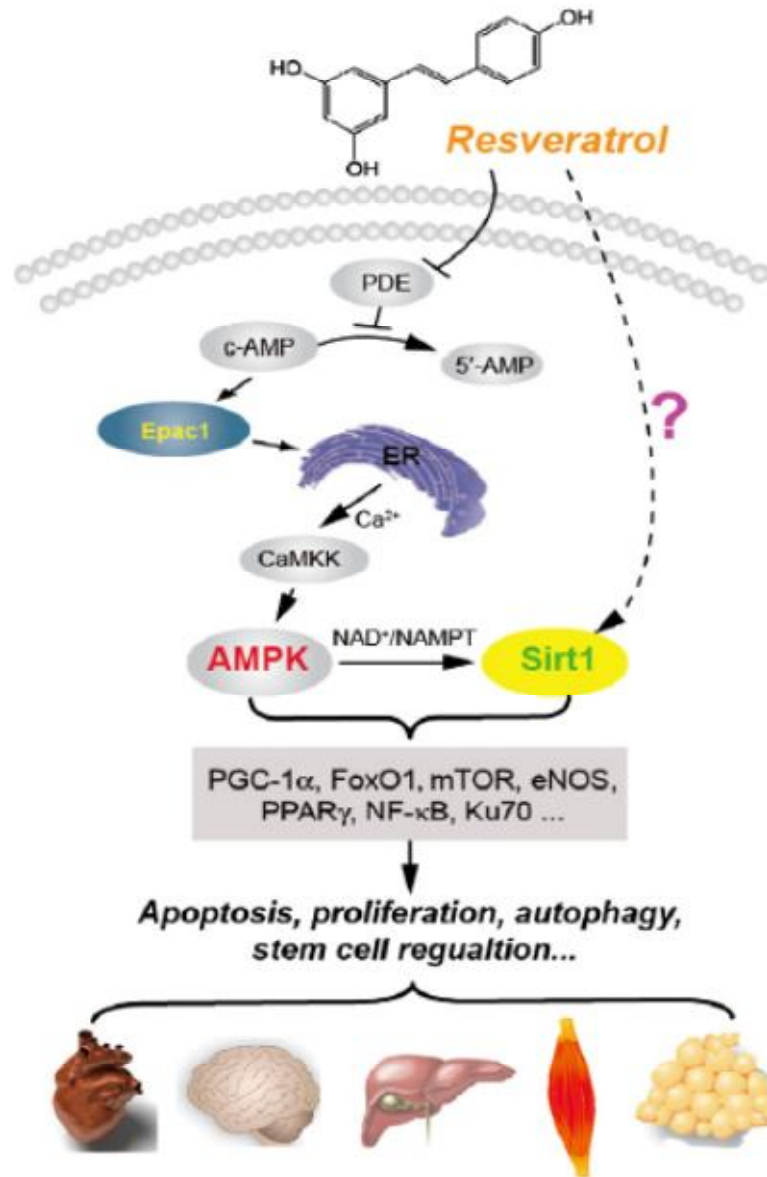
Además de los estudios que se han hecho en cáncer, el resveratrol ha sido ampliamente estudiado por sus efectos cardiovasculares al atribuírsele efectos anti-hipertensivos, anti-trombóticos y anti-arteroescleróticos ya que promueve la vasodilatación, inhibe la agregación de plaquetas, previene la adhesión de leucocitos al endotelio vascular y reduce la oxidación de los lípidos (H. Li, Xia, & Förstermann, 2012). Al ser un compuesto polifenólico, el resveratrol tiene propiedades anti-oxidantes ya que se ha mostrado que remueve los radicales hidroxilos, superóxido y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El resveratrol disminuye el estrés oxidativo por medio de la inhibición de la producción de ROS. Al tratar a ratas que tienen una alta producción de NADPH oxidasas (NOX, que son las principales productoras de ROS en el sistema cardiovascular), como NOX1, NOX2 y NOX4 en la aorta después de un trauma hemorrágico, se observó que el resveratrol reduce la expresión de estas NADPH oxidasas, previniendo de esta manera una disfunción endotelial (H.-P. Yu, Hwang, Hwang, Yen, & Lau, 2010). Los efectos protectores del resveratrol contra el daño oxidativo han sido atribuidos principalmente a una regulación de los sistemas antioxidantes celulares endógenos más que a una eliminación directa de ROS. En la arteroesclerosis, se ha visto que el resveratrol incrementa la producción de óxido nítrico (NO) el cual es un potente regulador de la vaso-relajación y un factor importante en las funciones vasculares. Este polifenol aumenta la expresión de las sintasas endoteliales de óxido nítrico (eNOS) mejorando con ello la función endotelial. Por otro lado, el resveratrol también tiene efectos anti-inflamatorios al

inhibir la activación de NF- $\kappa$ B, efecto que ha sido también atribuido a la SIRT-1 ya que interacciona con la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B impidiendo su translocación nuclear (H. Li et al., 2012).

En enfermedades metabólicas como la obesidad también se ha demostrado los efectos benéficos del resveratrol. En ratones alimentados con una dieta alta en grasas, el resveratrol disminuye el contenido de grasa total en el cuerpo de estos animales así como la ganancia de peso y los niveles de triglicéridos en el plasma(Q. Xu & Si, 2012).

Los efectos del resveratrol también se han estudiado en diabetes, como un potente agente terapéutico. El resveratrol tiene un papel protector en las células  $\beta$  del páncreas, reduciendo la secreción de insulina en estas células e inhibiendo la producción de citocinas inflamatorias. La obesidad está asociada con un incremento en el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina y diabetes tipo 2. En un estudio, se observó que el resveratrol incrementa la sensibilidad a la insulina en células como los adipocitos, hepatocitos y células del músculo esquelético (fig. 8) (Q. Xu & Si, 2012).





**Fig. 8. Modelos de acción del resveratrol.** El resveratrol tiene diversos blancos por los que puede actuar como por ejemplo SIRT-1 y AMPK, los cuales ejercerán un efecto directo sobre diferentes factores transcripcionales como NF-κB, que a su vez tendrán efectos en diversos procesos biológicos como la autofagia, teniendo como resultado una influencia en enfermedades cardiovasculares, metabólicas, entre otras (Q. Xu & Si, 2012).

En cáncer de pulmón se ha investigado el papel que tiene el resveratrol en la inhibición de TGF-β, un potente inductor que promueve la transición epitelio mesénquima (TEM) en el cáncer de pulmón. La TEM es un proceso celular durante el cual las células polarizadas se vuelven células mesenquimales móviles. La TEM juega un papel importante en el cáncer al estar involucrada en la invasión y metástasis de células cancerígenas (Wang et al., 2013). En un estudio, en células A549 de cáncer de pulmón se

observó, que la TEM inducida por TGF- $\beta$ , era inhibida al tratar a estas células con resveratrol a una concentración de 20 $\mu$ M ya que aumentaba la expresión de marcadores de células epiteliales como la E-cadherina, mientras que aquellos marcadores de un fenotipo mensequimal como la fibronectina y vimentina eran reprimidos tras el tratamiento con resveratrol. Además, también se obtuvieron resultados en los que el resveratrol inhibía la migración, adhesión e invasión inducida por TGF- $\beta$ . En conclusión, este estudio demuestra que el resveratrol es un potente inhibidor de la metástasis y la invasión celular en el cáncer de pulmón *in vitro* al suprimir la TEM inducida por los efectos del TGF- $\beta$  (Wang et al., 2013). El mecanismo por el cual el resveratrol ejerce sus diversos efectos benéficos en distintas especies y modelos animales aún no está claro. Los experimentos *in vitro* que demuestran los efectos favorables del resveratrol, han tenido resultados de gran éxito y como consecuencia, ahora se sabe con mejor detalle cuales son los blancos directos de compuesto, aunque mucho mecanismos aún quedan por elucidar (Baur & Sinclair, 2006). Es importante mencionar que los beneficios del resveratrol han sido demostrados principalmente en estudios de cáncer y en enfermedades cardiovasculares, pero no existen estudios, donde se hayan analizado los efectos de este compuesto en la fibrosis pulmonar.

## JUSTIFICACIÓN

---

La Fibrosis Pulmonar Idiopática es una enfermedad crónica, progresiva y letal, de causa desconocida que afecta principalmente a adultos mayores teniendo mayor incidencia en varones y que no tiene cura. El único tratamiento actual para alargar la vida de los pacientes diagnosticados con ésta enfermedad es el trasplante pulmonar. Son pocos los estudios que han estudiado la relación entre la autofagia y el desarrollo de la FPI, sin embargo, es claro que este proceso celular podría estar jugando un papel clave en la patogénesis de esta enfermedad, aunado a esto, los mecanismos por los cuales hay una deficiencia o defectos en el flujo autofágico aún no están claros. Se requieren más estudios en los que se investigue si la activación de la autofagia puede tener un impacto en el desarrollo de la FPI. Por el contrario, el uso de inductores de la autofagia como el resveratrol podría tener efectos benéficos, tal y como se ha demostrado en distintos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares.

## HIPÓTESIS

---

La activación de la autofagia mediante el resveratrol reducirá el desarrollo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, en comparación con los ratones tratados con solución salina, en un modelo animal experimental.

## OBJETIVO GENERAL

---

Evaluar *in vivo* el efecto del inductor de autofagia resveratrol, en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones de la cepa C57BL6.

## OBJETIVOS PARTICULARES

---

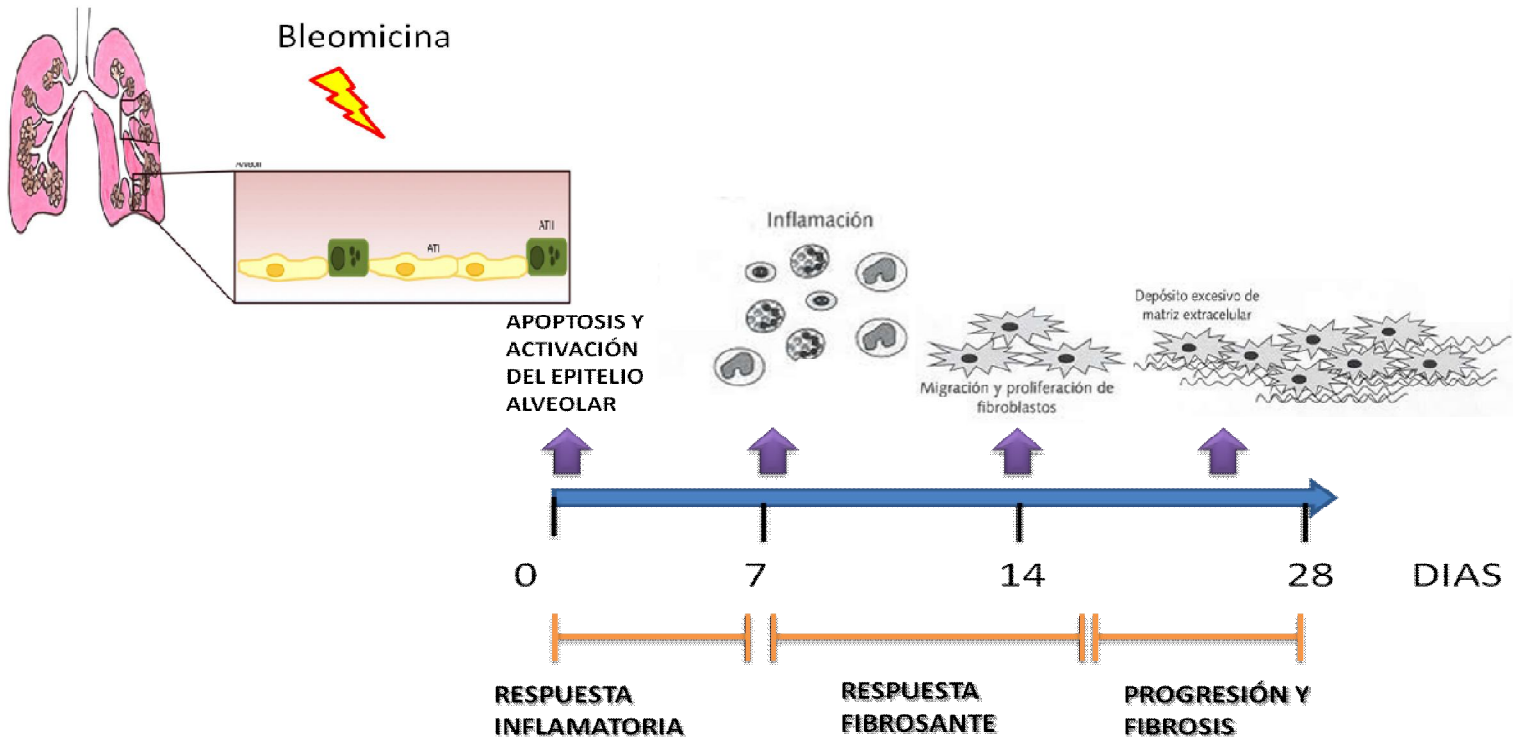
- Inducir fibrosis en los ratones C57BL6 por instilación intratraqueal de bleomicina.
- Analizar los cambios morfológicos durante la etapa fibrosante en los ratones tratados con resveratrol y comparar con ratones tratados con solución salina.
- Evaluar el contenido de hidroxiprolina pulmonar en los ratones con fibrosis pulmonar, tratados con resveratrol o con vehículo.
- Evaluar la actividad autofágica en el pulmón de ratones control, tratados con bleomicina y tratados con resveratrol.

### ***Fibrosis experimental inducida por bleomicina.***

Ratones (machos y hembras) de la cepa C57BL6 de 8 a 10 semanas de edad fueron anestesiados con pentobarbital sódico (“Sedalpharma” donde cada ml contiene 0.063g de pentobarbital, dosis administrada de 0.63mg/100 $\mu$ L) por vía intraperitoneal, para recibir bleomicina (“Bleolem” 0.05 U), por vía intra-traqueal en dosis única (instilación). La droga fue administrada en un volumen de 50 $\mu$ l, los animales control fueron instilados con el mismo volumen de solución salina. Los animales fueron sacrificados a los 28 días post-tratamiento para evaluar el desarrollo de la respuesta fibrosante. Después del sacrificio, se obtuvieron los pulmones y se evaluó la gravedad de la fibrosis a través de la medición semicuantitativa de las lesiones y la determinación de hidroxiprolina.

### ***Bleomicina***

Actualmente, el modelo de bleomicina es el más utilizado y reproducible, para inducir fibrosis pulmonar en modelos experimentales *in vivo* como el ratón y la rata. Los efectos de la toxicidad pulmonar por bleomicina en humanos son similares en el ratón. La bleomicina causa la muerte celular en el epitelio alveolar del pulmón, generando una respuesta inflamatoria que resulta en el desarrollo de fibrosis. Después del daño con bleomicina, se pueden distinguir diversos cambios en el pulmón que progresan y dan como resultado la fibrosis pulmonar. Tres días post-instilación, se observan cambios en la celularidad de los septos alveolares ya que hay una infiltración de células inflamatorias, principalmente macrófagos y neutrófilos. A partir del día seis, se mantiene un aumento de linfocitos que influyen la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena. A los 14 días post-instilación (etapa inflamatoria) se observan cambios difusos y multifocales en el pulmón como hiperplasia epitelial y fibrosis intersticial e intraalveolar. Después de los 21 días (etapa fibrosante) se observan focos grandes de fibrosis en forma difusa con presencia de fibroblastos, miofibroblastos y depósito de colágenas fibrilares (fig. 9) (Cabrera S., 2006).

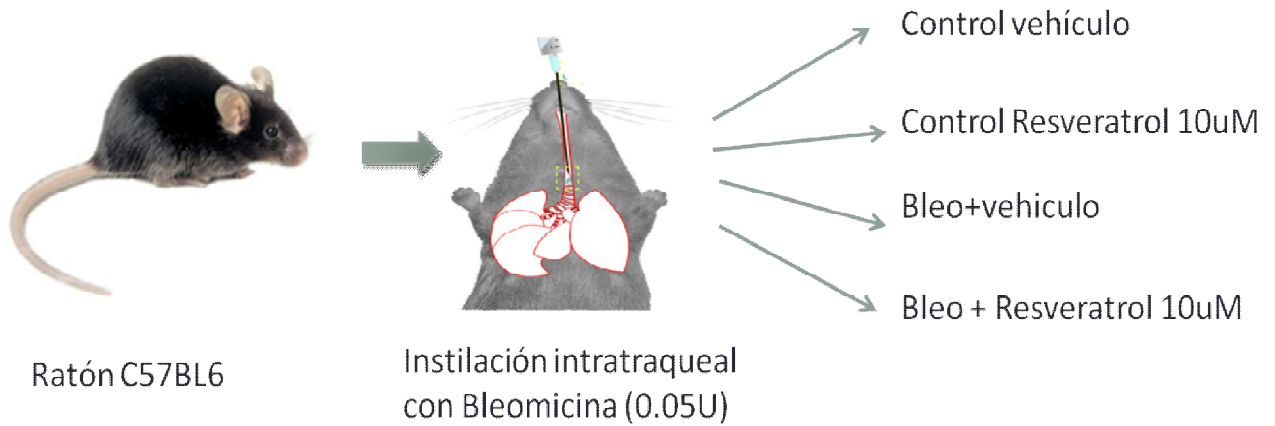


**Fig. 9. Modelo experimental de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.** La instilación con bleomicina induce apoptosis del epitelio alveolar. De 0 a 7 días se observa un infiltrado de células inflamatorias. A partir de los 7 días se da la migración y proliferación de fibroblastos los cuales depositan moléculas de la matriz extracelular exacerbando la respuesta fibrosante.

### **Grupos experimentales.**

- 1- Control + vehículo:  
Ratones instilados con solución salina y tratados vía i.p. con solución salina.
- 2- Control + resveratrol:  
Ratones instilados con solución salina y tratados vía i.p. con resveratrol 10uM (dosis de 2.2824 mg/kg).
- 3- Bleomicina + vehículo:  
Ratones instilados con bleomicina y tratados vía i.p. con solución salina.
- 4- Bleomicina + Resveratrol:  
Ratones instilados con bleomicina y tratados vía i.p. con resveratrol 10uM (dosis de 2.2824 mg/kg).

i.p. = vía intraperitoneal.

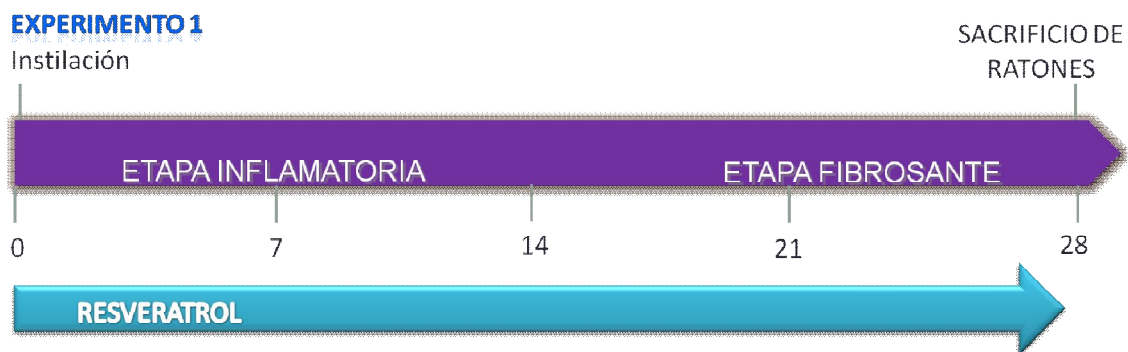


**Fig. 10. Grupos experimentales.**

Se realizaron dos experimentos con protocolos diferentes denominados **Experimento 1** (tratamiento con resveratrol desde el día 0) y **Experimento 2** (tratamiento con resveratrol a partir del día 14 después del tratamiento con bleomicina).

### **Experimento 1**

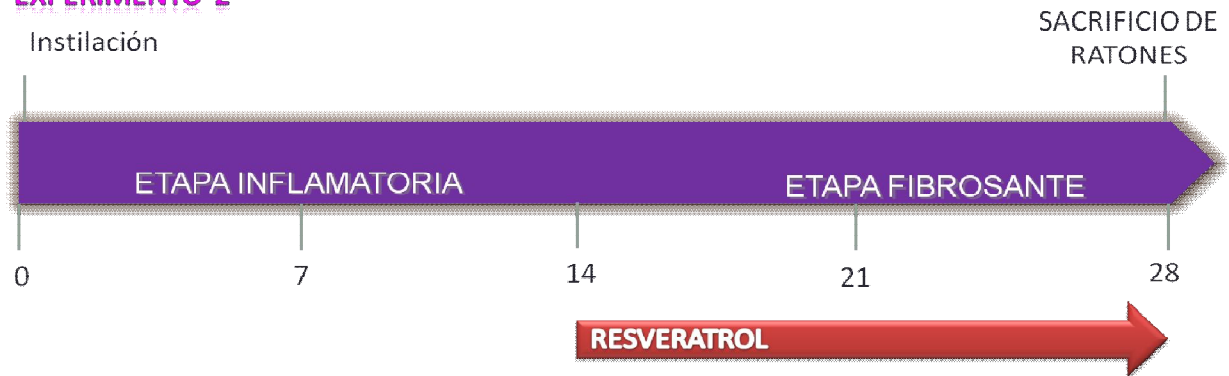
En el experimento 1, el resveratrol se empezó a administrar a partir del día 0, es decir, el mismo día de la instilación intratraqueal con bleomicina, cada tercer día se les administraba 500µl de Resveratrol (10 µM) o de solución salina dependiendo el grupo experimental (Control vehículo, Control resveratrol, Bleomicina + resveratrol, Bleomicina + vehículo). Los ratones fueron sacrificados a los 28 días.



### **Experimento 2**

En el experimento 2, el resveratrol fue administrado a partir de los 14 días post-instilación. Posteriormente, cada tercer día se les administraba 500 µl de Resveratrol (10 µM) o de solución salina dependiendo del grupo experimental (Control vehículo, Control resveratrol, Bleomicina + resveratrol, Bleomicina + vehículo). Los ratones fueron sacrificados a los 28 días.

## EXPERIMENTO 2



### ***Evaluación semicuantitativa del porcentaje de fibrosis.***

El pulmón derecho fue fijado por instilación (a través de la tráquea) a presión constante (25 cmH<sub>2</sub>O) con paraformaldehído al 4% en PBS 1x. Posteriormente el tejido fue deshidratado en alcohol etílico (30, 50, 70, 96%) y finalmente en xilol, después el tejido fue embebido en parafina y se hicieron cortes de 5µm. La extensión y grado de las lesiones, así como el porcentaje de inflamación y fibrosis, fueron evaluados después de la tinción de tricrómica de Masson y hematoxilina-eosina. El *índice de fibrosis* fue determinado al multiplicar la extensión de la lesión x el porcentaje de fibrosis, y analizado en la unidad de patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. El análisis histopatológico es un estudio “a ciegas”, es decir, el patólogo carece de información sobre los tratamientos a los que fueron sometidos los ratones, con esto se elimina alguna tendencia subjetiva en la evaluación histológica.

### ***Cuantificación de hidroxiprolina pulmonar***

La hidroxiprolina en pulmón fue cuantificada por una técnica colorimétrica (Woessner JF., 1961), el pulmón izquierdo fue homogenizado en 500µl de H<sub>2</sub>O, posteriormente el homogenado fue transferido a tubos de ensayo de cristal y se agregaron 500µl de HCl 12N, para tener una concentración final de HCl 6N. El homogenado fue incubado a 110°C durante 18hrs, esto para permitir la degradación hasta aminoácidos de las proteínas en las muestras. Posteriormente se preparó una alícuota de 5µL de cada muestra y se mezcló con 5µL de buffer de citratos (pH 6.0), a los cuales se les agregó 100 µL de cloramina T y 100 µL del reactivo de Elrich, la mezcla fue incubada a 65 °C por 15 minutos para favorecer la reacción de oxidación. Las muestras fueron leídas a 550 nm.



### ***Extracción y cuantificación de proteína.***

El pulmón izquierdo fue homogenizado en 500µL de buffer RIPA (1X RIPA Buffer: 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 1% NP-40), utilizando un homogenizador a máxima velocidad. El homogenado fue centrifugado a 14 000 rpm a 4°C por 15 minutos. El sobrenadante se recolectó en un tubo nuevo, y se tomó una alícuota de este extracto para la cuantificación de proteína. Se utilizó el reactivo Pierce BCA Protein Assay Kit Thermo Scientific, un reactivo de ensayo compatible con los detergentes utilizados para extraer proteína. Se midió a 562 nm y la concentración total de proteína se cuantificó en comparación con una curva estándar de la proteína albúmina. Todas las muestras fueron ajustadas a 2µg/µL y preparadas con loading buffer (buffer de carga) para los ensayos de western blot.

### ***Monitoreo del flujo de autofagia en el pulmón de ratones tratados con bleomicina y tratados con el inductor de autofagia resveratrol.***

Se evaluó el nivel de autofagia en extracto de proteínas derivado del pulmón de ratones tratados con bleomicina y tratadas con vehículo o con resveratrol por Western Blot utilizando un anticuerpo específico anti-LC3, tanto en condiciones basales como después del daño inducido con bleomicina. La conversión de la forma LC3-I a LC3-II indica que se ha inducido autofagia. El peso molecular de la forma LC3-II (la forma conjugada con PE) es mayor que LC3-I, teniendo un peso molecular aparente de 14kDa, menor a LC3-I de 16 kD, debido a su extrema hidrofobicidad. La cantidad de LC3-II correlaciona con el número de autofagosomas formados, por lo tanto en un inmunoblot, un aumento en la intensidad de la banda de LC3-II respecto a la banda correspondiente a LC3-I indica un aumento en el flujo de autofagia. Se realizó un análisis por densitometría para comparar la relación de la forma LC3-I vs LC3-II y se normalizó con β-tubulina.

### ***Western blot o inmunoblot.***

Para determinar el nivel de las proteínas LC3 descritas anteriormente, todas las muestras fueron ajustadas a una concentración de proteína de 2µg/µL, y fueron desnaturizadas con β-mercaptoetanol incubando las muestras a 100°C durante 15 minutos. Se cargaron 10 µL de muestra (20µg de proteína) de cada muestra en geles de acrilamida al 13%, usando como marcador de pesos moleculares el protein ladder pre-stained (Gibco) en el primer pozo. Después de la electroforesis, los geles se electro-transferieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore), y a continuación, las membranas se bloquearon con leche libre de grasa al 3% TBS-T 1X (TBS con 0,05% de Tween 20) y se incubaron durante toda la noche a 4 ° C con los

siguiente anticuerpos primarios diluidos en 3% de leche sin grasa: anti-SQSTM1/p62 (SIGMA P0067), anti-LC3 (SIGMA L7543), anti- $\beta$ -tubulina (Santa Cruz, sc-10586). Después de tres lavados con TBS-T 1X, las membranas se incubaron con su correspondiente anticuerpo secundario en una dilución 1:3000 en la leche 3% en TBS-T 1X, y fueron lavados con TBS-T 1X (cada lavado de 10 minutos), la actividad quimioluminiscente se generó utilizando el kit, Substrate Luminol Reagent + Immobilon™ Western HRP Substrate Peroxide Solution P (Millipore, P36599A) los componentes se mezclaron volumen: volumen (1:1), y la solución fue agregada a la membrana previamente lavada. La imagen fue capturada en el equipo Chemidoc (BioRad, condiciones chemi-high sensitivity). Los análisis de densitometría y la cuantificación de la intensidad de las bandas (intensidad /mm<sup>2</sup>) fueron realizados con el software QuantityOne (BioRad).

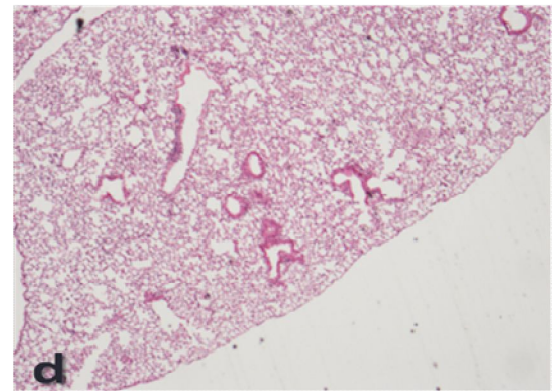
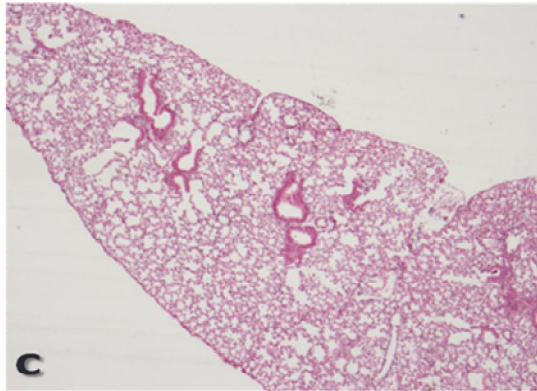
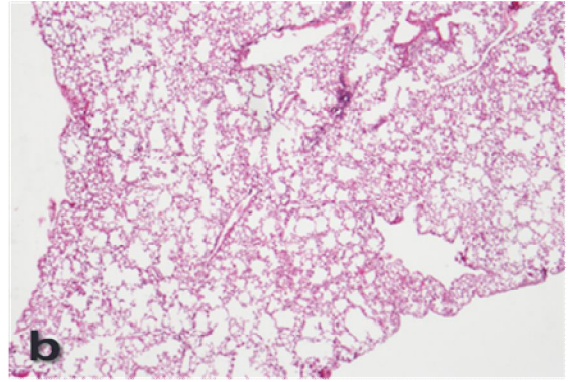
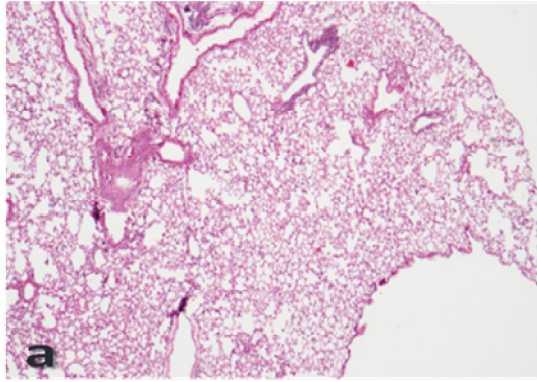
### ***Análisis estadístico.***

Los resultados mostrados en esta tesis están representados como el promedio  $\pm$  error estándar. Las variables presentadas en este trabajo son cuantitativas y discretas, ya que se les asignó un valor a los parámetros histológicos de grado, extensión y porcentaje de fibrosis, por lo que los valores fueron sometidos a la prueba paramétrica "t de student", considerando un valor de  $p \leq 0.05$  como estadísticamente significativo y las diferencias fueron representadas con el símbolo \*.

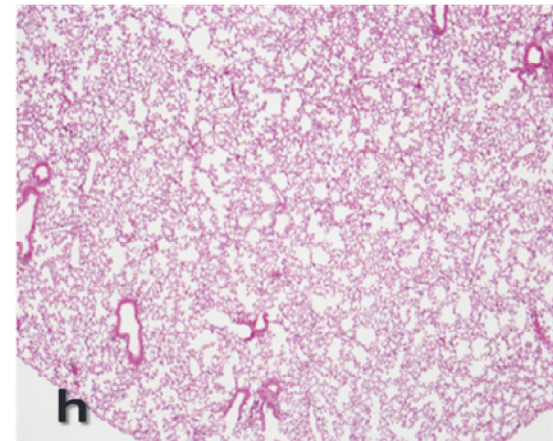
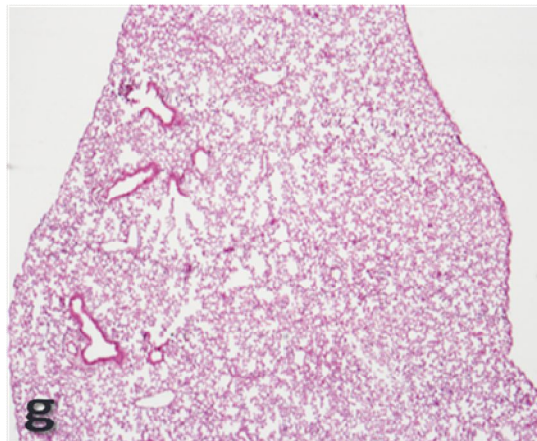
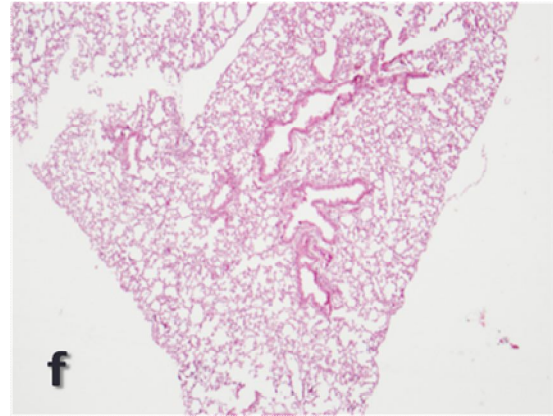
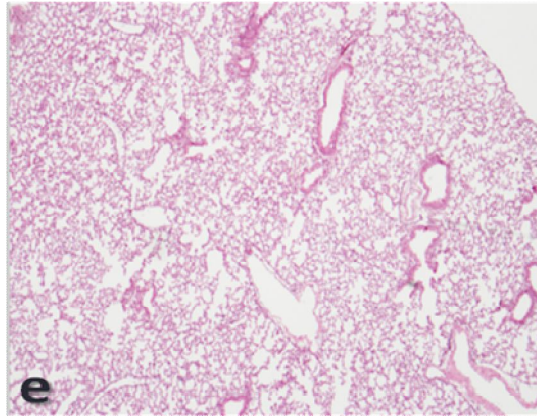
### ***Evaluación del efecto del resveratrol en ratones no tratados con bleomicina (controles + resveratrol).***

Inicialmente evaluamos la morfología del pulmón en ratones instilados intratraquealmente con solución salina y además inyectados vía i.p. con solución salina (n=6). No observamos cambios en la histología pulmonar, indicando que la traquetomía y las inyecciones periódicas de solución salina, no tienen ningún efecto tóxico en el pulmón. Para evaluar si el tratamiento con resveratrol ejercía algún cambio en la morfología del pulmón en los ratones, se administró por vía intraperitoneal 500µl de resveratrol (10µM) en ratones que no fueron instilados con bleomicina (n=3). Esta administración fue periódica, es decir, cada tercer día y los controles fueron sacrificados a los 28 días. No se encontraron diferencias morfológicas en los pulmones de los ratones tratados con resveratrol, los espacios alveolares se encuentran preservados, y no se observa infiltrado de células inflamatorias, ni depósito de colágena en el parénquima pulmonar. Esto demuestra que la administración de resveratrol o solución salina por si solos, no ejercen cambios en la morfología del parénquima pulmonar, ni tienen efectos citotóxicos (fig. 11-12)

**CONTROL + VEHÍCULO**



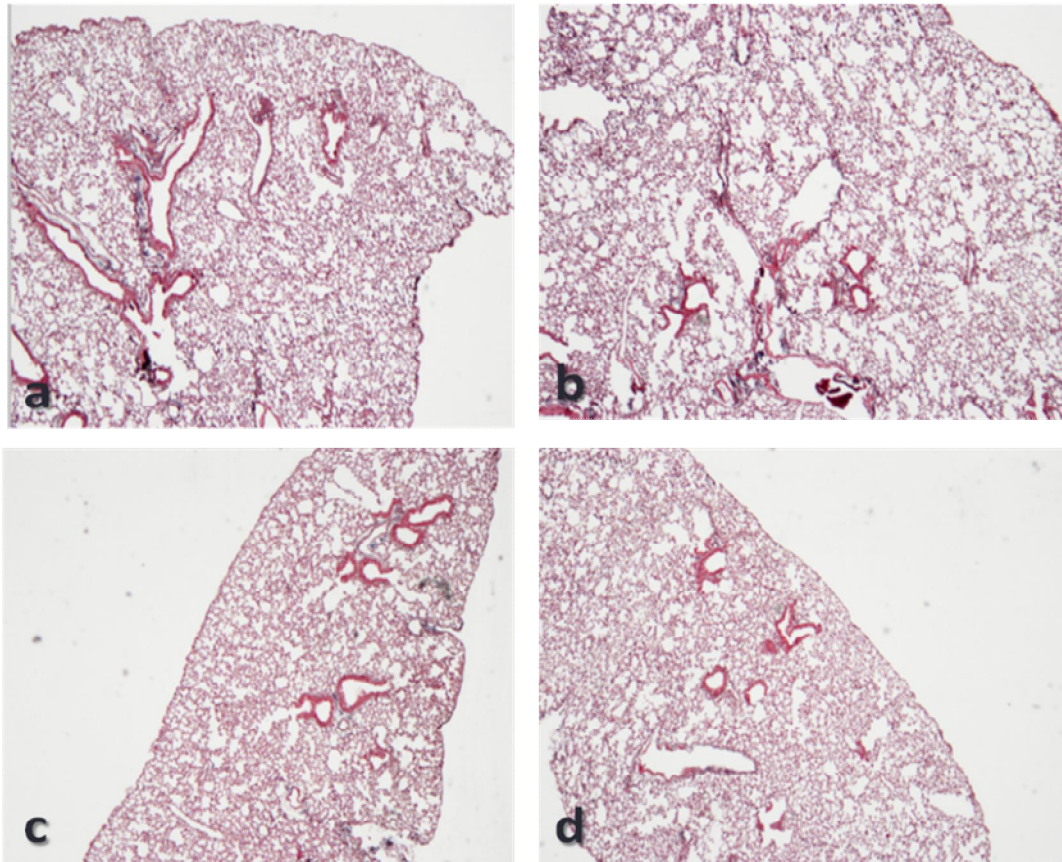
**CONTROL + RESVERATROL**



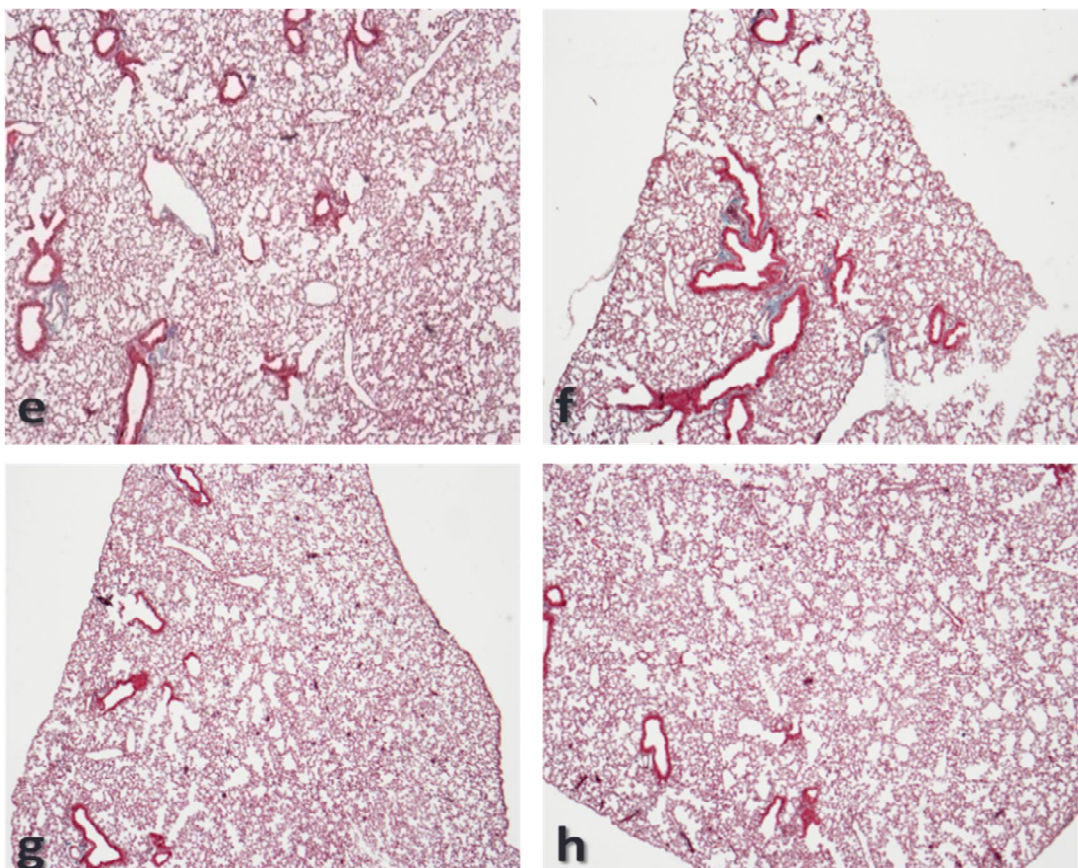
**Fig. 11. Imágenes representativas de pulmones de ratones control obtenidos a los 28 días. a),b),c),d),** representan al grupo vehículo. e),f),g),h), representan al grupo tratado con resveratrol. Ambos grupos fueron instilados solo con solución salina y no se observan cambios morfológicos en la arquitectura del pulmón. Tinción: hematoxilina y eosina. 4X.



**CONTROL + VEHÍCULO**



**CONTROL + RESVERATROL**



**Fig. 12. Imágenes representativas de pulmones de ratones control obtenidos a los 28 días. . a),b),c),d),** representan al grupo vehículo. e),f),g),h), representan al grupo tratado con resveratrol. Ambos grupos fueron instilados con solución salina y no se observan cambios morfológicos en la arquitectura del pulmón. Tinción: Tricrómica de Masson. 4X.

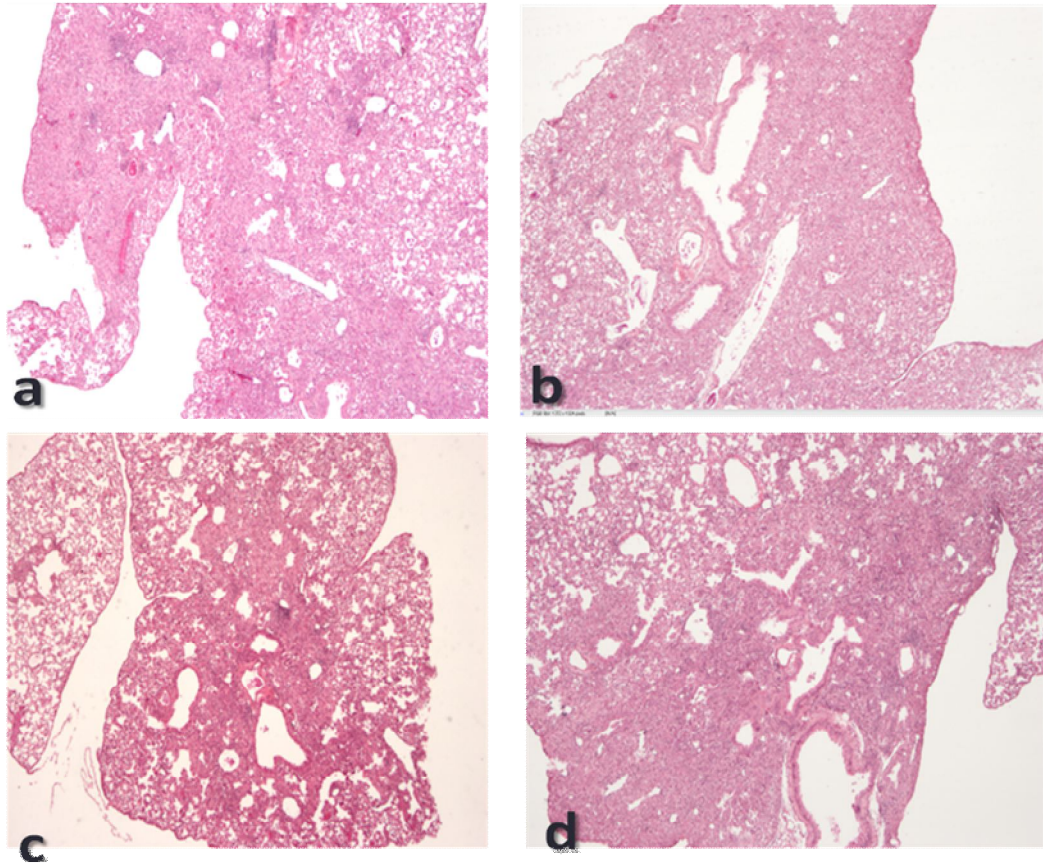
## **Experimento 1: Ratones instilados intratraquealmente con bleomicina y tratados con resveratrol desde el día 0.**

### ***Cambios histológicos post-instilación con bleomicina.***

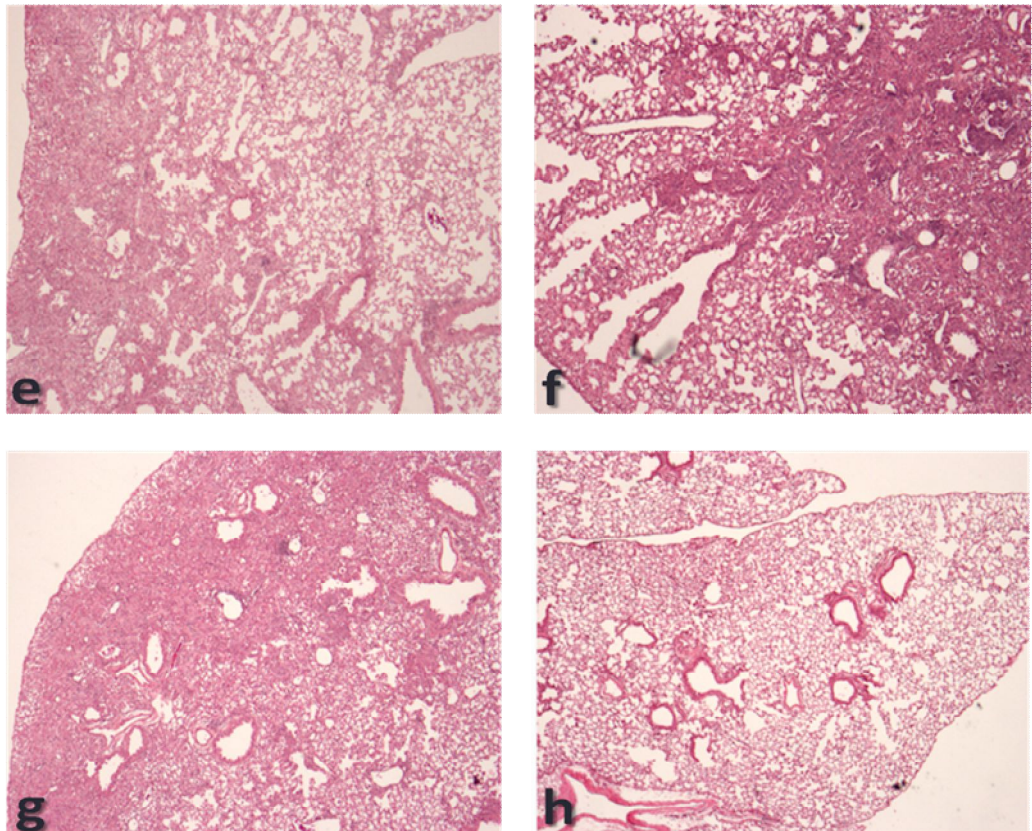
La instilación intratraqueal de bleomicina es la vía más común de administración y produce daño directo al epitelio alveolar provocando la liberación de citocinas y factores de crecimiento que funcionan como quimioatrayentes de células inflamatorias y fibroblastos. La etapa fibrótica persiste hasta 3-4 semanas después de la instilación con bleomicina y se caracteriza por el depósito excesivo de matriz extracelular, causando áreas de fibrosis. Sin embargo, después de este período, hay estudios que apoyan una resolución espontánea de la fibrosis y el retorno del pulmón a un estado fisiológico con fibrosis mínima. Debido a lo anterior, los ratones son generalmente sacrificados a los 28 días después del daño inducido con la bleomicina (Moore & Hogaboam, 2008; Mouratis & Aidinis, 2011). En el análisis histopatológico después de 28 días post-instilación, se observaron focos de fibrosis difusos en los pulmones, tanto de los ratones instilados con bleomicina y tratados con vehículo (n= 6) como en los tratados con resveratrol (n= 5) (fig. 13). Estos focos de fibrosis estaban caracterizados por la presencia de fibroblastos y miofibroblastos, y por el depósito de fibras de colágena. Interesantemente, la extensión del daño pulmonar en los ratones tratados con resveratrol, fue significativamente menor, indicando que este inductor de autofagia tiene un efecto protector, sin embargo, no previno completamente el desarrollo de fibrosis. El análisis de los tejidos teñidos con la tinción Tricrómica de Masson, refleja que el depósito de colágena en los pulmones de los ratones tratados con vehículo fue mayor que en el pulmón de los ratones tratados con resveratrol, a los 28 días post-instilación (fig.14).



**BLEOMICINA + VEHÍCULO**



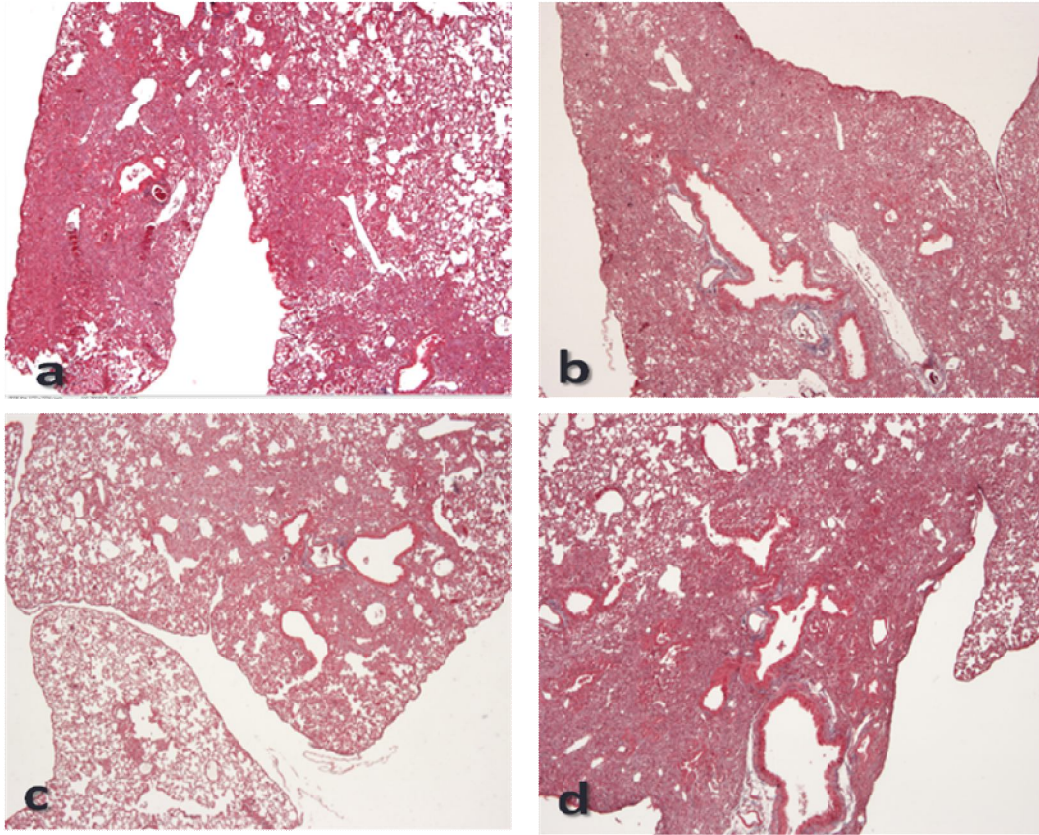
**BLEOMICINA + RESVERATROL**



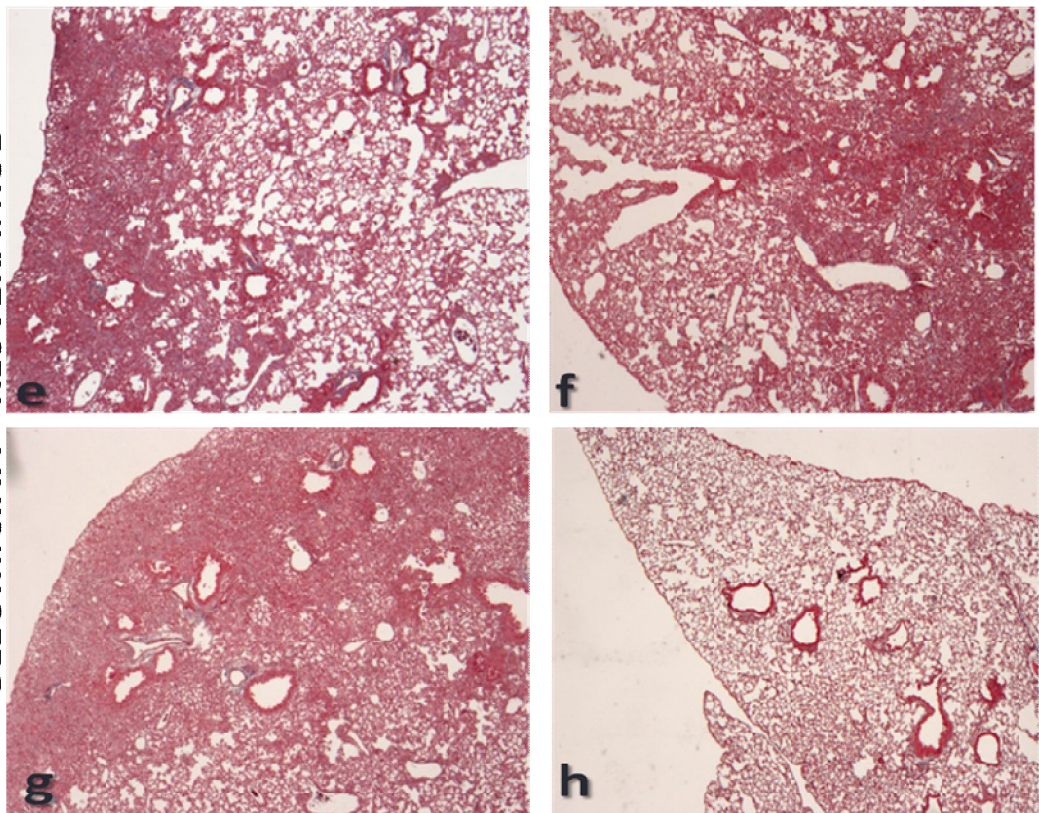
**Fig. 13. Imágenes representativas de pulmones obtenidos a los 28 días post-institución. a),b),c),d),** representan al grupo instilado con bleomicina y tratado con vehículo. e),f),g),h), representan al grupo instilado con bleomicina y tratado con resveratrol. Tinción: hematoxilina y eosina. 4X.



**BLEOMICINA + VEHÍCULO**



**BLEOMICINA + RESVERATROL**



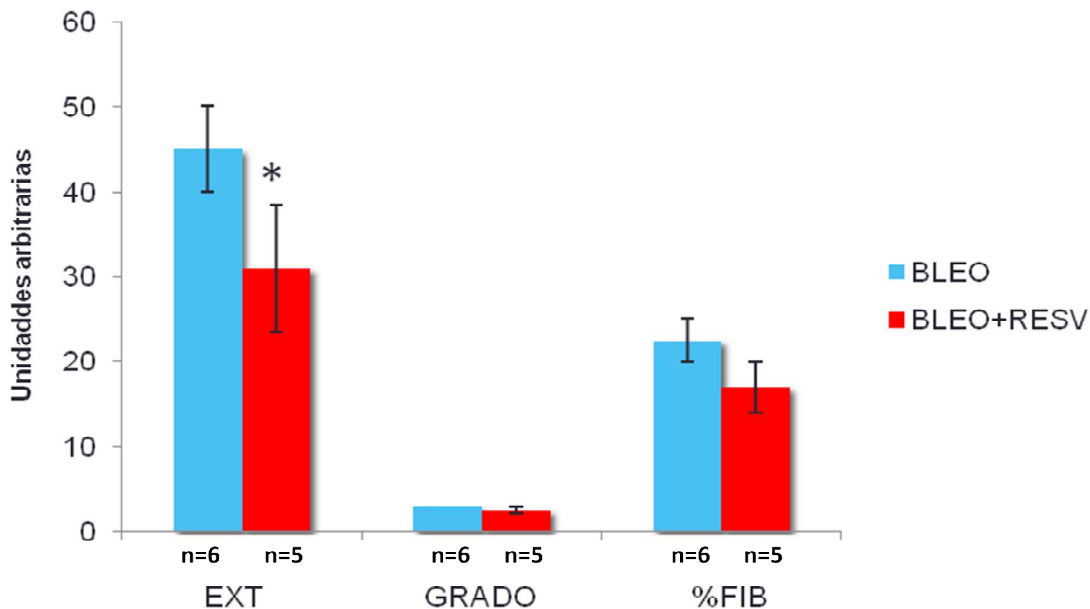
**Fig. 14. Imágenes representativas de pulmones obtenidos a los 28 días post-instilación. a),b),c),d),** representan al grupo instilado con bleomicina y tratado con vehículo. e),f),g),h), representan al grupo instilado con bleomicina y tratado con resveratrol. Tinción: Tricrómica de Masson. 4X.



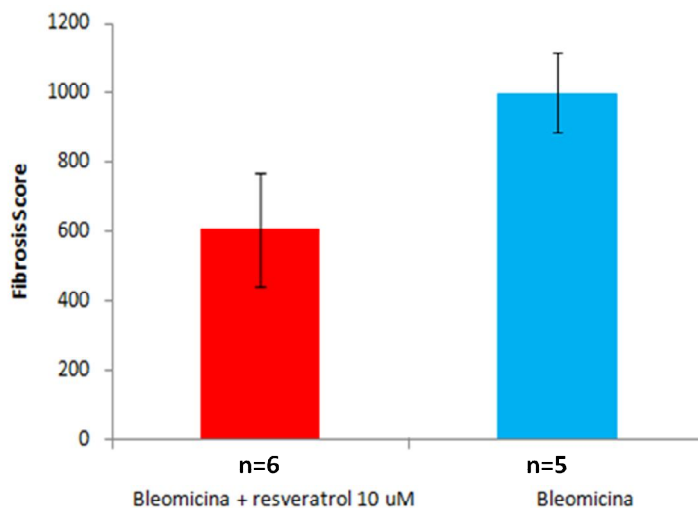
### ***Análisis histopatológico semicuantitativo.***

Además, para analizar el efecto que tuvo el tratamiento con resveratrol después del daño con bleomicina se realizó un análisis semicuantitativo de los cambios morfológicos en el pulmón evaluando diferentes parámetros como la extensión del daño pulmonar, el grado (1= pulmón normal, 2=daño moderado, formación de pequeños focos de fibrosis, 3=distorsión severa del parénquima pulmonar y grandes áreas con fibrosis y depósito de fibras de colágena) y el porcentaje de fibrosis. Se evaluó el pulmón derecho por microscopía de luz, el área total del tejido fue considerada como 100%, y el porcentaje del área con cambios morfológicos fue considerado como extensión del daño (0%= pulmón normal, 80% a 100%= fibrosis severa).

Al comparar ambos grupos, obtuvimos que los ratones tratados con bleomicina+vehículo, tuvieron valores promedio de 45% de extensión de daño. Los ratones a los que les fue administrado el resveratrol después del daño con bleomicina obtuvieron un valor promedio de 31% en la extensión (fig. 15). No se encontraron diferencias significativas en el grado y porcentaje de fibrosis entre ambos grupos (grado  $3 \pm 0$  vs  $2.6 \pm 0.4$ ; fibrosis  $22.5 \pm 2.5$  vs.  $17 \pm 3$ ); sin embargo, el área de las lesiones pulmonares en el grupo tratado con resveratrol mostró una disminución significativa del daño comparado con el grupo bleo + vehículo ( $45 \pm 5\%$  vs.  $31 \pm 7.48\%$ ;  $p < 0.05$ ) (fig. 15). Por otra parte, se evaluó el índice de fibrosis de ambos grupos el cual fue obtenido al multiplicar la extensión de las lesiones pulmonares por el porcentaje de fibrosis. Los ratones a los que se les administró resveratrol obtuvieron un índice total de 605, mientras aquellos animales que fueron tratados con vehículo tuvieron un índice de 1000. Aunque el índice en el grupo tratado con resveratrol fue menor en comparación con el grupo tratado con vehículo ( $605 \pm 162.86$  vs  $1000 \pm 115.47$ ), esta diferencia no alcanzó significancia (fig.16).



**Fig. 15. Evaluación de los parámetros histológicos experimento 1.** La extensión, el grado y el porcentaje de fibrosis de ambos grupos experimentales fueron evaluados por separado. En el grado y porcentaje de fibrosis no se observaron diferencias significativas entre el grupo de bleomicina + vehículo y el grupo de bleomicina + resveratrol grupos (grado  $3 \pm 0$  vs  $2.6 \pm 0.4$ ; porcentaje  $22.5 \pm 2.5$  vs.  $17 \pm 3$  respectivamente). En la extensión del daño los ratones tratados con resveratrol mostraron una disminución significativa de las lesiones pulmonares comparadas con el grupo de bleomicina + vehículo ( $45 \pm 5$  vs.  $31 \pm 7.48$ ) ( $n=11$ ,  $p<0.05$ ).



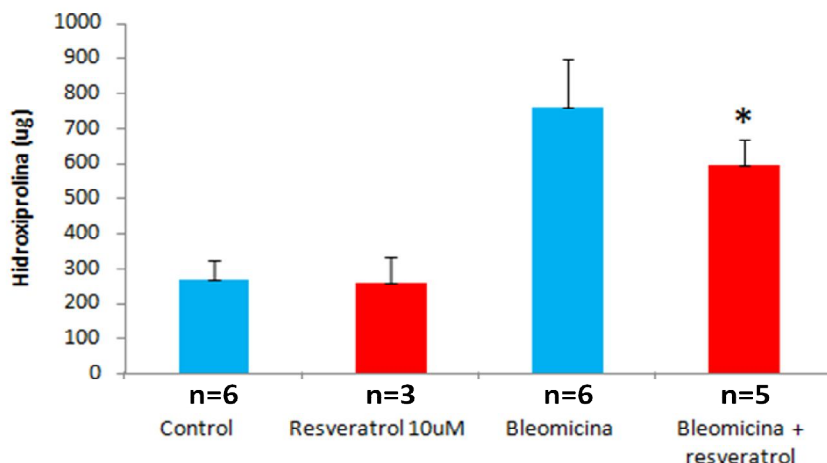
**Fig. 16. Análisis del índice de fibrosis.** Para obtener el índice de fibrosis, se multiplica la extensión del daño por el porcentaje de fibrosis. El grupo tratado con resveratrol obtuvo un índice de  $605 \pm 162.86$ , mientras que el grupo tratado con vehículo obtuvo un índice de  $1000 \pm 115.47$ . No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $n= 11$ ).

### **Nivel de hidroxiprolina pulmonar.**

Para poder cuantificar el contenido de colágena en el pulmón además del análisis histológico, también se analizó el nivel de hidroxiprolina en el pulmón izquierdo, este iminoácido se deriva casi totalmente de la colágena y es utilizada como un biomarcador para cuantificar el contenido total de colágena en el pulmón. El contenido de hidroxiprolina fue analizado en los ratones control, tratados con resveratrol o solución salina, y en ratones instilados con bleomicina, tratados con resveratrol o solución salina.

Observamos que la administración de solución salina o resveratrol no ejerce cambios en los niveles de hidroxiprolina ( $267.55 \pm 22.86$  y  $258.73 \pm 43.08$   $\mu\text{g/pulmón}$  respectivamente); por lo que se demuestra que en aquellos ratones control, el tratamiento con resveratrol o solución salina no produce cambios en el contenido de hidroxiprolina pulmonar (fig. 17).

Por otro lado, la instilación con bleomicina provocó un incremento significativo en los niveles de hidroxiprolina en el pulmón comparado con los grupos controles, esto indica que efectivamente, la bleomicina está causando daño al epitelio alveolar, lo que esta desencadenando una respuesta fibrosante y la acumulación de colágenas fibrilares. El grupo bleomicina + vehículo tuvo una concentración de hidroxiprolina de  $762.06 \pm 54.75$   $\mu\text{g/pulmón}$  en comparación con el grupo bleomicina + resveratrol que tuvo una concentración de hidroxiprolina de  $595.61 \pm 32.80$   $\mu\text{g/pulmón}$ , estos datos indican que el tratamiento con resveratrol disminuyó significativamente el contenido de hidroxiprolina pulmonar, lo que refleja que la severidad de la fibrosis y la acumulación de colágena es menor en los ratones tratados con resveratrol (fig. 17).



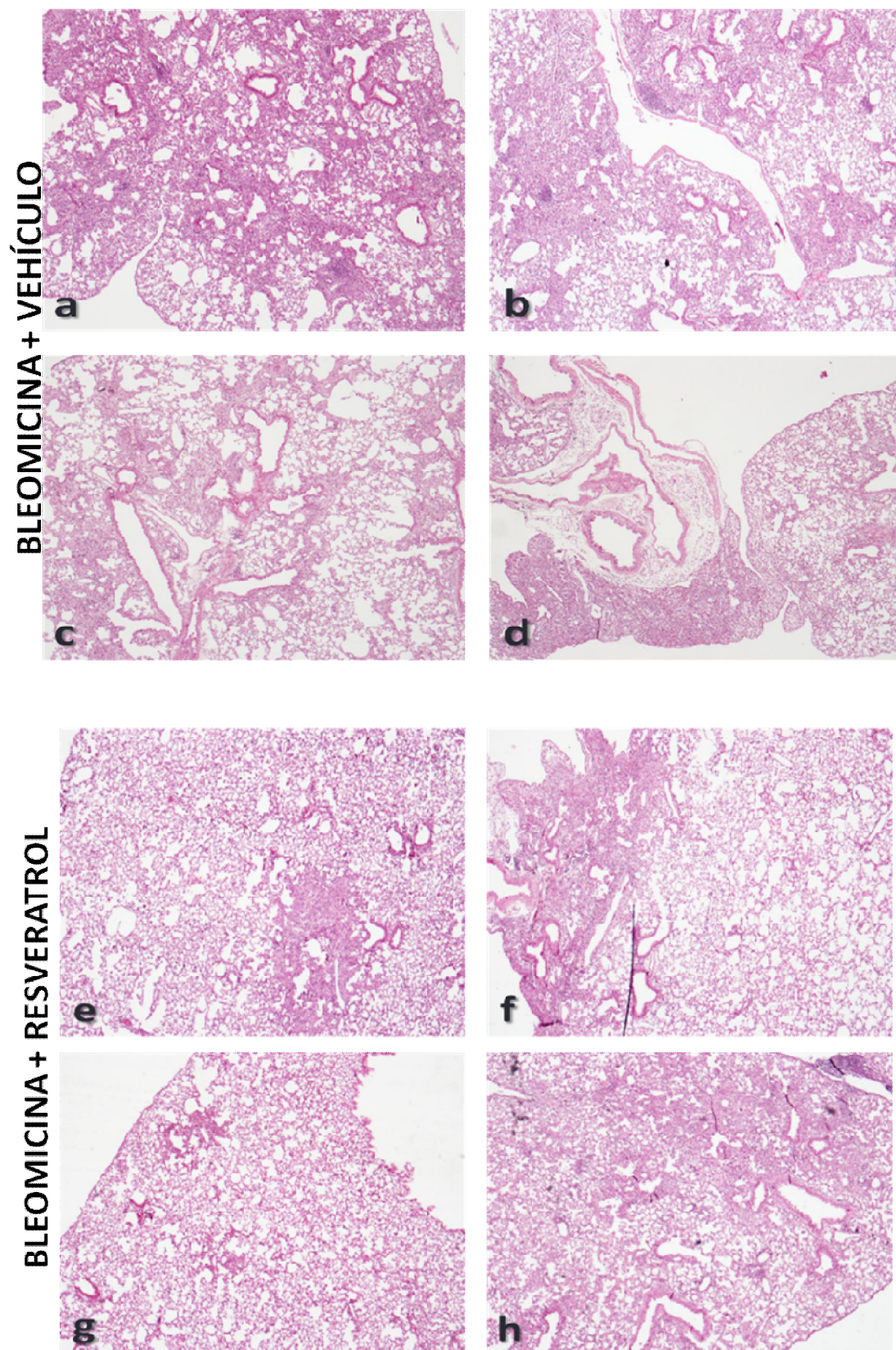
**Fig. 17. Niveles de hidroxiprolina pulmonar.** El tratamiento con resveratrol o solución salina en ratones no instilados no ejerció cambios en los niveles de hidroxiprolina pulmonar. La instilación con bleomicina incrementó los niveles de hidroxiprolina en el pulmón. Tras el tratamiento con resveratrol, el contenido de hidroxiprolina pulmonar disminuyó significativamente ( $n=20$   $p<0.05$ ). 48

## **Experimento 2 (tratamiento con resveratrol a partir del día 14 después de la instilación con bleomicina).**

El protocolo del experimento 2, se estableció con el objetivo de evaluar el efecto del resveratrol, una vez establecida la fibrosis pulmonar, para determinar, si la inducción de autofagia, podía promover la resolución de la fibrosis, ya que como se ha mencionado previamente, la respuesta fibrosante se establece desde la semana 2 (14 días) post-tratamiento y persiste hasta la 3 o 4 semana. De igual manera que en el experimento 1, se analizó el efecto que tuvo el tratamiento con resveratrol en el pulmón los ratones instilados con bleomicina a los cuales se les empezó a administrar el tratamiento de resveratrol o solución salina a partir del día 14 post-instilación. Como se describió previamente, el tratamiento con bleomicina resultó en cambios en la morfología del pulmón, caracterizados por la presencia de focos de fibrosis difusos, en donde observamos fibroblastos y miofibroblastos, depósito de fibras de colágena y por un infiltrado de células inflamatorias como macrófagos y linfocitos (n=6) (fig.18). Sin embargo, la mayoría de los ratones tratados con resveratrol, presentaron menor porcentaje de las lesiones pulmonares, en comparación con aquellos solo tratados con vehículo (n= 8).

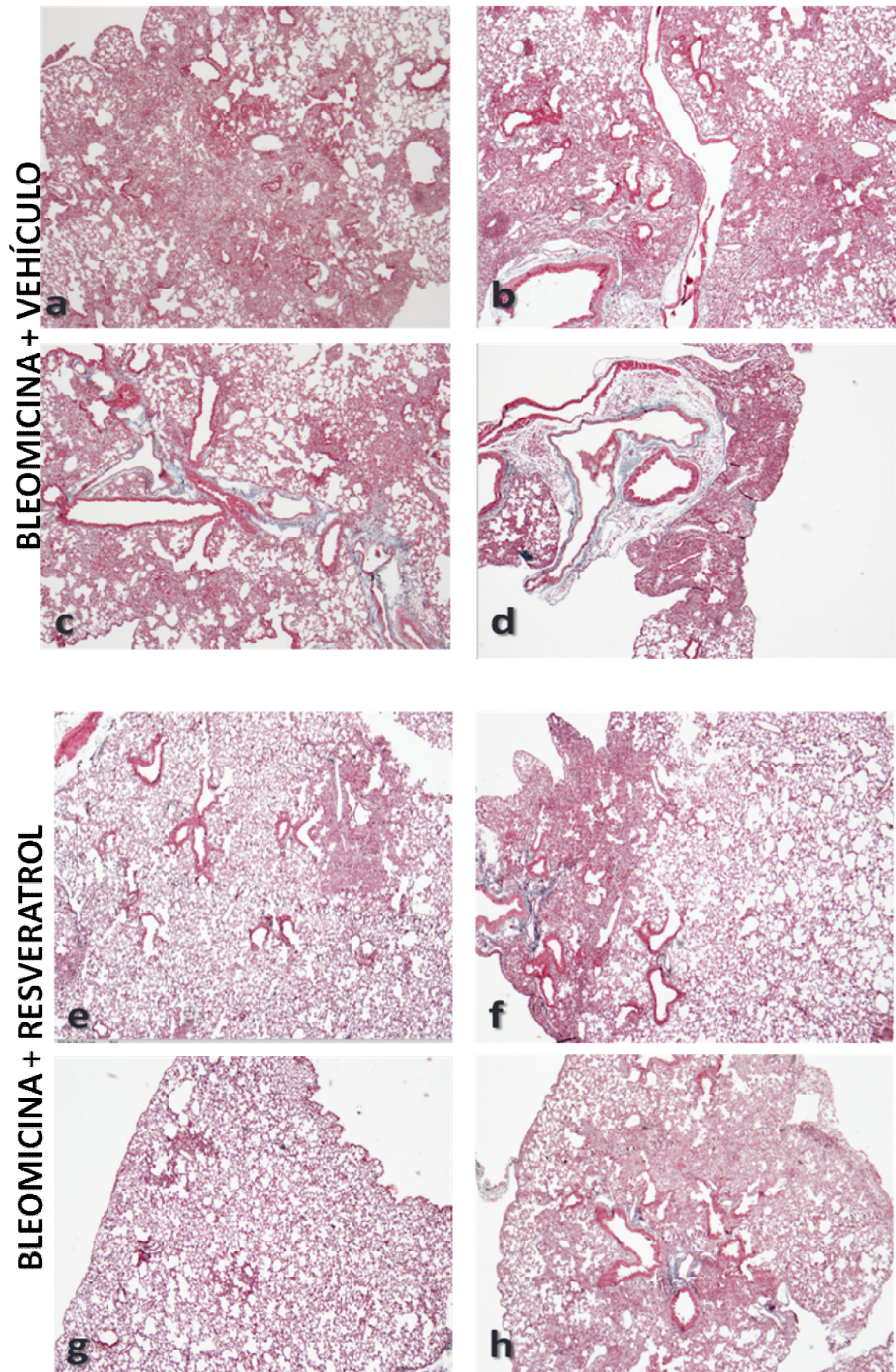
En la tinción con Tricrómica de Masson, observamos que a los 28 días post-instilación, en los pulmones de los ratones tratados con vehículo, el depósito de fibras de colágena fue mayor que en los pulmones del grupo tratado con resveratrol (fig.19). Además se realizó el análisis semicuantitativo de los cambios morfológicos en el pulmón evaluando los diferentes parámetros antes mencionados.

No se encontraron diferencias significativas en la extensión y grado de fibrosis entre el grupo tratado con resveratrol a partir del día 14 post-bleomicina y el grupo de bleomicina + vehículo (extensión  $36.25 \pm 8.64$  vs  $40 \pm 4.47$ ; grado  $2 \pm 0.32$  vs.  $2.6 \pm 0.21$  respectivamente); sin embargo, el grupo tratado con resveratrol mostró una disminución significativa del porcentaje de fibrosis comparada con el grupo de Bleomicina + vehículo ( $17.5 \pm 5.26\%$  vs.  $35 \pm 2.23\%$  respectivamente) (fig. 20). Al obtener el índice de fibrosis, el grupo tratado con resveratrol muestra una disminución significativa del índice de fibrosis comparado con el grupo tratado con vehículo ( $887 \pm 356.28$  vs.  $1433.33 \pm 221.61$ ) ( $p < 0.05$ ) (fig. 21).

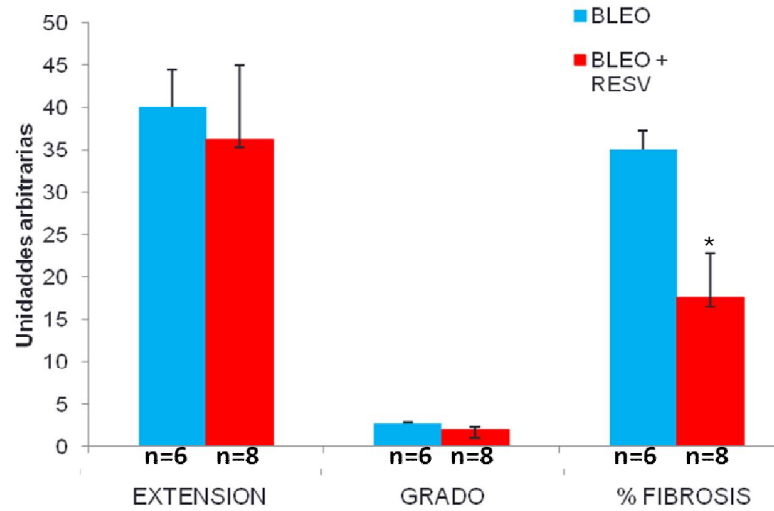


**Fig. 18. Imágenes representativas de pulmones obtenidos a los 28 días post-instilación.** a),b),c),d), representan al grupo instilado con bleomicina y tratado con vehículo. e),f),g),h), representan al grupo instilado con bleomicina y tratado con resveratrol a partir del día 14 post-bleomicina. Tinción: hematoxilina y eosina. 4X.

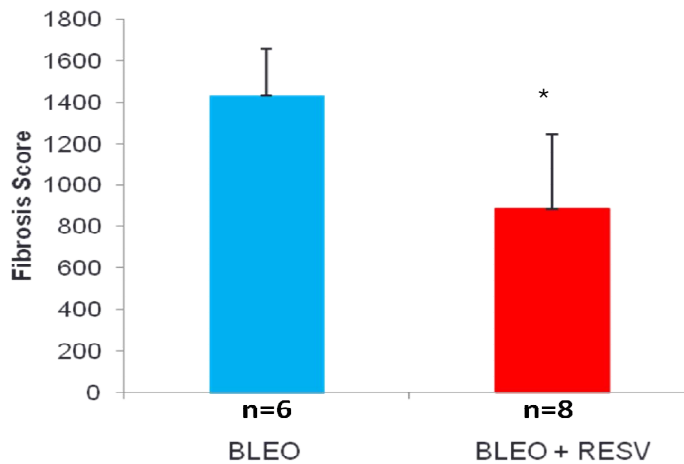




**Fig. 19. Imágenes representativas de pulmones obtenidos a los 28 días post-instilación.** a),b),c),d), representan al grupo instilado con bleomicina y tratado con vehículo. e),f),g),h), representan al grupo instilado con bleomicina y tratado con resveratrol a partir del día 14 post-bleomicina. Tinción: Tricrómica de Masson. 4X.



**Fig. 20. Evaluación de los parámetros histológicos.** La extensión, el grado y el porcentaje de fibrosis de ambos grupos experimentales fueron evaluados por separado. El grupo de bleomicina + resveratrol mostró una disminución significativa del porcentaje de fibrosis comparado con el grupo de bleomicina + vehículo ( $17.5 \pm 5.26$  vs.  $35 \pm 2.23$  respectivamente,  $p < 0.05$ ). En el grado y extensión del daño no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos grupos (extensión  $36.25 \pm 8.64$  vs  $40 \pm 4.47$ ; grado  $2 \pm 0.32$  vs.  $2.6 \pm 0.21$  respectivamente) ( $n=14$ ).

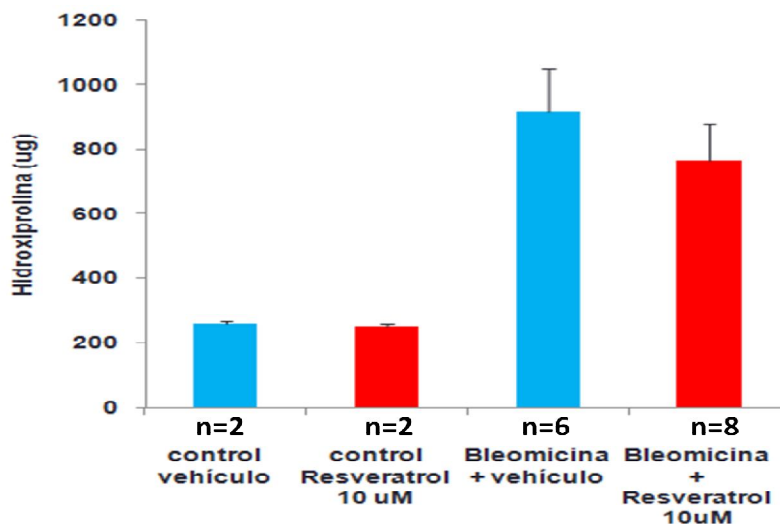


**Fig. 21. Análisis del índice de fibrosis.** El análisis para obtener el índice de fibrosis reveló que el grupo tratado con resveratrol obtuvo un índice de  $887 \pm 356.28$ , mientras que el grupo tratado con vehículo obtuvo un índice de  $1433.3 \pm 221.61$ , encontrando de esta manera diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $n=14$ ) ( $p < 0.05$ ).

### Nivel de hidroxiprolina pulmonar.

Al igual que en el *experimento 1*, se cuantificó el nivel de hidroxiprolina, como biomarcador del contenido de colágena en el pulmón después del daño con bleomicina y el tratamiento con resveratrol. El contenido de hidroxiprolina fue analizado en los ratones sin instilar y tratados con resveratrol (n=2) o solución salina (n=2) y en ratones instilados y tratados posteriormente con resveratrol (n=8) o solución salina (n=6). Observamos que la administración de resveratrol o solución salina no inducen cambios en los niveles de hidroxiprolina, con lo que se comprueba que el tratamiento con resveratrol o solución salina por si solos, no tienen efectos en el contenido de hidroxiprolina pulmonar ( $254 \pm 8.73$  vs.  $261 \pm 6.52$   $\mu\text{g}/\text{pulmón}$  respectivamente,  $p < 0.05$ ), estos datos concuerdan con los obtenidos en el *experimento 1* (fig. 22).

Tal como se esperaba, la inducción de daño con bleomicina provocó un incremento significativo en los niveles de hidroxiprolina en el pulmón, comparando con los controles, indicando que el modelo de fibrosis fue establecido adecuadamente. Cuando a los ratones les fue administrado el resveratrol a partir del día 14, después la instilación con bleomicina, se observó una disminución en el contenido de hidroxiprolina pulmonar, sin embargo esta disminución no fue estadísticamente significativa por lo que no se observaron cambios en el contenido de hidroxiprolina pulmonar entre el grupo de bleomicina + resveratrol vs. bleomicina + vehículo ( $768.50 \pm 128.94$  vs.  $919.34 \pm 131.97$   $\mu\text{g}/\text{pulmón}$  respectivamente) (fig. 22).



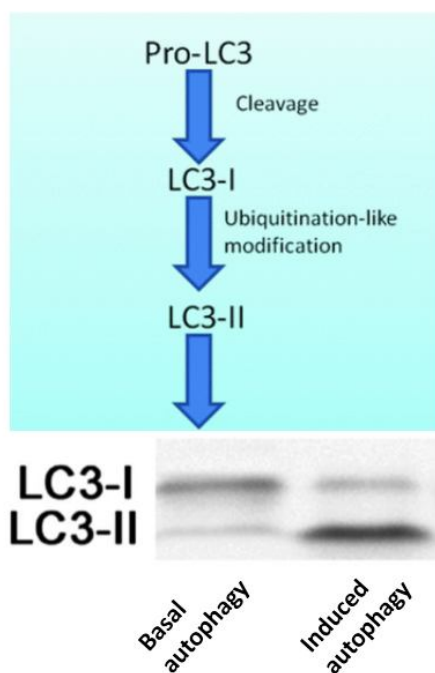
**Fig. 22. Niveles de hidroxiprolina pulmonar experimento 2.** El tratamiento con resveratrol o solución salina en ratones no instilados no ejerció cambios en los niveles de hidroxiprolina pulmonar. La instilación con bleomicina incrementó los niveles de hidroxiprolina en el pulmón. Tras el tratamiento con resveratrol a partir del día 14 post-instilación, no se observó una disminución significativa en el contenido de hidroxiprolina pulmonar (n=18)



### **Análisis del flujo autofágico en el pulmón de ratones instilados con bleomicina y tratados con el inductor de autofagia resveratrol.**

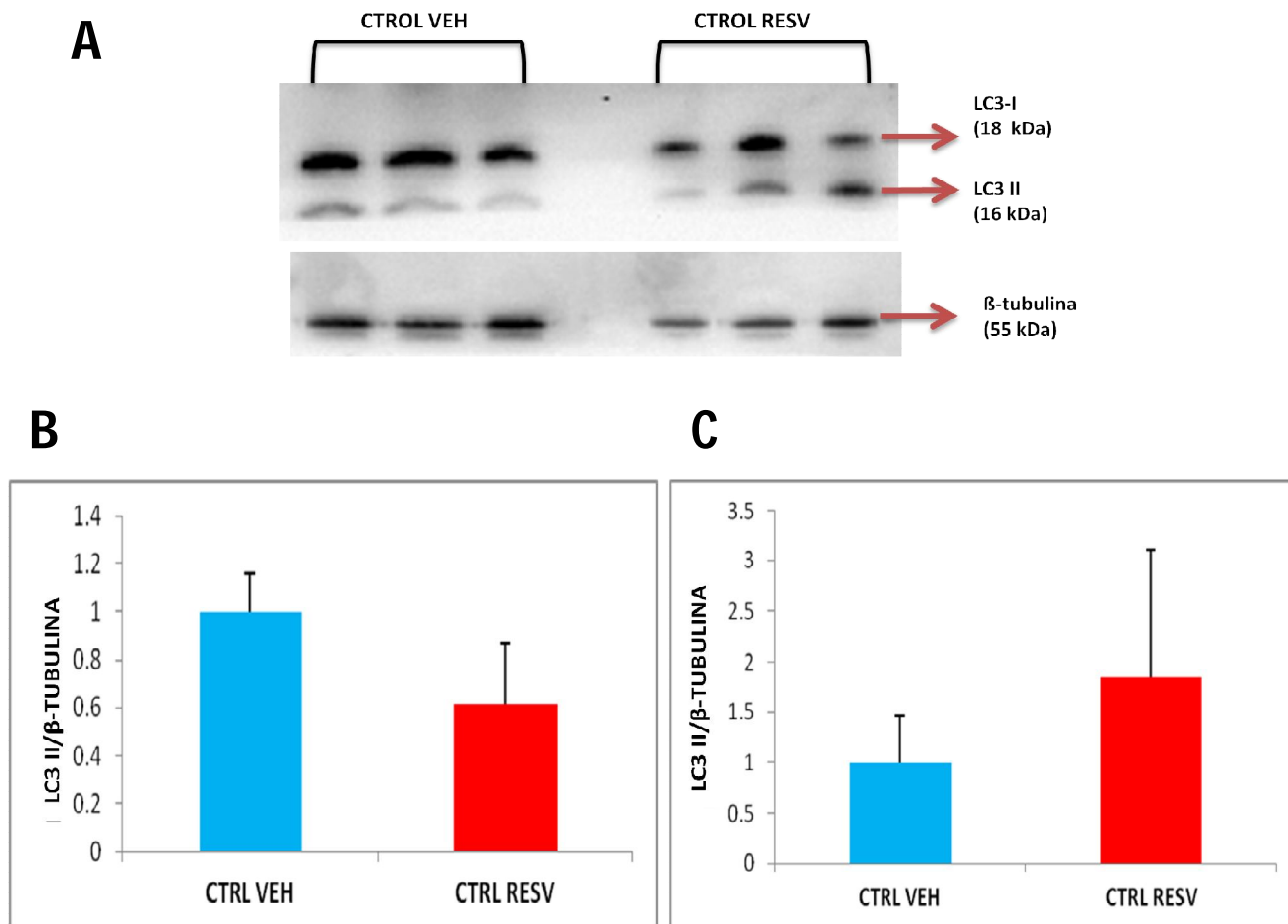
Se ha demostrado que el resveratrol es un potente inductor de la autofagia. Para evaluar el flujo de autofagia en los ratones que fueron tratados con resveratrol en el día 0 y en el día 14 después de la instilación con bleomicina, se analizó por medio de Western Blot, la presencia de LC3-II en el extracto total de proteína de pulmones de los ratones sacrificados a los 28 días, y se analizaron casos representativos de los grupos control + vehículo, control + resveratrol, bleomicina + vehículo y bleomicina + resveratrol.

Como ya se mencionó anteriormente, LC3 es sintetizado como pro-LC3, el cual sufre un corte proteolítico en el carboxilo terminal por la cisteín-proteinasa Atg4 para exponer un residuo de glicina y convertirlo a LC3-I (18 kDa) el cual será procesado por Atg7 y Atg3 para convertirlo en su forma conjugada LC3-II (16 kDa) y posteriormente se unirá a la membrana de los autofagosomas. La forma conjugada de LC3, es decir, LC3-II es la forma que se asocia específicamente con el autofagosoma y es utilizada ampliamente como un marcador para monitorear el flujo autofágico (fig. 23) (Mizushima & Komatsu, 2011).



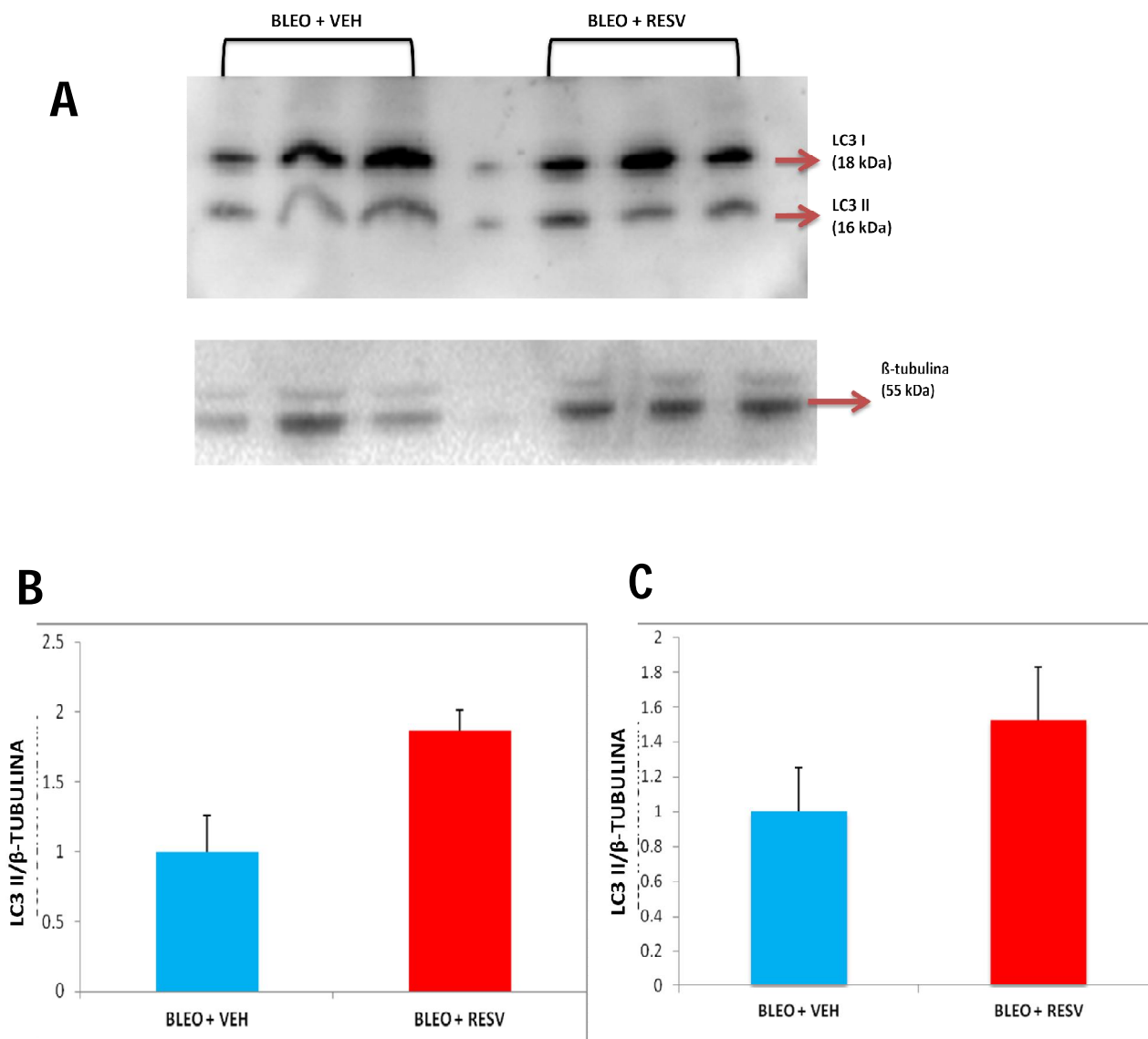
**Figura 23. Conversión de LC3-I a LC3-II.** Procesamiento de pro-LC3 por la cisteín-proteinasa Atg4 para exponer un residuo de glicina y convertirlo a LC3-I (18 kDa) banda superior en el western blot, esta forma será procesada por Atg7 y Atg3 para convertirla en su forma conjugada LC3-II (16 kDa) banda inferior.

En el pulmón de los ratones control + vehículo, se observa un nivel basal de autofagia, indicado en el Western Blot, por una ligera banda inferior de 16 kDa (LC3-II). Como se ha descrito previamente, un nivel basal de autofagia, es necesario para la eliminación fisiológica de organelos y proteínas dañadas que entran en un proceso de reciclaje. En el caso de los individuos tratados con resveratrol, observamos que la banda inferior, correspondiente a LC3-II, es más intensa, en comparación con los ratones tratados con solución salina, sobre todo en el individuo no.3. Es importante hacer notar que la banda superior, correspondiente a LC3-I, muestra una mayor intensidad y grosor en los ratones control + vehículo, en comparación con la banda superior en los ratones tratados con resveratrol, esto indica que la forma LC3-I está disminuyendo, porque se está convirtiendo en la forma conjugada LC3-II, y se está degradando en el interior del autofagolisosoma (fig. 24).



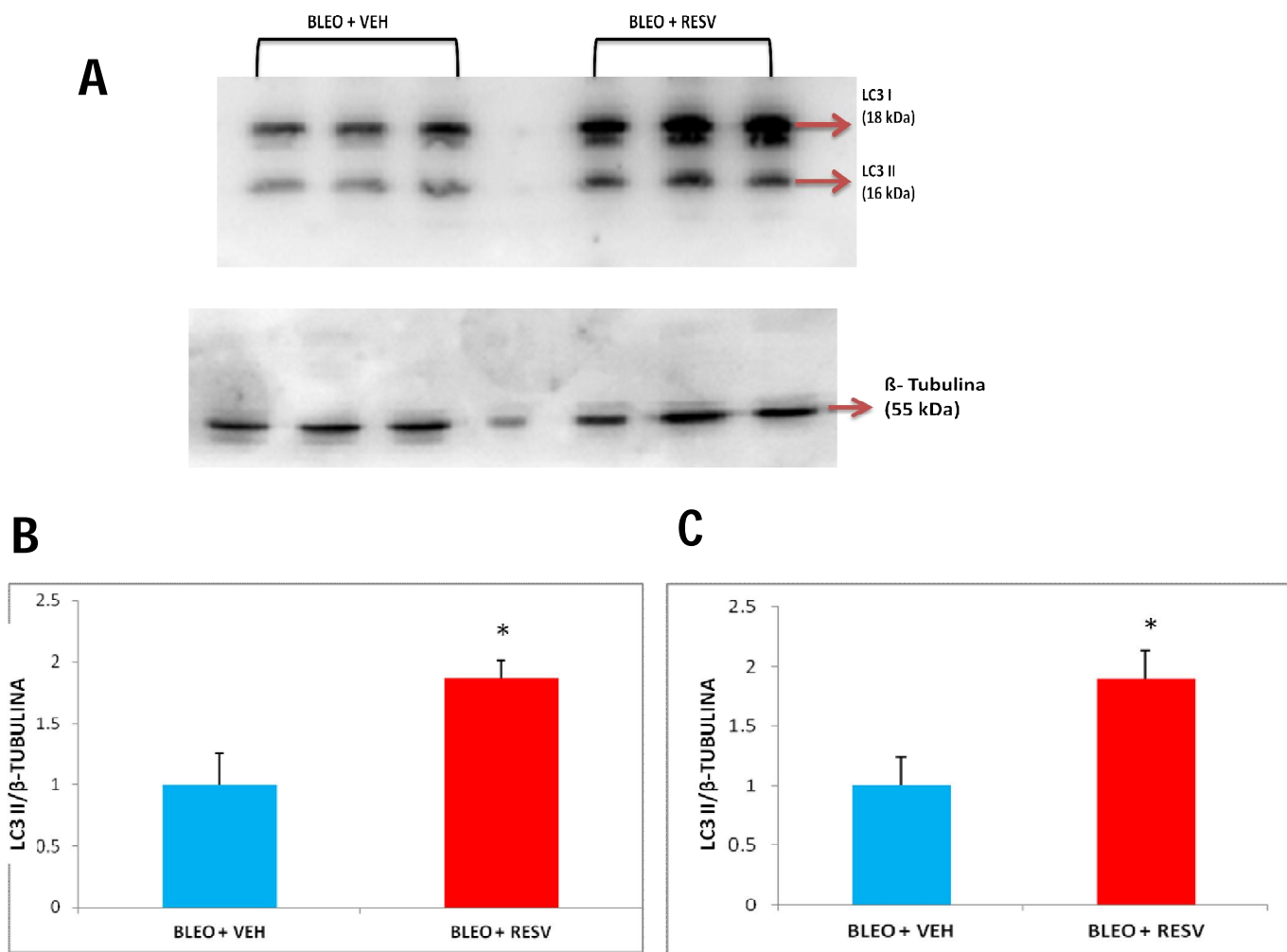
**Fig. 24. Análisis del flujo autofágico grupos control + vehículo y control + resveratrol.** A) Western Blot de lisados pulmonares de los grupos control vehículo y control resveratrol. B), C) Densitometría del Western Blot en la que se observa que los niveles de la proteína LC3 (I y II) no incrementan significativamente después de la administración con resveratrol.

Como se muestra en el Western Blot de la figura 25, los ratones que fueron instilados con bleomicina y posteriormente tratados con resveratrol a partir del día 0 mostraron un incremento en los niveles de LC3-I y LC3-II aunque no fueron estadísticamente significativos comparados con el grupo bleomicina + vehículo.



**Fig. 25. Análisis del flujo autofágico experimento 1. LC3.** A) Western Blot de lisados pulmonares de los grupos Bleomicina + Vehículo y Bleomicina + Resveratrol. B), C) Densitometría del Western Blot en la que se observa que los niveles de la proteína LC3 (I y II) incrementan aunque no de manera significativa en el grupo tratado con resveratrol.

Por otro lado, la administración del resveratrol en el día 14 indujo un incremento significativo en los niveles de LC3-I y LC3-II tal como puede observarse en la figura 26 A, mostrando con ello un probable aumento en la formación de los autofagosomas y por tanto del flujo autofágico (fig.26 B y C).



**Fig. 26. Análisis del flujo autofágico experimento 2. LC3.** A) Western Blot de lisados pulmonares de los grupos Bleomicina + Vehículo y Bleomicina + Resveratrol. C), D) Densitometría del Western Blot en la que se observa que los niveles de la proteína LC3 (I y II) incrementan de manera significativa en el grupo tratado con resveratrol ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSION

---

A pesar de los numerosos avances que existen en el estudio de la FPI, aún se desconocen muchos aspectos de la patogénesis de esta enfermedad por lo que no existe un tratamiento efectivo, y la supervivencia de los individuos diagnosticados con esta enfermedad es en promedio de 3 años (Margaritopoulos et al., 2013). Recientemente se ha propuesto a la autofagia como un mecanismo que está desregulado en la FPI y su inducción a través de diversos fármacos podría tener un efecto protector contra el desarrollo de esta enfermedad. La utilización del resveratrol en modelos de fibrosis pulmonar en ratón, aún no ha sido estudiada. Numerosas investigaciones se han centrado en la farmacocinética y metabolismo del resveratrol. En modelos animales se emplean diversas dosis de este fármaco que van desde un rango de 0.1 mg/kg hasta 1000mg/kg. No se han reportado efectos tóxicos de este polifenol, sin embargo, dependiendo la dosis empleada, el efecto que ejerce el resveratrol es distinto (Cottart, Nivet-Antoine, & Beaudeau, 2013; Juan, Vinardell, & Planas, 2002; Timmers, Auwerx, & Schrauwen, 2012). En humanos, se ha visto que dosis de 0.5 o 1.0g de resveratrol, son suficientes para que este compuesto ejerza efectos anti-carcinogénicos en pacientes con cáncer colorectal (Patel, Brown, & Jones, 2010).

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxistilbeno) pertenece a una clase de compuestos polifenólicos naturales que son producidos en las plantas en respuesta a una infección por patógenos o por otros tipos de estrés (Baur & Sinclair, 2006). Desde que en 1997 se empezó a investigar el papel protector que el resveratrol tenía en el tratamiento del cáncer. Se han hecho numerosos estudios en los que demuestran sus propiedades benéficas, en asociación con sus efectos anti-oxidantes, anti-inflamatorios, anti-tumorales, cardioprotectores, así como su participación en la inhibición de ROS y agregados de plaquetas (H. Li et al., 2012; Q. Xu & Si, 2012). Los estudios que se han hecho sobre los efectos del resveratrol en el pulmón han sido principalmente en cáncer, demostrando su participación en la inhibición de la metástasis, transición epitelio-mesénquima, y suprimiendo la expresión de las metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9 (Liu et al., 2010; Wang et al., 2013).

Debido a las numerosas evidencias que existen en la literatura sobre los efectos benéficos que el resveratrol ejerce en diversas patologías así como su participación en la modulación de diversas vías de señalización o genes blanco, en este trabajo se evaluó el

papel que tiene este polifenol en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Este modelo experimental es ampliamente utilizado, por mostrar ciertas características de la fibrosis pulmonar idiopática, para la cual no existe una terapia efectiva, por lo que el resveratrol podría ser utilizado como un agente terapéutico para esta enfermedad. Adicionalmente es importante recordar que la autofagia disminuye durante el envejecimiento, esto conduce a una acumulación de moléculas oxidadas, proteínas mal plegadas y organelos dañados en las células, lo que puede inducir senescencia o apoptosis. En este contexto, la FPI es una enfermedad frecuente en adultos mayores de 50 años, y su incidencia aumenta con la edad, por lo tanto es una patología asociada al envejecimiento. De hecho, se ha demostrado recientemente que el flujo autofágico está inhibido o disminuido en el pulmón de pacientes con FPI. Por lo tanto, el uso de inductores de autofagia, pueden ser compuestos prometedores para el tratamiento de la fibrosis pulmonar.

La instilación con bleomicina induce daño pulmonar dando como resultado el desarrollo de fibrosis en el pulmón, destrucción del parénquima pulmonar, un incremento en los niveles de hidroxiprolina debido a la acumulación de fibras de colágena e infiltrado de células inflamatorias. En un estudio reciente, Patel et al., observaron que en el modelo murino de bleomicina, el tratamiento con *rapamicina* inducía la autofagia y disminuía significativamente los niveles de hidroxiprolina en el pulmón, basados en estos resultados los autores proponen a la autofagia como un mecanismo protector contra la fibrosis (Patel et al., 2012).

En este trabajo, observamos que la administración del resveratrol a partir del día 0, tiene un efecto protector tras el daño con bleomicina al disminuir significativamente los niveles de hidroxiprolina en el pulmón así como la extensión del daño, tal como se mostró en el análisis histológico y la cuantificación de hidroxiprolina. En el protocolo del **experimento 1**, que implica el tratamiento con resveratrol desde el día cero, es probable que la reducción del contenido de hidroxiprolina y la extensión de las lesiones, esté asociado con la protección de las células epiteliales, frente a la apoptosis y estrés oxidante inducido por la bleomicina. Estudios *in vitro* han demostrado que el tratamiento de células epiteliales de la línea de humano A549 provenientes de cáncer de pulmón, o de la línea de ratón MLE12, con 100 mU de bleomicina, resulta en apoptosis en un período de 24 a 48 horas (Herrera et al., 2013). Se ha considerado ampliamente que el daño, activación y apoptosis del epitelio alveolar, es un evento desencadenante de la respuesta inflamatoria y fibrosante. En este contexto, lo que proponemos en esta tesis, es que el resveratrol, podría estar favoreciendo la supervivencia del epitelio alveolar, frente al daño

que ejerce la bleomicina. Será interesante en un futuro, evaluar la tasa de apoptosis, por TUNEL, citometría de flujo o por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo contra caspasa 3 activa, en los ratones del grupo bleomicina + resveratrol, y comparar con la tasa de apoptosis en el grupo bleomicina + vehículo.

En cuanto al **experimento 2**, la administración del resveratrol a partir del día 14, no tiene efectos significativos en la disminución de la hidroxiprolina pulmonar, ni en el índice de fibrosis, por lo que la administración temprana del resveratrol en el desarrollo de fibrosis pulmonar tuvo una mayor protección frente al daño pulmonar inducido por bleomicina comparada con la administración a partir de los 14 días post-tratamiento.

Correlacionando el flujo autofágico con los niveles de hidroxiprolina, se pudo observar que en el **experimento 1**, aquellos ratones que fueron tratados con solución salina después del daño inducido con bleomicina, presentan un nivel bajo de autofagia, al observarse bajos niveles de la proteína LC3-II en comparación con el grupo bleomicina + resveratrol, así como un incremento significativo en la concentración de hidroxiprolina en el pulmón y una mayor extensión del daño inducido por bleomicina. Por el contrario, el grupo tratado con resveratrol mostró una tendencia al aumento en la conversión de LC3-II; asimismo, estos ratones mostraron niveles menores de hidroxiprolina pulmonar y un menor daño en el pulmón al tener una disminución en la extensión de fibrosis.

En el **experimento 2**, la administración de resveratrol incrementó significativamente los niveles de LC3-II y se observó una tendencia a la disminución en el daño pulmonar y en los niveles de hidroxiprolina comparados con los ratones del grupo control quienes muestran menores niveles de LC3-II, sin embargo no hubo diferencias significativas entre los grupos.

Tomando en cuenta lo anterior es posible proponer una hipótesis distinta para cada uno de los experimentos, de acuerdo a los resultados obtenidos en los Western Blot y el análisis de la respuesta fibrosante. Para el **experimento 1**, proponemos que el resveratrol, al inducir autofagia de forma temprana, podría estar protegiendo al epitelio alveolar contra la apoptosis inducida por bleomicina. En otros estudios experimentales, se ha reportado que la prevención de la apoptosis del epitelio alveolar, utilizando anticuerpos contra Fas, resulta en una disminución de la respuesta inflamatoria y fibrosante. En el **experimento 2**, la inducción de la autofagia se da a un tiempo tardío (después de 14 días), cuando la apoptosis del epitelio alveolar ya ha ocurrido y se ha establecido una respuesta inflamatoria y fibrosante. En este contexto, aunque hay un mayor flujo autofágico inducido por el resveratrol, es posible que la inducción de autofagia

ya no sea suficiente para revertir el daño inicial que ya ha generado la bleomicina y no ejerce un efecto protector. Sin embargo es importante resaltar, que el porcentaje de fibrosis analizado el 28 post-bleomicina, es menor en los ratones tratados con resveratrol, por lo tanto, podemos especular, que el resveratrol está inhibiendo que el daño al epitelio se siga perpetuando o que los fibroblastos sigan sintetizando más colágena; esta hipótesis es apoyada por la observación de una disminución en el contenido de hidroxiprolina pulmonar, sin embargo esta disminución no fue estadísticamente significativa al comparar el grupo de bleomicina + resveratrol vs. bleomicina + vehículo (768.50 vs. 919.34  $\mu\text{g/pulmón}$  respectivamente) y por lo tanto, tal vez sea necesario probar dosis mayores.

La remodelación aberrante de la matriz extracelular es la característica final de cualquier trastorno fibrótico. Se ha sugerido que en los pulmones con FPI, no existe un microambiente que degrade la colágena fibrilar (Pardo & Selman, 2002). Asimismo, un balance entre la síntesis y la degradación de la matriz extracelular es esencial para mantener la homeostasis de los tejidos. La inhibición de proteínas involucradas en la autofagia, conllevan a un incremento en los niveles de la proteína Colágena tipo I (Col-I), por el contrario, la inducción de la autofagia conlleva a una disminución en los niveles de Col-I, sugiriendo con esto una relación entre la degradación intracelular de Col-I para impedir su acumulación y la activación de la autofagia como un mecanismo citoprotector contra el daño en tejidos (Kim et al., 2012). Por otro lado, se ha visto en experimentos *in vitro* que el tratamiento con resveratrol en concentraciones de 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  disminuye la expresión a nivel de proteína de la colágena tipo I y a nivel de mRNA de la procolágena tipo I en células intestinales de músculo liso, además de inhibir proliferación, inducir apoptosis y arresto del ciclo celular en las mismas células (García et al., 2012) por lo que sería interesante analizar posteriormente en modelos de fibrosis pulmonar cuáles son los mecanismos de acción del resveratrol por los cuales podría estar disminuyendo el exacerbado depósito de colágena, principal característica de las enfermedades fibrosantes, y de esta manera poder utilizarlo como agente terapéutico. Interesantemente, se ha demostrado que la autofagia favorece la degradación intracelular de la colágena I, en este contexto, inductores de la autofagia, como el resveratrol, podrían favorecer la degradación de esta proteína, evitando su acumulación en el parénquima de los tejidos.

Finalmente, proponemos que el resveratrol podría ser utilizado como un agente terapéutico contra las enfermedades fibrosantes, sin embargo, son necesarios nuevos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, para determinar sus mecanismos de acción, dosis óptimas, y protocolos de administración y duración, así como posibles efectos



secundarios. El resveratrol es administrado por distintas vías, por ejemplo, a través del agua o el alimento (pellet) que ingieren los animales, por vía intratraqueal, intraperitoneal o intragástrica. En este trabajo, la administración del resveratrol fue por vía intraperitoneal y cada tercer día; sin embargo en otros estudios el resveratrol es administrado diariamente. Por lo que sería interesante analizar a futuro con el modelo de bleomicina diferentes dosis, tiempos y vías de administración para estudiar los efectos que tiene este polifenol en el desarrollo de la fibrosis pulmonar y posteriormente poder ser propuesto como un potente candidato para el tratamiento contra la FPI.

---

## CONCLUSIONES

---

### **Controles**

- La instilación con solución salina y la administración intraperitoneal con solución salina no ejerció cambios morfológicos en el pulmón ni tuvo efectos en los niveles de hidroxiprolina pulmonar.
- La instilación con solución salina y la administración intraperitoneal con resveratrol no ejerció cambios morfológicos en el pulmón ni tuvo efectos en los niveles de hidroxiprolina pulmonar.

### **Experimento 1**

- La instilación con bleomicina indujo un daño en el pulmón provocando con ello el desarrollo de fibrosis pulmonar.
- El tratamiento con solución salina a partir del día 0, no afecta la extensión, el grado o el porcentaje de fibrosis inducidos por el daño con bleomicina.
- El tratamiento con resveratrol a partir del día 0, redujo significativamente la extensión del daño inducido por la bleomicina.
- La instilación con bleomicina incrementó de manera significativa los niveles de hidroxiprolina en el pulmón.
- El tratamiento con solución salina a partir del día 0, no afecta los niveles de hidroxiprolina tras el daño con bleomicina.
- El tratamiento con resveratrol a partir del día 0, disminuyó significativamente los niveles de hidroxiprolina tras el daño con bleomicina.
- El tratamiento con resveratrol en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones tiende a inducir (aunque no de manera significativa) un incremento en el nivel de la forma LC3-II, mostrando con ello una tendencia a aumentar la actividad autofágica.
- El tratamiento con resveratrol tiene un efecto protector en etapas tempranas contra el daño inducido por la bleomicina.

## ***Experimento 2***

- El tratamiento con resveratrol a partir del día 14, redujo significativamente el porcentaje de fibrosis tras el daño inducido por bleomicina.
- La instilación con bleomicina incrementó de manera significativa los niveles de hidroxiprolina en el pulmón y el tratamiento con solución salina no modificó dichos niveles.
- El tratamiento con resveratrol a partir del día 14 mostró una tendencia a reducir el nivel de hidroxiprolina pulmonar, sin embargo no fue significativo al comparar con el grupo tratado con solución salina.
- La instilación con bleomicina y el tratamiento con resveratrol, inducen un aumento significativo en la forma LC3-II, mostrando con ello un aumento en el flujo autofágico.
- El tratamiento con resveratrol a partir del día 14, induce autofagia pero no es suficiente para detener la progresión de la fibrosis pulmonar una vez establecida.

## REFERENCIAS

---

- Araya, J., Kojima, J., Takasaka, N., Ito, S., Fujii, S., Hara, H., ... Kuwano, K. (2013). Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 304(1), L56–69. doi:10.1152/ajplung.00213.2012
- Baur, J. a, & Sinclair, D. a. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(6), 493–506. doi:10.1038/nrd2060
- Benítez, S. C. (2006). Bleomicina: un modelo de fibrosis pulmonar, *REV INST NAL ENF RESP MEX*, 19(1), 53-61.
- Bhogal, R. H., Weston, C. J., Curbishley, S. M., Adams, D. H., & Afford, S. C. (2012). Autophagy: a cyto-protective mechanism which prevents primary human hepatocyte apoptosis during oxidative stress. *Autophagy*, 8(4), 545–58. doi:10.4161/auto.19012
- Bové, J., Martínez-Vicente, M., & Vila, M. (2011). Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(8), 437–52. doi:10.1038/nrn3068
- Castillo, E. F., Dekonenko, A., Arko-Mensah, J., Mandell, M. a, Dupont, N., Jiang, S., ... Deretic, V. (2012). Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(46), E3168–76. doi:10.1073/pnas.1210500109
- Chen, Z., Lam, H. C., Jin, Y., Kim, H., Cao, J., Lee, S., & Ifedigbo, E. (2010). Autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain-3B ( LC3B ) activates extrinsic apoptosis during cigarette smoke-induced emphysema. doi:10.1073/pnas.1005574107/- /DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1005574107
- Chen, Z.-H., Kim, H. P., Sciruba, F. C., Lee, S.-J., Feghali-Bostwick, C., Stolz, D. B., ... Choi, A. M. K. (2008). Egr-1 regulates autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *PloS one*, 3(10), e3316. doi:10.1371/journal.pone.0003316
- Cottart, C.-H., Nivet-Antoine, V., & Beaudoux, J.-L. (2013). Review of recent data on the metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans. *Molecular nutrition & food research*, 1–15. doi:10.1002/mnfr.201200589
- Cottart, C.-H., Nivet-Antoine, V., Laguillier-Morizot, C., & Beaudoux, J.-L. (2010). Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Molecular nutrition & food research*, 54(1), 7–16. doi:10.1002/mnfr.200900437
- Deegan, S., Saveljeva, S., Gorman, A. M., & Samali, A. (2013). Stress-induced self-cannibalism: on the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Cellular*

- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., ... Madeo, F. (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature cell biology*, 11(11), 1305–14. doi:10.1038/ncb1975
- Fleming, A., Noda, T., Yoshimori, T., & Rubinsztein, D. C. (2011). Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nature chemical biology*, 7(1), 9–17. doi:10.1038/nchembio.500
- Fujii, S., Hara, H., Araya, J., Takasaka, N., Kojima, J., Ito, S., ... Kuwano, K. (2012). Insufficient autophagy promotes bronchial epithelial cell senescence in chronic obstructive pulmonary disease. *Oncoimmunology*, 1(5), 630–641. doi:10.4161/onci.20297
- Garcia, P., Schmedlin-Ren, P., Mathias, J. S., Tang, H., Christman, G. M., & Zimmermann, E. M. (2012). Resveratrol causes cell cycle arrest, decreased collagen synthesis, and apoptosis in rat intestinal smooth muscle cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 302(3), G326–35. doi:10.1152/ajpgi.00083.2011
- Gibson, S. B. (2013). *Investigating the role of reactive oxygen species in regulating autophagy. Methods in enzymology* (1st ed., Vol. 528, pp. 217–35). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-405881-1.00013-6
- Guan, H., Singh, N. P., Singh, U. P., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. (2012). Resveratrol prevents endothelial cells injury in high-dose interleukin-2 therapy against melanoma. *PLoS one*, 7(4), e35650. doi:10.1371/journal.pone.0035650
- Herrera, I., Cisneros, J., Maldonado, M., Ramírez, R., Ortiz-Quintero, B., Anso, E., ... Pardo, A. (2013). Matrix metalloproteinase (MMP)-1 induces lung alveolar epithelial cell migration and proliferation, protects from apoptosis, and represses mitochondrial oxygen consumption. *The Journal of biological chemistry*, 288(36), 25964–75. doi:10.1074/jbc.M113.459784
- Itakura, E., & Mizushima, N. (2011). p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *The Journal of cell biology*, 192(1), 17–27. doi:10.1083/jcb.201009067
- Jin, Z., & El-deiry, W. S. (2005). Overview of Cell Death Signaling Pathways ND ES SC OVERVIEW OF APOPTOSIS, (February), 139–163.
- Juan, M. E., Vinardell, M. P., & Planas, J. M. (2002). The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *The Journal of nutrition*, 132(2), 257–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11823587>
- Kage, H., & Borok, Z. (2012). EMT and interstitial lung disease: a mysterious relationship. *Current opinion in pulmonary medicine*, 18(5), 517–23. doi:10.1097/MCP.0b013e3283566721
- Kim, S. Il, Na, H.-J., Ding, Y., Wang, Z., Lee, S. J., & Choi, M. E. (2012). Autophagy promotes intracellular degradation of type I collagen induced by transforming growth

- factor (TGF)- $\beta$ 1. *The Journal of biological chemistry*, 287(15), 11677–88. doi:10.1074/jbc.M111.308460
- Kimura, Y., & Okuda, H. (2001). Nutrition and Cancer Resveratrol Isolated from Polygonum cuspidatum Root Prevents Tumor Growth and Metastasis to Lung and Tumor-Induced Neovascularization in Lewis Lung Carcinoma-Bearing Mice, (January), 1844–1849.
- King, T. E., Pardo, A., & Selman, M. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*, 378(9807), 1949–61. doi:10.1016/S0140-6736(11)60052-4
- Kroemer, G., Mariño, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell*, 40(2), 280–293. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.023
- Lee, J., Giordano, S., & Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *The Biochemical journal*, 441(2), 523–40. doi:10.1042/BJ20111451
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27–42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018
- Levine, B., Mizushima, N., & Virgin, H. W. (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, 469(7330), 323–35. doi:10.1038/nature09782
- Li, H., Xia, N., & Förstermann, U. (2012). Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric oxide: biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, 26(2), 102–10. doi:10.1016/j.niox.2011.12.006
- Li, Z. G., Hong, T., Shimada, Y., Komoto, I., Kawabe, A., Ding, Y., ... Imamura, M. (2002). Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats by resveratrol. *Carcinogenesis*, 23(9), 1531–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12189197>
- Liu, P.-L., Tsai, J.-R., Charles, A. L., Hwang, J.-J., Chou, S.-H., Ping, Y.-H., ... Chong, I.-W. (2010). Resveratrol inhibits human lung adenocarcinoma cell metastasis by suppressing heme oxygenase 1-mediated nuclear factor-kappaB pathway and subsequently downregulating expression of matrix metalloproteinases. *Molecular nutrition & food research*, 54 Suppl 2, S196–204. doi:10.1002/mnfr.200900550
- Luciani, A., Villella, V. R., Esposito, S., Brunetti-Pierri, N., Medina, D., Settembre, C., ... Maiuri, L. (2010). Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nature cell biology*, 12(9), 863–75. doi:10.1038/ncb2090
- Madeo, F., Eisenberg, T., Ruckenstuhl, C., & Kroemer, G. (2010). A novel autophagy inducer and longevity elixir, 6(1), 160–162. doi:10.1038/ncb1975.permidine
- Manuscript, A. (2013). NIH Public Access, 129(2), 569–571. doi:10.1016/j.jaci.2011.09.035.Genetic
- Margaritopoulos, G. a, Tsitoura, E., Tzanakis, N., Spandidos, D. a, Siafakas, N. M., Sourvinos, G., & Antoniou, K. M. (2013). Self-eating: friend or foe? The emerging role

- of autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *BioMed research international*, 2013, 420497. doi:10.1155/2013/420497
- Mariño, G., & López-Otín, C. (2004). Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 61(12), 1439–54. doi:10.1007/s00018-004-4012-4
- Mizumura, K., Cloonan, S. M., Haspel, J. a, & Choi, A. M. K. (2012). The emerging importance of autophagy in pulmonary diseases. *Chest*, 142(5), 1289–99. doi:10.1378/chest.12-0809
- Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147(4), 728–41. doi:10.1016/j.cell.2011.10.026
- Moore, B. B., & Hogaboam, C. M. (2008). Murine models of pulmonary fibrosis, (1), 152–160. doi:10.1152/ajplung.00313.2007.
- Morselli, E, Maiuri, M. C., Markaki, M., Megalou, E., Pasparaki, a, Palikaras, K., ... Kroemer, G. (2010). Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell death & disease*, 1(1), e10. doi:10.1038/cddis.2009.8
- Morselli, Eugenia, Galluzzi, L., Kepp, O., Criollo, A., Maiuri, M. C., Tavernarakis, N., ... Kroemer, G. (2009). Autophagy mediates pharmacological lifespan extension by spermidine and resveratrol. *Aging*, 1(12), 961–70. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2815753&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Morselli, Eugenia, Mariño, G., Bennetzen, M. V, Eisenberg, T., Megalou, E., Schroeder, S., ... Kroemer, G. (2011). Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. *The Journal of cell biology*, 192(4), 615–29. doi:10.1083/jcb.201008167
- Mouratis, M. a, & Aidinis, V. (2011). Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Current opinion in pulmonary medicine*, 17(5), 355–61. doi:10.1097/MCP.0b013e328349ac2b
- Nair, U., Yen, W., Mari, M., Cao, Y., Xie, Z., Baba, M., ... Klionsky, D. J. (2012). © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience ., 8(5), 780–793.
- Nakahira, K., & Choi, A. M. K. (2013). Autophagy: a potential therapeutic target in lung diseases. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 305(2), L93–107. doi:10.1152/ajplung.00072.2013
- Pardo, A., & Selman, M. (2002). Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34(12), 1534–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12379275>
- Patel, A. S., Lin, L., Geyer, A., Haspel, J. a, An, C. H., Cao, J., ... Morse, D. (2012). Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *PloS one*, 7(7), e41394. doi:10.1371/journal.pone.0041394

- Rubinstein, A. D., & Kimchi, A. (2012). Life in the balance - a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Journal of cell science*, *125*(Pt 22), 5259–68. doi:10.1242/jcs.115865
- Rubinsztein, D. C., Codogno, P., & Levine, B. (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, *11*(9), 709–30. doi:10.1038/nrd3802
- Ryter, S. W., Nakahira, K., Haspel, J. a, & Choi, A. M. K. (2012). Autophagy in pulmonary diseases. *Annual review of physiology*, *74*, 377–401. doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153348
- Selman, M., & Pardo, A. (2002). Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respiratory research*, *3*, 3. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=64814&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Selman, M., & Pardo, A. (2006). Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *3*(4), 364–72. doi:10.1513/pats.200601-003TK
- Sengottuvelan, M., Senthilkumar, R., & Nalini, N. (2006). Modulatory influence of dietary resveratrol during different phases of 1,2-dimethylhydrazine induced mucosal lipid-peroxidation, antioxidant status and aberrant crypt foci development in rat colon carcinogenesis. *Biochimica et biophysica acta*, *1760*(8), 1175–83. doi:10.1016/j.bbagen.2006.03.008
- Simler, N. R., Howell, D. C. J., Marshall, R. P., Goldsack, N. R., Hasleton, P. S., Laurent, G. J., ... Egan, J. J. (2002). The rapamycin analogue SDZ RAD attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *European Respiratory Journal*, *19*(6), 1124–1127. doi:10.1183/09031936.02.00281602
- Thomas, T., & Thomas, T. J. (2003). Polyamine metabolism and cancer Polyamine functions, *7*(2), 113–126.
- Timmers, S., Auwerx, J., & Schrauwen, P. (2012). The journey of resveratrol from yeast to human. *Aging*, *4*(3), 146–58. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3348475&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tooze, S. a, & Yoshimori, T. (2010). The origin of the autophagosomal membrane. *Nature cell biology*, *12*(9), 831–5. doi:10.1038/ncb0910-831
- Villella, V. R., Esposito, S., Bruscia, E. M., Maiuri, M. C., Raia, V., Kroemer, G., & Maiuri, L. (2013). Targeting the Intracellular Environment in Cystic Fibrosis: Restoring Autophagy as a Novel Strategy to Circumvent the CFTR Defect. *Frontiers in pharmacology*, *4*(January), 1. doi:10.3389/fphar.2013.00001
- Wallace, H. M., Fraser, A. V, & Hughes, A. (2003). REVIEW ARTICLE A perspective of polyamine metabolism, *14*, 1–14.
- Wang, H., Zhang, H., Tang, L., Chen, H., Wu, C., Zhao, M., ... Liu, G. (2013). Resveratrol inhibits TGF-β1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses lung

cancer invasion and metastasis. *Toxicology*, 303, 139–46.  
doi:10.1016/j.tox.2012.09.017

- Woessner, J.F. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 440–447.
- Wong, E., & Cuervo, A. M. (2010). Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience*, 13(7), 805–11. doi:10.1038/nn.2575
- Wu, Y.-T., Tan, H.-L., Shui, G., Bauvy, C., Huang, Q., Wenk, M. R., ... Shen, H.-M. (2010). Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry*, 285(14), 10850–61. doi:10.1074/jbc.M109.080796
- Xu, Q., & Si, L.-Y. (2012). Resveratrol role in cardiovascular and metabolic health and potential mechanisms of action. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, 32(9), 648–58. doi:10.1016/j.nutres.2012.07.002
- Xu, Y., & Eissa, N. T. (2010). Autophagy in innate and adaptive immunity. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7(1), 22–8. doi:10.1513/pats.200909-103JS
- Yamamoto, T., Hinoi, E., Fujita, H., Iezaki, T., Takahata, Y., Takamori, M., & Yoneda, Y. (2012). The natural polyamines spermidine and spermine prevent bone loss through preferential disruption of osteoclastic activation in ovariectomized mice. *British journal of pharmacology*, 166(3), 1084–96. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01856.x
- Yu, H.-P., Hwang, T.-L., Hwang, T.-L., Yen, C.-H., & Lau, Y.-T. (2010). Resveratrol prevents endothelial dysfunction and aortic superoxide production after trauma hemorrhage through estrogen receptor-dependent hemoxygenase-1 pathway. *Critical care medicine*, 38(4), 1147–54. doi:10.1097/CCM.0b013e3181cd124e
- Yu, X., Li, C., Hong, W., Pan, W., & Xie, J. (2013). Autophagy during Mycobacterium tuberculosis infection and implications for future tuberculosis medications. *Cellular signalling*, 25(5), 1272–8. doi:10.1016/j.cellsig.2013.02.011
- Zhou, J., Tan, S.-H., Nicolas, V., Bauvy, C., Yang, N.-D., Zhang, J., ... Shen, H.-M. (2013). Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion. *Cell research*, 23(4), 508–23. doi:10.1038/cr.2013.11