



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Regulación epigenética de BMP2 por acetilación de
histonas en fibroblastos humanos de pulmón normal.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Juan Manuel Pérez Huacuja Urista



DIRECTOR DE TESIS:

Annie Pardo Cemo

Cd. Universitaria, D. F. 2015



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.

1. Datos del alumno

Pérez Huacuja

Urista

Juan Manuel

56896933

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Biología

305619875

2. Datos del tutor

Dra.

Annie

Pardo

Cemo

3. Datos del sinodal 1

Dra.

María Eugenia

Gonsebatt

Bonaparte

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Víctor Manuel

Ruíz

López

5. Datos del sinodal 3

Dr.

René de Jesús

Cárdenas

Vázquez

6. Datos del sinodal 4

Dra.

María de Lourdes

Segura

Valdez

7. Datos del trabajo escrito.

**Regulación epigenética de BMP2
por acetilación de histonas en
fibroblastos humanos de pulmón
normal**

39 p

2015

ÍNDICE

Agradecimientos	4
Índice de tablas y figuras	5
Lista de Abreviaturas	6
1- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	8
1.1.- Fibrosis pulmonar idiopática.....	8
1.2.- Recapitulación aberrante de programas de desarrollo embrionario....	8
1.3.- Superfamilia de las BMP's y TGF β	9
1.4.- BMP2 y otras BMP's en el proceso fibrosante de varias patologías...	10
1.5.- Epigenética y modificaciones epigenéticas reportadas en FPI.....	13
1.6.- Mecanismos descritos de modificaciones epigenéticas.	13
1.7.- Histonas, acetilación/desacetilación de histonas.....	14
1.8.- Inhibidores de HDAC's y usos terapéuticos.....	17
1.9.- Antecedentes y pregunta central del trabajo.....	19
2- OBJETIVOS	20
3- HIPÓTESIS	20
4- MATERIAL Y MÉTODOS	20
4.1.- Cultivo celular.....	20
4.2.- Experimento usando los distintos inhibidores de HDAC's.....	20
4.3.- Extracción de ARN y RT-PCR.....	21
4.4.- PCR cuantitativa o PCR tiempo real (qPCR).....	21
5- RESULTADOS	23
6- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	28
7- REFERENCIAS	33

Agradecimientos.

Primero que nada me gustaría agradecer a mi tutora, la Dra. Annie Pardo Cemo, por todo el apoyo, la paciencia y las enseñanzas sin las cuales no habría podido concretar mi proyecto de tesis. Tan importante como lo anterior, por la gran admiración e inspiración que fomenta en los estudiantes por el mundo de la investigación.

Agradezco todo el apoyo de mi compañero de Doctorado, Biól. Miguel Ángel Negreros Amaya por su invaluable ayuda, interés, la paciencia y los conocimientos transmitidos; además del hecho de transmitirme la capacidad de analizar y razonar todo cuanto uno hace en el trabajo de laboratorio.

Mis agradecimientos profundos a la Dra. Sandra Cabrera Benítez, al Dr. Jorge Antonio García Álvarez y a la M. en C. Remedios Ramírez Rangel por su ayuda y comprensión, además de todos sus consejos y apoyo en mi etapa formativa como alumno en el taller “Bases Moleculares del Metabolismo de la Matriz Extracelular y las Alteraciones Asociadas a la Patología Pulmonar”. Agradezco de corazón su invaluable amistad.

Mi enorme agradecimiento a mi alma mater, mi segunda casa y la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, por todas y cada una de sus enseñanzas dentro de sus aulas; por abrirme las puertas y darme el honor de ser estudiante de licenciatura, pero sobre todo por la enseñanzas de vida y la gente tan admirable que he conocido dentro de ella.

Agradezco al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” y a todas las personas, investigadores, y personal que en el trabajan por abrirme sus puertas y permitirme desarrollar parte del proyecto de mi tesis de licenciatura.

No pueden faltar mis enormes agradecimientos a toda mi familia, mi madre Margarita del Socorro Urista Orellana, mi abuelo que en paz descanse Manuel Isabel Urista Doria, mi abuela Bertha Orellana Flores, mi tía Bertha Laura Urista Orellana, mi tía Patricia del Socorro Urista Orellana, mi tía Adriana Urista Orellana, mi tío José Manuel Urista Orellana por el gran apoyo, amor y comprensión que siempre me han brindado. Sin ustedes no habría llegado a donde ahora estoy y sin duda este logro se los debo a todos y cada uno de ustedes.

Agradezco finalmente a todos mis amigos y a todas las personas que han formado parte de mi vida, ya que sin su apoyo, comprensión y consejos mi vida sería muy diferente.

Índice de tablas y figuras.

Fig.1. Esquema de la superfamilia de TGF β	10
Fig.2. Esquema de los receptores principales para las proteínas BMP's y TGF β ..	10
Fig.3. Modelo propuesto de las vías de TGF β y de las BMP's en la fibrosis pulmonar idiopática.....	11
Fig.4. Diagrama que resume los efectos profibróticos de TGF β y los efectos antifibróticos de BMP7 en distintos órganos.....	12
Fig.5. Nucleosomas y modificaciones covalentes postraduccionales en los extremos amino terminales de las histonas.....	15
Fig.6. Tablas con otros blancos de proteínas no histónicas de las HDAC's.....	16
Fig.7. Imagen con las estructuras químicas de distintos inhibidores de desacetilasas de histonas o iHDAC's.....	18
Tabla 1. Muestra como se prepararon los estímulos y las concentraciones finales tanto de los estímulos como de los vehículos.....	21
Tabla 2. Condiciones del termociclador para realizar la RT-PCR.....	22
Tabla 3. Mezcla de reactivos para la RT-PCR por cada reacción.....	22
Tabla 4. Condiciones del termociclador para realizar la PCR en tiempo real.....	23
Tabla 5. Mezcla de reactivos para la qPCR por cada reacción.....	23
Fig.8. Gráfica de la expresión relativa de BMP2/18S en el cultivo primario N13 y en la línea NHLF.....	24
Fig.9. Gráfica de la expresión relativa de BMP2/POLR1IA en el cultivo primario N13 y en la línea NHLF.....	25
Fig.10. Gráfica de la expresión relativa de BMP2/POLR1IA en la línea NHLF con el uso de inhibidores de HDAC's vs. Vehículo.....	26
Fig.11. Gráfica de la expresión relativa de BMP2/POLR1IA en la línea celular NHLF con el uso de inhibidor VPA vs. Control sin DMSO.....	27

Lista de Abreviaturas.

FPI: Fibrosis Pulmonar Idiopática.

TGF β : Factor de Crecimiento Transformante Beta.

BMP's: Proteínas Morfogenéticas de Hueso.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

CTGF: Factor de crecimiento de tejido conjuntivo o conectivo.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ARN: Ácido Ribonucleico.

Ski: Oncogen homólogo del sarcoma viral.

SnoN: Proteína novel relacionada con c-Ski.

Fas: Receptor de muerte Fas.

HDAC's: Enzimas desacetilasas de histonas.

Thy1: Antígeno de Diferenciación de Timocitos 1.

P14^{ARF}: Proteína 14 ARF.

IP10: Proteína Inducida por Interferon Gamma 10.

COX2: Ciclooxygenasa 2.

CpG: Dinucleótido C-G

SAHA: Suberoylanilide Hydroxamic Acid o Vorinostat.

FDA: Food and Drug Administration de los Estados Unidos de Norteamérica.

DNMT's: ADN Metiltransferasas.

HAT's: Enzimas acetil-transferasas de histonas.

Zn²⁺: Zinc.

Coll1 α 1: Colágena I cadena alfa I.

mARN: ARN mensajero.

TSA: Tricostatina A, inhibidor de desacetilasas de histonas.

VPA: Ácido Valpróico.

NHLF: Fibroblastos Normales de Pulmón Normal.

FBS: Suero Fetal Bovino.

FBM: Medio Basal para fibroblastos.

FGM2: Medio de Crecimiento de fibroblastos.

Céls: Células.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DMF: Dimetilformamida.

nM: Nanomolar.

mM: Milimolar.

μ M: Micromolar.

PBS: Amortiguador de fosfatos salino.

cADN: ADN complementario.

DEPC: Dietil-pirocarbonato.

RT-PCR: Transcripción Reversa por PCR.

POLR1IA: ADN polimerasa II isoforma A humana.

18S: Subunidad 18 S Ribosomal.

MgCl₂: Cloruro de Magnesio.

dNTP's: Dinucleótidos Trifosfatados.

μ l: Microlitro.

iHDAC: Inhibidores de HDAC's.

IC₅₀: Concentración inhibitoria al 50%.

D.E.: Desviación estándar.

CHIP: Chromatin Immunoprecipitation.

1.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

1.1. Fibrosis Pulmonar Idiopática.

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad, progresiva, crónica, irreversible y letal asociada con la edad avanzada y de etiología desconocida (1), que se caracteriza por la activación aberrante del epitelio alveolar con la consecuente migración, proliferación de los fibroblastos/miofibroblastos del parénquima pulmonar y el depósito matriz extracelular que incluye principalmente fibras de colágena llevando a su destrucción y la alteración en su arquitectura (2; 3). La FPI está incluida dentro de un amplio y heterogéneo grupo de enfermedades respiratorias conocidas como enfermedades pulmonares intersticiales difusas; y pertenece a un subgrupo conocido como neumonías intersticiales idiopáticas (4). Ocurre generalmente en personas mayores de 50 años, alcanzando su pico de incidencia entre los 60 y los 65 años de edad, siendo rara en jóvenes y prácticamente inexistente en niños. La llamada FPI familiar es muy similar a la forma esporádica pero se presenta en un pequeño subgrupo de estos pacientes (2-3%) (5).

Por mucho tiempo se pensó que el desarrollo de esta patología estaba asociado a procesos de inflamación crónica observados en otras enfermedades intersticiales del pulmón (6). Sin embargo, a inicios de este milenio, se observó que la inflamación crónica en el proceso fibrosante no juega un papel fundamental como alguna vez se pensó, y en cambio, se hipotetizó que es un daño al epitelio y una reparación anormal del mismo lo que conduce a la respuesta fibrosante (2).

Existen diferentes hipótesis y líneas de investigación con lo referente al origen y papel de los fibroblastos como células efectoras en el proceso fibrótico, entre las que destacan, el daño y la activación del epitelio alveolar con la consecuente proliferación y migración de los fibroblastos/miofibroblastos locales por medio de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento secretadas por el epitelio alveolar (7; 8); la llegada de fibrocitos circulantes provenientes de la médula ósea por señales aberrantes originadas en el epitelio alveolar (9); y la transición epitelio mesénquima, es decir, la transdiferenciación de las células epiteliales alveolares en fibroblastos y miofibroblastos capaces de sintetizar grandes cantidades de matriz extracelular (10; 11)., aunado a la pérdida de la polaridad y los marcadores de células epiteliales como la E-caderina, citoqueratinas, entre otras, y la ganancia de marcadores característicos de células mesenquimales como la N-caderina, la vimentina, la fibronectina (12; 13).

1.2. Activación aberrante de vías embrionarias en fibrosis pulmonar idiopática y otras patologías.

Cabe mencionar que en la fibrosis pulmonar idiopática, al igual que en otras patologías humanas como el cáncer, hay una activación aberrante de vías de desarrollo embrionario (14; 15). Gracias a diferentes estudios con microarreglos, se ha podido constatar la expresión de ciertos genes de membrana extracelular, marcadores de miofibroblastos/células epiteliales, así como genes de desarrollo embrionario (7; 16; 17). Algunas de las diferentes vías embrionarias que se han visto involucradas en FPI, se encuentran las “cajas Sry” y “Forkhead”, y genes relacionados con la vía de Wnt/ β catenina (7;15); así como genes de la superfamilia de TGF β como las BMP's o proteínas morfogenéticas de hueso que tienen un amplio repertorio de funciones biológicas como el cierre de heridas, la remodelación de la matriz extracelular y el control de la transición epitelio mesénquima durante la embriogénesis (18; 19).

1.3. Superfamilia de las BMP's y TGF β .

Se conocen a la fecha un poco más de 20 miembros de la familia de las BMP's (20; 21), que son proteínas que en su forma precursora están constituidas por 400 a 500 aminoácidos que pueden ser proteolíticamente procesadas por su prodominio para obtener la forma activa de 50 a 100 aminoácidos, las cuales, pueden formar homodímeros o heterodímeros con otras BMP's (22; 23; 24; 25; 26; 27). Se detectaron primero en extractos de hueso (de ahí su nombre), y sus funciones pleiomórficas en el desarrollo se observaron primero en invertebrados (28; 29). Basándose en la similitud de la secuencia y las funciones conocidas, algunas en procesos fibrosantes, estas proteínas han sido divididas en al menos 4 subgrupos: BMP2/4, BMP5/6/7/8^a/8b, BMP9/10, BMP12/13/14 (30; 31). Los receptores a los cuales se unen las BMP's son receptores tipo serina/treonina cinasas, compuestos por cortos dominios extracelulares constituidos por 10 a 12 residuos de cisteína, un solo dominio transmembranal y un dominio serina/treonina intracelular. Existen 5 receptores tipo I para las BMP's, que son: ALK1 (AcvrlI), ALK2 (ActRI), ALK3 (BR1a), ALK4 (ActRIb) y ALK6 (BR1b); además de tres receptores tipo II, los cuales son: BR1I, ActRIIa y ActRIIb (25). Las BMP's en general se unen primero a los receptores tipo I, mientras que otros miembros de la superfamilia de TGF β , como TGF β 1, se une primero a los receptores tipo II y posteriormente se reclutan receptores tipo I para formar heterómeros o hetero-oligómeros (32; 33).

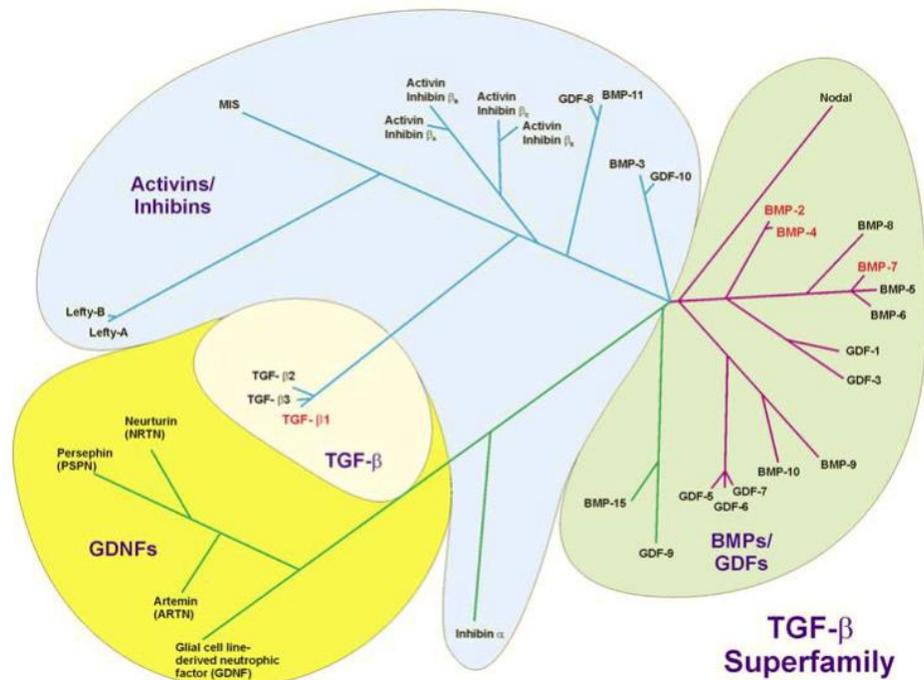


Fig.1. Esquema de la superfamilia de TGFβ. (Tomado de Weiskirchen Ralf, et al., 2009).

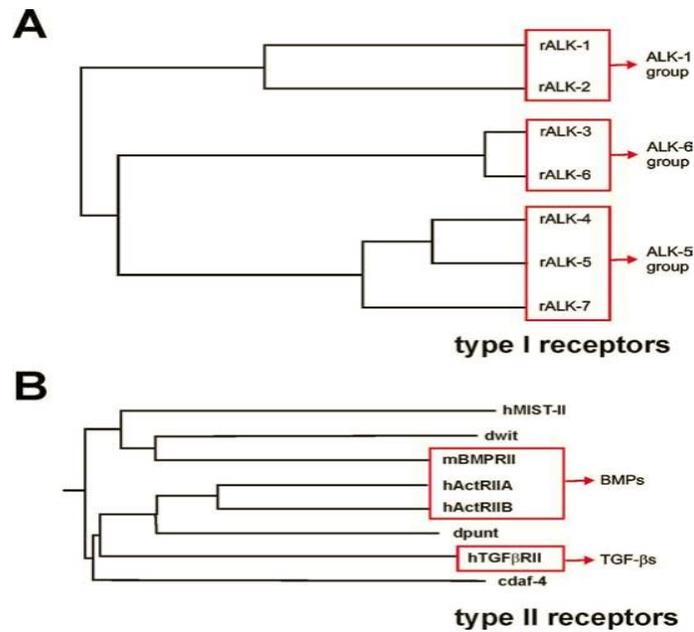


Fig. 2. Esquema de los receptores principales para las proteínas BMP's y TGFβ. (Tomado de Weiskirchen Ralf, et al., 2009).

1.4. BMP2 y otras BMP's en el proceso fibrosante de varias patologías.

En diversos estudios de microarreglos y por PCR en tiempo real, se ha observado que el gen de BMP2 se encuentra expresado en niveles bajos en los pulmones de pacientes con FPI en relación a sujetos sanos (7; 16; 34). Se ha relacionado a BMP2 en otros procesos fibrosantes aparte de la fibrosis pulmonar (35) como una molécula anti fibrosante; por ejemplo, en la fibrosis pancreática provocada por la inducción de pancreatitis crónica con ceruleína en un modelo murino (36; 37), así como en procesos fibrosantes del riñón (38; 39). Principalmente se ha visto la capacidad antagónica de BMP2 sobre el efecto pro fibrosante de TGFβ a nivel de los receptores. En estos mismos estudios de expresión global de genes en FPI se ha visto que BMP4 se encuentra sobreexpresada en los pulmones fibróticos, así como algunos inhibidores de las BMP's como Gremlin (34).

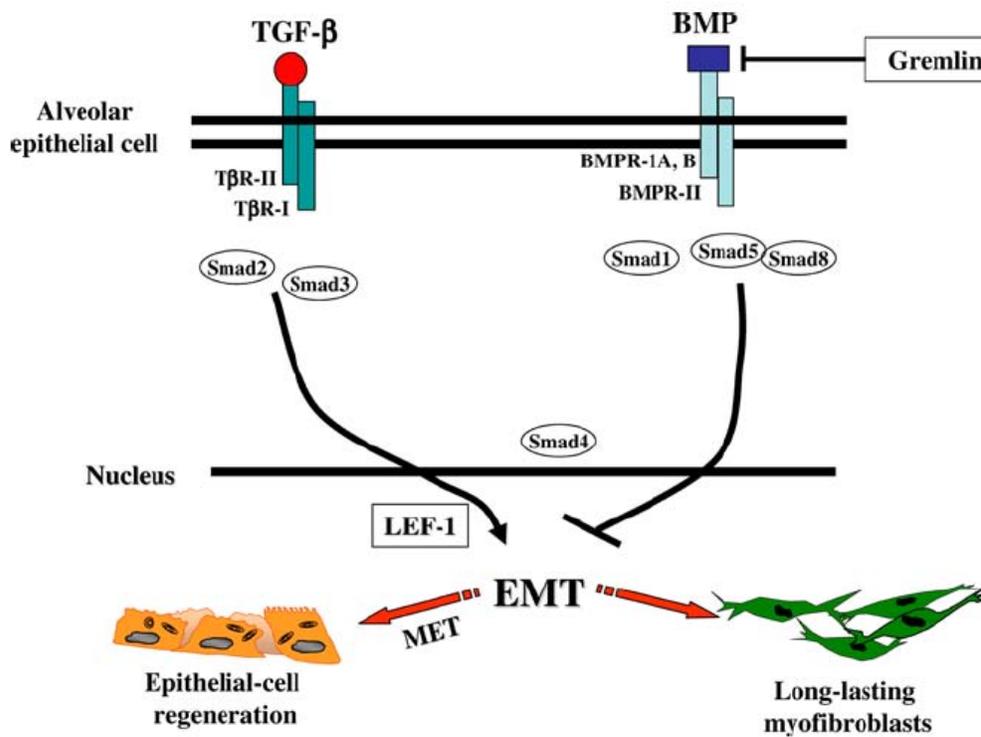


Fig.3. Modelo propuesto de las vías de TGFβ y de las BMP's en la fibrosis pulmonar idiopática. (Tomado de Selman M, et al., 2008).

Algunas BMP's como la BMP7 antagonizan los efectos de TGFβ en lo concerniente a la transición epitelio mesénquima y producen el efecto inverso que es la transición mesénquima epitelio (40; 41), lo cual se ha observado en diferentes tejidos como páncreas y riñón (36; 39). Además de los efectos antagónicos de BMP7 sobre el TGFβ, se ha observado en órganos como el hígado o el riñón, que la expresión de esta molécula también puede modular negativamente la actividad

de genes que responden a TGF β como CTGF^(41; 42), otra molécula importante en la fibrogénesis de distintos órganos incluido el pulmón al amplificar los efectos de TGF β ^(43; 44). Se ha propuesto que el CTGF es una molécula que inhibe la unión de BMP7 con su receptor al secuestrarlo uniéndose a esta última por su dominio rico en cisteína, pero que por el contrario al unirse a TGF β por medio del mismo dominio, favorece la unión a su receptor cambiando el balance entre una molécula anti fibrosante con una molécula pro fibrosante ⁽⁴⁴⁾. En un modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por asbestos, se ha visto que la expresión de BMP7 disminuye de forma significativa, mientras que la expresión del antagonista de algunas BMP's, Gremlin, aumenta su expresión en el estroma pulmonar, lo cual sugiere que este último puede estar modulando negativamente la expresión de BMP7 en el mesénquima pulmonar y por tanto aumentando la fibrosis en el pulmón. En resumen, BMP7 es una molécula importante implicada en desarrollo de fibrosis en distintos órganos incluyendo al pulmón ⁽⁴⁵⁾.

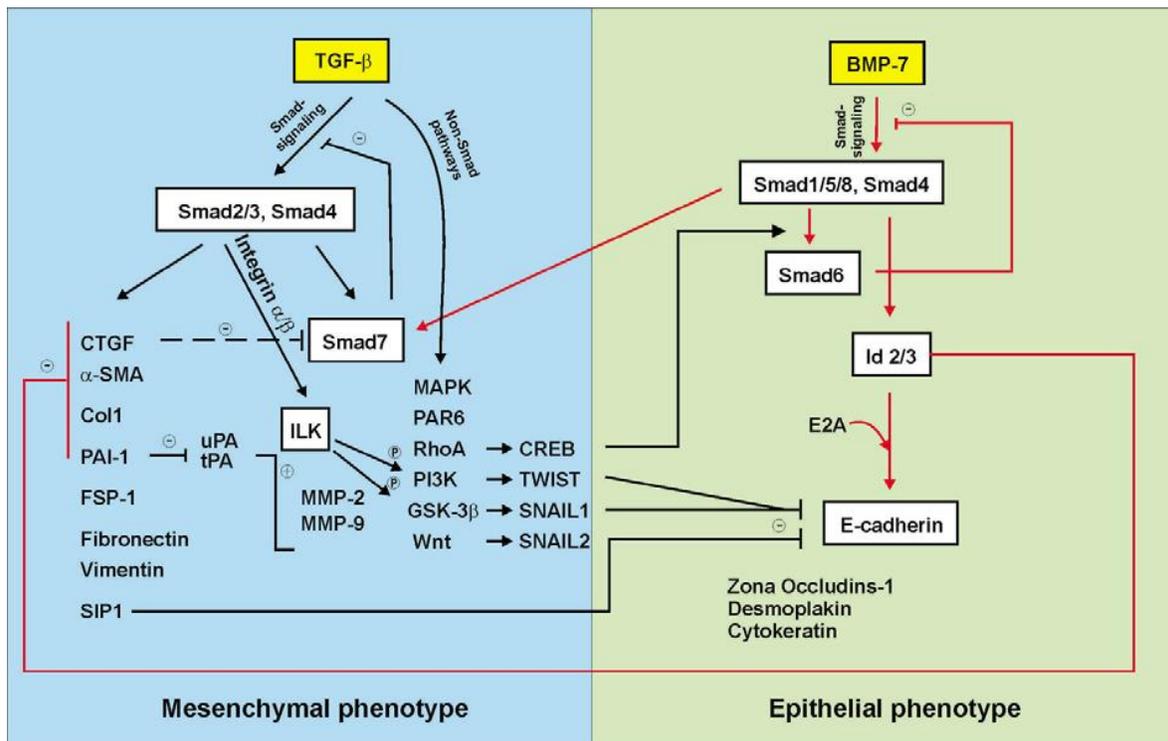


Fig. 4. Diagrama que resume los efectos profibróticos de TGF β y los efectos antifibróticos de BMP7 en distintos órganos. (Tomado de Weiskirchen Ralf, et al., 2009).

El TGF β , la molécula profibrótica por excelencia ⁽⁴⁶⁾, en trabajos anteriores ha demostrado su capacidad de inducir la transición epitelio-mesénquima *in vitro* en células epiteliales alveolares, posteriormente se demostró *in vivo* la co-expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales en células pulmonares de pacientes con FPI ⁽¹⁰⁾. Lo anterior puede ocurrir directamente por la vía de las Smads y por la

activación de distintas proteínas en la cascada de señalización, o de manera independiente a esta vía ⁽³²⁾. De forma general la mayoría de las BMP's activan las Smads 1, 5 y 8, mientras que TGF β activa las Smads 2 y 3 para posteriormente activar Smad 4, común para ambas vías, y así translocarse al núcleo para transcribir sus genes blanco ⁽⁴⁷⁾. TGF β puede inducir la expresión de Gremlin en el parénquima pulmonar y a su vez la expresión de BMP4 en células epiteliales de pulmón que sufren la transición epitelio mesénquima, lo cual sumado a la baja expresión de BMP2 y BMP7 puede contribuir al efecto profibrosante en el pulmón ⁽³⁴⁾.

1.5. Epigenética y modificaciones epigenéticas reportadas en FPI.

El silenciamiento en la expresión de un gen puede ocurrir por distintos procesos celulares tanto genéticos como ambientales, entre los últimos se encuentran los procesos epigenéticos ^(48; 49). Existen tantas definiciones de epigenética como autores e investigadores la han abordado para su estudio, sin embargo, la epigenética se puede definir como aquellos cambios o modificaciones bioquímicas y funcionales heredables que ocurren en la molécula del ADN, ARN o en las proteínas asociadas a la molécula de ADN (cromatina), sin que exista un cambio en la secuencia de nucleótidos. La definición más aceptada a la fecha es la de (Riggs, et al., 1996), que dice que “La epigenética es el estudio de cambios heredables mitóticos y/o meióticos en la función génica que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia de ADN” ⁽⁵⁰⁾.

Las modificaciones y alteraciones epigenéticas se han reportado en distintas patologías y condiciones ⁽⁵¹⁾, como son cáncer ^(52; 53), enfermedades neurológicas ⁽⁵⁴⁾ diabetes tipo II ⁽⁵⁵⁾, enfermedades autoinmunes ⁽⁵⁶⁾, autismo ⁽⁵⁷⁾, así como en enfermedades fibrosantes ⁽⁵⁸⁾ incluidas la FPI ⁽⁵⁹⁾. Existen varios mecanismos epigenéticos descritos en la FPI como son la reducción en la expresión de los receptores de muerte Fas en los fibroblastos por remodelación de la cromatina ⁽⁶⁰⁾, la regulación negativa en la expresión de colágena 3 A 1 (colágena tipo III α 1) con el uso de inhibidores de HDAC's ⁽⁶¹⁾, la hipermetilación del promotor del gen Thy1 o CD 90 ⁽⁶²⁾, la hipermetilación del gen p14^{ARF} en fibroblastos de pacientes con FPI ⁽⁶³⁾, la represión de IP10 por mecanismos de desacetilación y metilación combinados ⁽⁶⁴⁾, el silenciamiento de COX2 por defectos en la acetilación ⁽⁶⁵⁾, el impedimento en la diferenciación de mioblastos por TGF β 1 y HDAC4 ⁽⁶⁶⁾, y por el contrario, la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos por TGF β 1 y HDAC4 en pulmón humano, entre otros ⁽⁶⁷⁾.

1.6. Mecanismos descritos de modificaciones epigenéticas.

Las modificaciones epigenéticas que pueden ocurrir son numerosas, entre las que se cuentan, la metilación de los promotores de ciertos genes principalmente en las islas CpG (⁵¹; ⁵²; ⁶²; ⁶³), la acetilación o desacetilación de ciertos aminoácidos de los extremos amino terminales de las “colas” de histonas principalmente, así como otras modificaciones post-traduccionales como metilación, fosforilación, ubiquitinización, sumoilación, ADP ribosilación, crotonilación, entre otras modificaciones bioquímicas (⁵¹; ⁶⁸; ⁶⁹; ⁷⁰) a estos componentes que constituyen los elementos formadores de los nucleosomas, que a su vez ayudan al empaquetamiento de la cromatina dentro del núcleo de las células eucariontes. Además algunos autores y grupos de investigación han propuesto que existe un código de histonas en donde distintas marcas solas, en secuencia o combinadas pueden tener distintos efectos transcripcionales, como aumentar o disminuir la transcripción, o incluso en procesos de splicing alternativo en distintos genes (⁵²; ⁷¹). Otros argumentan que no puede compararse con un código como el código genético, ya que los resultados de las combinaciones no siempre son tan predecibles.

Otros eventos epigenéticos incluyen, la regulación de la traducción de algunos ARN's mensajeros que a su vez regulan mecanismos epigenéticos por parte de ARN's no codificantes cortos y largos (⁵¹; ⁷²), así como también eventos de remodelación de la cromatina y el establecimiento de dominios nucleares (⁷³).

1.7. Histonas, acetilación y desacetilación de histonas.

Las histonas son proteínas altamente básicas que ayudaron a resolver el problema de repulsión generado por los grupos fosfato que tiene el polímero de ADN, sin las cuales, no podría acomodarse en el interior del núcleo. Además de resolver ese problema, las histonas permiten el super-empaquetamiento del ADN hasta un factor de 10,000 veces para formar cromosomas y permitir que la célula eucarionte pueda dividirse de forma satisfactoria. El conjunto de histonas o núcleo de histonas constituyen a los nucleosomas que son la unidad básica de la cromatina de los eucariontes. Cada núcleo de histonas contiene dos copias o dímeros de cada proteína histónica: H2A, H2B, H3 y H4. Aproximadamente 147 pares de bases del ADN, lo que equivale a 1.65 vueltas, se enrollan alrededor del octámero de histonas. Más allá del nucleosoma está la histona H1 o “linker”, junto con el ADN “linker”, que funciona como una unión entre un octámero y otro. Las histonas H1 pueden hacer que la cromatina se compacte cada vez más hasta formar un cromosoma metafásico para la subsecuente mitosis celular (⁷¹). La cromatina además de condensar la molécula de ADN, tiene la función de regular el acceso de la maquinaria de transcripción, en una forma celular y contexto específicos. Las áreas transcripcionalmente activas se conocen como “eucromatina”, mientras que las áreas transcripcionalmente inactivas se conocen

como “heterocromatina”. La última se puede dividir en heterocromatina constitutiva, es decir, que está silenciada en todos los tipos celulares, por ejemplo, en la región pericentriolar y telómeros; y además en heterocromatina facultativa, que son sitios que se encuentran transcripcionalmente activos en algunos tipos celulares, mientras que están inactivos en otros tipos celulares (⁵¹).

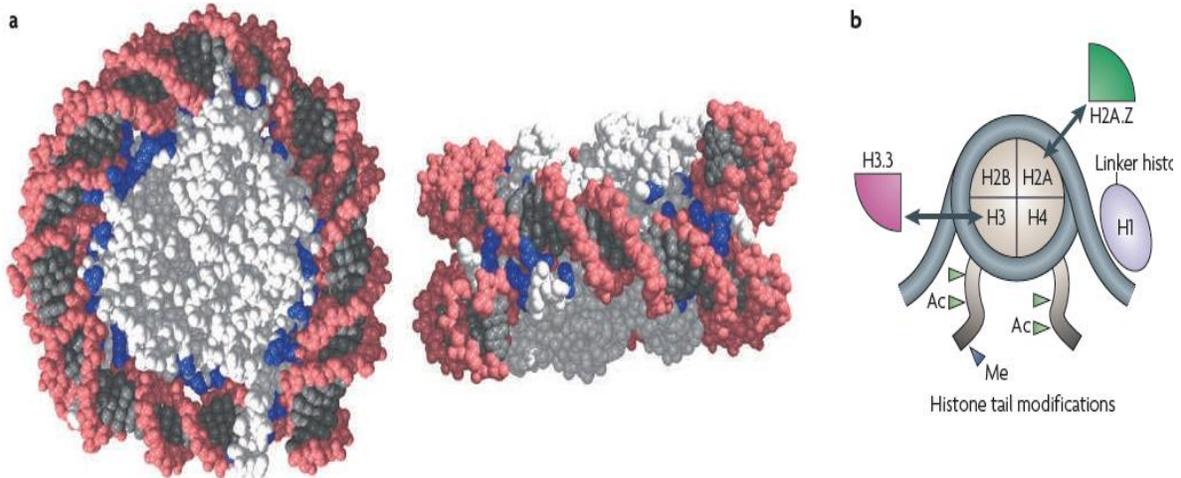


Fig. 5. Nucleosomas y modificaciones covalentes post-traduccionales en los extremos amino terminales de las histonas. (Tomado de Jiang C, Pugh BF, 2009).

El mecanismo descrito por el cual las histonas pueden ser acetiladas/desacetiladas, es por medio de enzimas acetil transferasas o “HAT’s” y enzimas desacetilasas de histonas “HDAC’s”, por sus siglas en inglés respectivamente (Histone Acetyl Transferases and Histone Deacetylases). Las primeras como su nombre lo dice, agregan grupos acetilo a los residuos principalmente de lisina de los extremos amino terminales de las “colas” de histonas, neutralizando las cargas y de esa manera relajando la cromatina para permitir el acceso de la maquinaria de transcripción a esa zona. Las desacetilasas pueden reprimir la expresión de genes, ya que al quitar los grupos acetilo principalmente de los residuos de lisina en las colas amino terminales de las histonas, les confieren una carga positiva que provoca el empaquetamiento del ADN e impide que la maquinaria de transcripción tenga acceso a esa zona (⁵⁸). Las HDAC’s son enzimas cuyo dominio catalítico es dependiente de Zn^{2+} (⁷⁴), existen alrededor de 18 HDAC’s descritas varían de acuerdo a su localización, sustratos y funciones dentro de las células; podemos dividir las en 4 clases o subgrupos de acuerdo a su homología con enzimas desacetilasas de levaduras: Clase I, que incluye a la HDAC 1, 2, 3 y 8, localizándose principalmente en el núcleo, omnipresentes en muchos tejidos, siendo homólogas con RPD3 de levadura; Clase II, que a su vez se subdivide en IIa, HDAC 4, 5, 7 y 9; IIb, que contiene a la HDAC 6 y 10 con dos sitios catalíticos, localizándose principalmente en citoplasma aunque también se pueden mover al núcleo, tejido específicas,

siendo homólogas con HDA1 de levadura. La HDAC 11 se agrupa en la clase IV, localizándose principalmente en citoplasma, con residuos conservados en su centro catalítico y compartidos los primeros por las clases I y II; mientras que las sirtuinas 1, 2 y 3 se agrupan en la clase III (58; 75). Filogenéticamente son enzimas altamente conservadas y anteceden a las histonas, lo cual indica que sus funciones de desacetilación no sólo afecta a proteínas histónicas, sino a otras proteínas citoplasmáticas y nucleares por lo que también han sido llamadas “desacetilasas de lisinas”. A la fecha se conocen más de 50 proteínas no histónicas reguladas por las HDAC’s (Fig.6.), entre las que se cuentan algunas que tienen que ver con proliferación celular, migración celular, muerte celular, senescencia, autofagia. Estas enzimas por lo general no vienen solas, sino que vienen en complejos de proteínas, por ejemplo, en complejos con factores de transcripción, coactivadores, corepresores que también contienen inhibidores de expresión como las Dnmt’s o metiltransferasas de histonas (64; 75; 76; 77; 78). La co-localización de estas enzimas incluidas en estos complejos puede provocar el silenciamiento de los genes que se encuentran en esas regiones de cromatina, contribuyendo a la generación del estado patológico.



Table 1 Nonhistone protein substrates of HDACs (partial list)^a

<i>Function</i>	<i>Proteins</i>
DNA binding transcriptional factors	p53, c-Myc, AML1, BCL-6, E2F1, E2F2, E2F3, GATA-1, GATA-2, GATA-3, GATA-4, Ying Yang 1 (YY1), NF- κ B (RelA/p65), MEF2, CREB, HIF-1 α , BETA2, POP-1, IRF-2, IRF-7, SRY, EKLf
Steroid receptors	Androgen receptor, estrogen receptor α , glucocorticoid receptor
Transcription coregulators	Rb, DEK, MSL-3, HMGI(Y)/HMGA1, CtBP2, PGC-1 α
Signaling mediators	STAT3, Smad7, β -catenin, IRS-1
DNA repair enzymes	Ku70, WRN, TDG, NEIL2, FEN1
Nuclear import	Rch1, importin- α 7
Chaperone protein	HSP90
Structural protein	α -Tubulin
Inflammation mediator	HMGB1
Viral proteins	E1A, L-HDAg, S-HDAg, T antigen, HIV Tat

Abbreviation: HDACs, histone deacetylases. ^aSee text for references.

Fig.6. Tabla con otros blancos de proteínas no histónicas de las HDAC’s (Tomado de Xu S. W, et al., 2007).

1.8. Inhibidores de HDAC'S y usos terapéuticos.

Existen distintos inhibidores de desacetilasas de histonas y acetilasas de histonas actualmente ya utilizados algunos de ellos para algunas patologías humanas, principalmente en cáncer (53; 79). Como ya se mencionó las acetilasas de histonas favorecen la actividad transcripcional añadiendo grupos acetilo a los residuos de lisina de los extremos amino terminal de las histonas. Por el contrario las HDAC's inhiben la actividad transcripcional por el proceso inverso, es decir, retirando los grupos acetilo (58). En la FPI y en otras enfermedades fibrosantes existen estudios donde han utilizado estos inhibidores para recuperar la expresión de algunos genes que se sabe se silencian en estos padecimientos y se ha propuesto que puedan tener un posible efecto terapéutico (58; 61). Un ejemplo del uso de inhibidores de desacetilasas de histonas en enfermedades fibrosantes lo encontramos en el trabajo de (80) donde evalúan la expresión de BMP7 tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína y observan que disminuye en ambos casos con el daño y la subsecuente fibrosis renal. También reportan que el mecanismo de inhibición en la expresión de BMP7 está mediado por HDAC's y al tratar a los animales con TSA, el cual es un inhibidor de las clases I y II de HDAC's (75; 81), los animales desarrollan menos fibrosis y se abaten los niveles de Collal (Colágena tipo I α 1) y alfa actina de músculo liso en células procedentes de la región medular del riñón. Además existen trabajos en fibrosis pulmonar idiopática en donde se prueba la respuesta antifibrosante con el inhibidor de HDAC's, SAHA, el cual ya fue aprobado por la FDA y ya se utiliza para tratar ciertos tipos de cáncer (82; 83; 84). En dicho trabajo se menciona la capacidad de SAHA (Vorinostat) en evitar la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos por efecto del TGF β , además de evitar la proliferación de fibroblastos crecidos en medio con suero. En otro trabajo se habla del uso de TSA en la inhibición de la transformación de fibroblastos a miofibroblastos por la acción de TGF β 1 en FPI. En dicho trabajo se propone que el TGF β induce la expresión de HDAC4 a nivel transcripcional. Por una vía independiente de Smads, la vía de Akt, observaron que con el inhibidor TSA disminuía la expresión tanto de Collal (Colágena tipo I α 1) como de alfa actina de músculo liso. HDAC4 está asociada a PP1 y PP2A (fosfatasas). Al momento de inhibir a la HDAC4 con TSA, las fosfatasas se liberan para desfosforilar a Akt y de esa manera impedir la transformación a miofibroblastos. Cuando el complejo de HDAC4 y las fosfatasas se encuentran unidos, Akt permanece fosforilado y se produce la transformación de fibroblastos en miofibroblastos con la consecuente expresión de alfa actina de músculo liso (67).

Otras enfermedades fibrosantes donde se han visto algunos efectos positivos con el uso terapéutico de los distintos inhibidores de desacetilasas de histonas, son

nefropatías diabéticas ⁽⁸⁵⁾, hipertrofia cardíaca y fibrosis ⁽⁸⁶⁾, esclerosis sistémica ⁽⁸⁷⁾, mielofibrosis primaria ⁽⁸⁸⁾, fibrosis quística ⁽⁸⁹⁾.

Los inhibidores de HDAC's o iHDAC, pueden regular la expresión de ciertos genes, además de regular procesos celulares importantes como son la proliferación, apoptosis, ciclo celular, entre otras funciones. Se pueden dividir en cuatro grupos basándose en su estructura, que son: hidroxamatos, péptidos cíclicos, ácidos alifáticos y benzamidas ^(90; 91; 92; 93). El mecanismo principal por el cual pueden inhibir a estas enzimas es secuestrando el ion de Zn²⁺ que se une al sitio catalítico de la enzima ⁽⁷⁴⁾.

TABLE 2
Chemical structure of HDAC inhibitors

TSA	Sodium Valproate	Valproic Acid (Depakote)	4-PBA
SAHA (Vorinostat)	LBH589 (Panobinostat)	SK-7041	

TSA (Taunton et al., 1996); sodium valproate (Gottlicher et al., 2004); valproic acid (Depakote) (Zelent et al., 2005); 4-PBA (Wiech et al., 2009); SAHA (vorinostat) (Marks and Breslow, 2007); LBH589 (panobinostat) (Atadja et al., 2009); SK-7041 (Kim et al., 2003).

Fig.7. Imagen con las estructuras químicas de distintos inhibidores de desacetilasas de histonas o iHDAC's. (Tomado de Pang M, et al., 2010).

Los distintos inhibidores de HDAC's que se utilizaron en este trabajo como TSA (Sigma), VPA (Sigma), SB939, JGB1741, PCI34051 (Cayman Chemical), ya han sido descritos para la modificación (recuperación/inhibición) en la expresión de algunas moléculas en distintas patologías. Las concentraciones utilizadas en los distintos tratamientos fueron tomadas de la literatura y de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

El TSA es un hidroxamato inhibidor de las clases I y II de desacetilasas de histonas, su concentración inhibitoria está en el orden de los nM ⁽⁶⁷⁾. El VPA es un ácido alifático que inhibe a las clases I y IIa de desacetilasas de histonas, sin embargo, inhibe con más fuerza la clase I; su concentración inhibitoria está en el orden de los mM y no es tan potente como otros inhibidores, además presenta una toxicidad importante ^(78; 95). SB939 es un pan inhibidor de HDAC's, sin embargo se necesitan mayores concentraciones para la HDAC 6 de la clase IIB y HDAC 7 de la clase IIA (247 y 104 nM respectivamente). JGB1741 es un inhibidor de las

sirtuinas, principalmente la Sirt 1 ($IC_{50}=15\mu M$ en ensayo libre de células). En concentraciones de hasta $100\mu M$ puede inhibir a las sirtuinas 2 y 3 (IC_{50}). PCI34051 es un potente inhibidor de la HDAC8 que pertenece a la clase I ($IC_{50}=0.01\mu M$); en otras concentraciones puede inhibir a los demás miembros de la clase I: 1, 2, 3 (IC_{50} 's: 4, >50, >50 μM ; respectivamente); y a la HDAC 6 y 10 de la familia IIB (IC_{50} 's: 2.9 y 13 μM , respectivamente) (Cayman Chemical).

1.9. Antecedentes y pregunta central del trabajo.

La pregunta central del trabajo es investigar si el silenciamiento del gen BMP2 observado por distintos estudios de microarreglos (⁷; ¹⁶) y por qPCR (³⁴) está relacionada con modificaciones y remodelación epigenética. En algunos datos preliminares del grupo, se ha visto que el cambio en la expresión de BMP2 tanto en células normales como en células derivadas de pacientes con FPI se ve modificada con la adición de Tricostatina A (TSA), el cual es un potente inhibidor de las clases I y II de desacetilasas de histonas (HDAC's) principalmente (⁷⁵). Se probó utilizar inhibidores de metil-transferasas (Dnmt's) como 5-aza-2'-deoxicitidina (⁵²; ⁹⁴), sin embargo, no se observó ninguna recuperación significativa en la expresión de BMP2 usando la técnica de qPCR, por lo que el objetivo del trabajo se centró más en la acetilación/desacetilación de histonas. Existen evidencias del silenciamiento epigenético de las BMP's por mecanismos epigenéticos en donde proteínas como c-Ski y la proteína novel relacionada con Ski-SnoN, mediados por $TGF\beta$, provocan la desacetilación de histonas cercanas al promotor de las BMP's, tanto BMP-2 como la 7 en osteoblastos (⁹⁵). Además está descrito que el mecanismo para que $TGF\beta 1$ y sus proteínas inducibles c-Ski y SnoN puedan inhibir a las BMP's, es a través de la unión de c-Ski a Smad 4, común para las vías de $TGF\beta$ y las BMP's, y reclutando desacetilasas de histonas a este complejo (⁴¹).

2.- OBJETIVO:

- **General:**
- Analizar el efecto de la acetilación de histonas sobre la expresión del gen BMP2 en fibroblastos humanos de pulmón normal.
- **Objetivos particulares:** Cuantificar la expresión del gen BMP2 mediante la técnica de PCR tiempo real en fibroblastos humanos de pulmón normal.
- Cuantificar la expresión en presencia del gen BMP2 en fibroblastos de pulmón humano normal, tratados con: TSA, VPA, SB939, JGB1741, PCI34051.

3.- HIPÓTESIS:

Al utilizar los distintos inhibidores de deacetilasas de histonas habrá una modificación en la expresión del gen BMP2 en los fibroblastos humanos de pulmón normal.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS:

4.1. Cultivo Celular.

Para evaluar la expresión del gen BMP2 se utilizaron fibroblastos de pulmón normal derivados de una lobectomía, tomada de una zona histológicamente normal de un paciente con cáncer de pulmón (N13) y otros procedentes de una línea comercial (NHLF) (Lonza, Clonetics). Los fibroblastos N13 se cultivaron en cajas T25 (Corning), en medio F12 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (Gibco) y antibiótico/antimicótico al 1% (Penicilina, anfotericina B, estreptomycin; Sigma). las células (NHLF) se cultivaron con medio FBM, suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, sulfato de gentamicina y anfotericina B, insulina recombinante humana y factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF2) (0.5%). FGM2 (Lonza, Clonetics) Las células se mantuvieron en una incubadora (5% CO₂ y 95% aire a 37°C, Thermo Scientific). Cuando las células llegaron a confluencia del 70 u 80% las cajas se dividieron y las células se despegaron con tripsina 1X (Sigma), antes lavándolas con PBS 1X (Sigma), en un pasaje temprano (8 en las N13 y 10 en las NHLF) guardando y congelando un pool de ellas en viales (Corning) que fueron introducidos en nitrógeno líquido.

4.2. Estímulos con los inhibidores de HDAC's.

Se sembraron las células N13 (1.4×10^5 céls/pozo) y NHLF (2×10^5 céls/pozo) en placas de 6 pozos (Corning-Costar) y se sincronizaron una vez que alcanzaron el 70 u 80% de confluencia en medio F12 libre de suero por 24 horas. Al otro día se prepararon los inhibidores de HDAC's de la siguiente manera, usando como vehículo el DMSO, DMF y PBS1X.

Tratamientos (Concentración de cada Uno)	Concentración final del vehículo (DMSO)*Excepto VPA (PBS1X) y JGB1741 (DMF Dimetilformamida)
Control (Medio F12 sin suero)	
DMSO + 1.5 ml F12 sin suero	0.1%
TSA 500nM + 1.5 ml de F12 sin suero	0.1%
VPA 1 μ M + 1.5ml de F12 sin suero	
SB939 1 μ M + 1.5 ml de F12 sin suero	0.1%
JGB1741 1 μ M + 1.5 ml de F12 sin suero	0.1%
PCI34051 5 μ M + 1.5 ml de F12 sin suero	0.05%

Tabla 1. Tabla que muestra como se prepararon los estímulos y las concentraciones finales, tanto de los estímulos como de los vehículos.

Se añadieron los inhibidores por duplicado en medio F12 sin suero; de acuerdo a las concentraciones recomendadas por el proveedor y en la literatura; TSA y VPA (Sigma), SB939, JGB1741, PCI34051 (Cayman Chemical) y se dejó el estímulo durante 6 horas.

4.3. Extracción de ARN.

Se quitó el medio con el estímulo, se lavaron las células con PBS 1X y se extrajo el ARN utilizando la técnica de Trizol (Invitrogen). Brevemente se adicionó cloroformo (Sigma) para separar las diferentes biomoléculas (proteínas y ácidos nucleicos) por centrifugación. Posteriormente se separó la fase acuosa que contiene al ARN y se agregó isopropanol (Sigma) para precipita el ARN y se dejó 1 día. Al otro día se centrifugó, se dio un lavado con etanol (Sigma) al 75% para remover las sales, se volvió a centrifugar y finalmente se decantó el etanol para dejar secar la pastilla de ARN. Una vez obtenido y cuantificado el ARN (Nanodrop, Thermo Scientific), se realizó una RT-PCR utilizando el Kit de ThermoScientific para retrotranscribir el ARN en cADN, utilizando de 0.2 a 1 μ g de ARN. El cADN se diluyó 1:4 con agua DEPC (dietil-pirocarbonato al 0.1%, Sigma) y se utilizó para realizar la PCR tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) utilizando y el CFX96 Thermal Cycler System de Biorad.

4.4 PCR cuantitativa o qPCR y análisis estadísticos.

Para tales fines se utilizó la sonda TaqMan para BMP2 (marcador fluorescente VIC, Hs00154192_m1) (Applied Biosystems). Y para POLR1IA (marcador fluorescente VIC, HS00172187) y 18S (marcador fluorescente FAM, 4352656-0611009) (Applied Biosystems) que utilizamos como genes constitutivos. Las muestras se realizaron por triplicado y los resultados representan el promedio ^{+/-} la desviación estándar (D.E.) de la expresión relativa de BMP2. Los datos se analizaron comparando la expresión relativa del gen BMP2 contra la del gen constitutivo POLR1IA por el método de 2^{-ΔCt} utilizando el paquete de Office Microsoft Excel. Finalmente se analizaron los datos con el programa estadístico del INER (INERStat) para comprobar la significancia de los datos obtenidos por medio de una prueba “t de Student”, tomando aquellos con un valor de p<0.05 como significativos.

- RT-PCR

Para realizar la retrotranscripción del ARN obtenido, se utilizó el kit de ThermoScientific antes mencionado utilizando las siguientes concentraciones de cada uno de los componentes y las siguientes condiciones del termociclador:

Condiciones:

Ciclos	Temperatura
1 Hold	42° 30'
1 Hold	95° 2'

Tabla 2. Condiciones del termociclador para realizar la RT-PCR.

Concentraciones de los reactivos:

Reactivo	Concentración
Buffer 10X	4μl por reacción
dNTP's (dinucleótidos trifosfatados)	2μl por reacción
Hexámeros al azar	1μl por reacción
RT Enhancer	1μl por reacción
Enzima RT VersoEnzyme	1μl por reacción
H2O	dependiendo la muestra

Tabla 3. Mezcla de reactivos para la RT-PCR por cada reacción.

- PCR tiempo real.

Para cada reacción de PCR de cada línea celular y de cada muestra, se hizo de la siguiente manera y se corrió en las siguientes condiciones del termociclador.

Condiciones:

Ciclos	Temperatura
1 Hold	50° 2' y 55° 10'
40 ciclos (40X)	95° 15", 50° 1'

Tabla 4. Condiciones del termociclador para realizar la PCR en tiempo real.

Concentraciones de los reactivos:

Reactivo	Concentración
MgCl ₂ (25mM) (Invitrogen)	0.6 µl por reacción
Buffer 10X (Invitrogen)	1.5 µl por reacción
dNTP's (200µM) (Invitrogen)	0.75 µl por reacción
Sondas (20X) (FAM, VIC) (18S, POLR1IA, BMP2) (Applied Biosystems)	0.3 µl por reacción
Taq Platinum 5U/µl (Invitrogen)	0.25 µl por reacción
H ₂ O DEPC (0.1%) (Sigma)	9.6 µl por reacción

Tabla 5. Mezcla de reactivos para la qPCR por cada reacción.

RESULTADOS:

Se analizó la expresión de BMP2 en un cultivo primario de fibroblastos derivados de pulmón normal procedente de una lobectomía: (N13) pasaje 8 y en una línea comercial de fibroblastos de pulmón humano normal: (NHLF) en pasaje 10. Inicialmente se usó como control de amplificación el 18S.

En ambas líneas de fibroblastos el 18S se amplificó en el ciclo: 8.60 N13 y 10.65 NHLF.

Como se muestra en la Figura 8 sólo se logró amplificar la expresión de BMP2 relativa al 18 S en la línea (NHLF).

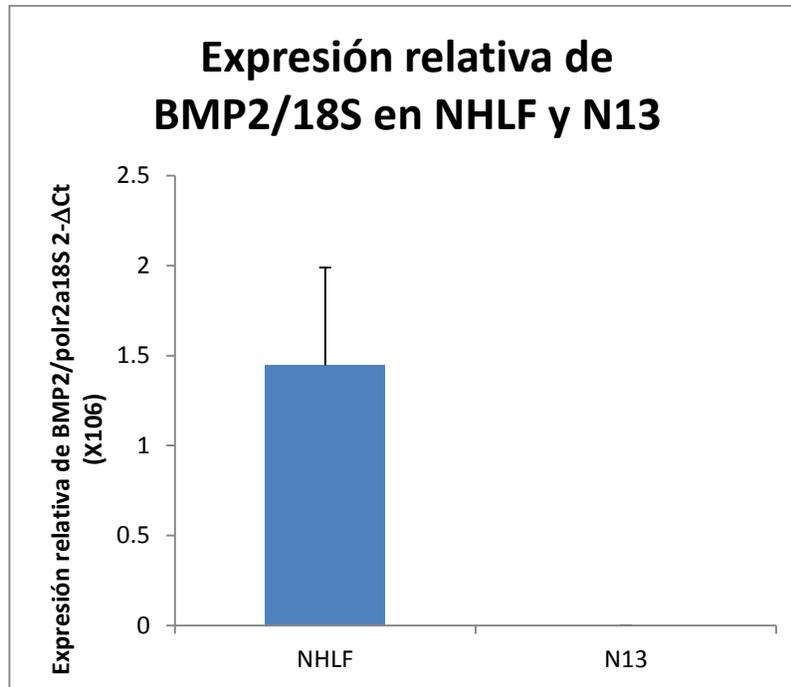


Fig.8. **Expresión relativa de BMP2/POLRIIA en el cultivo primario N13 y en la línea NHLF.** Gráfica que muestra la expresión relativa del gen BMP2 normalizado contra su endógeno 18s por el método 2-ΔCt. El nivel de mRNA fue determinado por la técnica de PCR cuantitativo en fibroblastos humanos de pulmón normal del cultivo primario procedente de una lobectomía (N13) en pasaje 8 y de la línea comercial (NHLF) en pasaje 10. Los valores fueron multiplicados por la potencia (10⁶) para hacerlos más ilustrativos. Los resultados son representativos de un experimento por duplicado y muestran las medias +/- la D.E.

Ante la posibilidad de que el ARN del cultivo primario N13 estuviera degradado se muestra la relación 260/280.

Cociente 260/280: 1.67 N13 y 1.85 NHLF.

Se puede trabajar con el ARN del cultivo primario N13 aunque su cociente 260/280 es más bajo que el de la línea NHLF y no es el ideal de 1.80. Por lo que pudiera haber alguna contaminación con proteínas, lo cual disminuye la calidad del ARN y podría explicar en parte porque no se observó la expresión del gen BMP2 en el cultivo primario. Por otro lado si tomamos en cuenta los Ct's, podríamos considerar que los dos endógenos, tanto 18S como POLRIIA amplifican en ciclos adecuados, lo cual también nos puede decir que el ARN se encontraba en buena calidad para trabajarlo, ya que si hubiese estado degradado, los endógenos probablemente hubieran amplificado en ciclos más tardíos.

Por otro lado se utilizó un nuevo gen de referencia POLR1IA el cual amplificó para ambas líneas en el ciclo: 25.38 N13 y 26.99 NHLF.

Al analizar la expresión relativa de BMP2 contra su endógeno POLR1IA como se muestra en la figura 10, sólo se logró amplificar en la línea comercial NHLF.

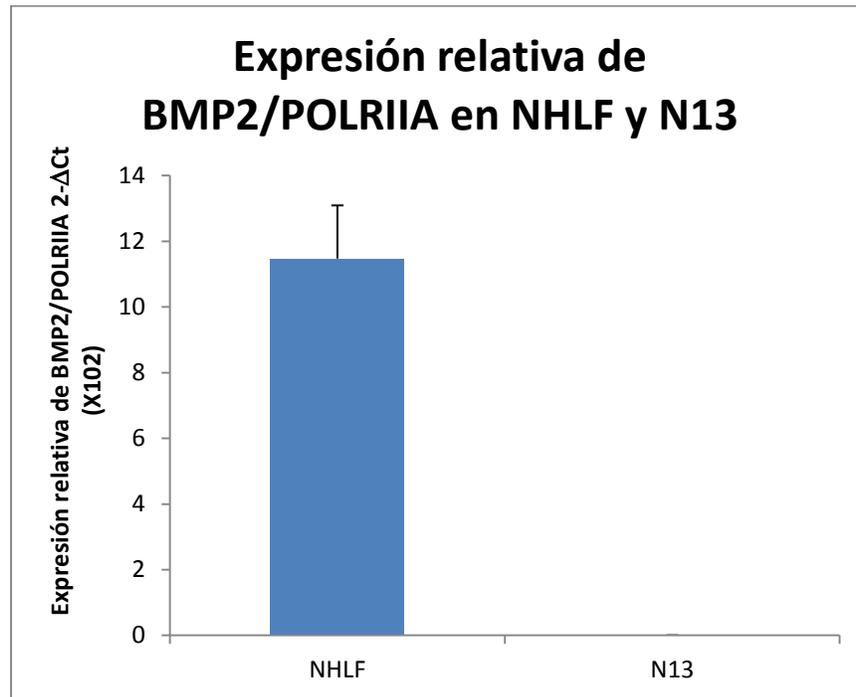


Fig.9. **Expresión relativa de BMP2/POLR1IA en el cultivo primario N13 y la línea NHLF** Gráfica que muestra la expresión relativa del gen BMP2 normalizado contra su endógeno POLR1IA por el método 2-ΔCt. El nivel de mRNA fue determinado por la técnica de PCR cuantitativo en fibroblastos humanos de pulmón normal del cultivo primario procedente de una lobectomía (N13) en pasaje 8 y de la línea comercial (NHLF) en pasaje 10. Los valores fueron multiplicados por la potencia (10^2) para hacerlos más ilustrativos. Los resultados son representativos de un experimento por duplicado y muestran las medias \pm la D.E.

En la línea celular NHLF se muestra un aumento significativo en la expresión relativa de BMP2 (datos analizados con el endógeno POLR1IA) (Fig.10), cuando fueron tratadas con el inhibidor de las clases I y II de HDAC's TSA, aproximadamente 1.5 veces más ($p=0.000091$), el pan inhibidor SB939 casi igual que con TSA ($p=0.000030$) y en menor medida con el inhibidor de sirtuinas, principalmente la sirtuina I, JGB1741 aproximadamente 0.5 veces más ($p=0.036362$) con respecto al vehículo. VPA no presentó diferencias significativas ya que fue comparado contra el control (Fig.11) sólo con medio F12 debido a que su vehículo no fue DMSO sino PBS1X. La Fig.10 y 11 son representativas de un

experimento por duplicado en placas de 6 pozos y las muestras se analizaron por triplicado en el experimento de qPCR.

En el cultivo primario N13 no se observó la expresión de BMP2 (Datos no mostrados), cuando estos fueron tratados con los inhibidores de HDAC's sólo se observó la expresión de los dos endógenos. Lo anterior es resultado de un experimento por duplicado en placas de 6 pozos y se analizaron las muestras por triplicado por qPCR. Se usaron en el mismo experimento dos controles positivos por triplicado, uno de una muestra cADN del INER proveniente de fibroblastos de pacientes con FPI que se sabe amplifica al gen y si se observó su expresión y el otro de cADN proveniente de células A549 que se sabe sobre expresan a BMP2^(96; 97), y también se observó su expresión, lo cual descarta que hubiese habido algún error a la hora de realizar el experimento o que el aparato no leyera la sonda.

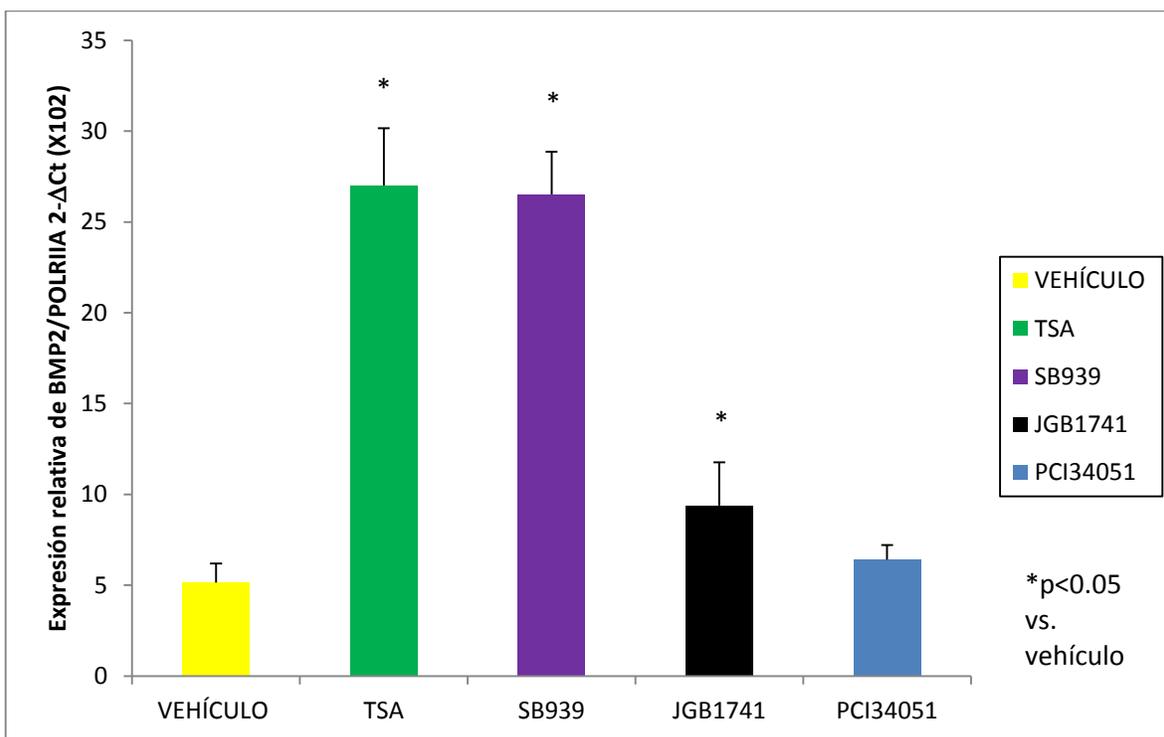


Fig.10. **Aumento en la expresión relativa de BMP2/POLR1IA en fibroblastos normales NHLF con TSA, SB939 Y JGB1741.** Gráfica que muestra la expresión relativa del gen BMP2 normalizado contra su endógeno POLR1IA por el método 2-ΔCt. El nivel de mRNA fue determinado por la técnica de PCR cuantitativo en fibroblastos humanos de pulmón normal de la línea comercial NHLF en pasaje 10, tratados con distintos inhibidores de HDAC's., los cuales se muestran en la leyenda. Los resultados son representativos de un experimento por duplicado y muestran las medias \pm la D.E. * $p < 0.05$ vs. Vehículo. (t de Student). Los valores fueron multiplicados por la potencia (10^2) para hacerlos más ilustrativos. Vehículo: F12s/suero + DMSO 0.1%, TSA 500nM, SB939 1 μ M, JGB1741 1 μ M, PCI34051 5 μ M.

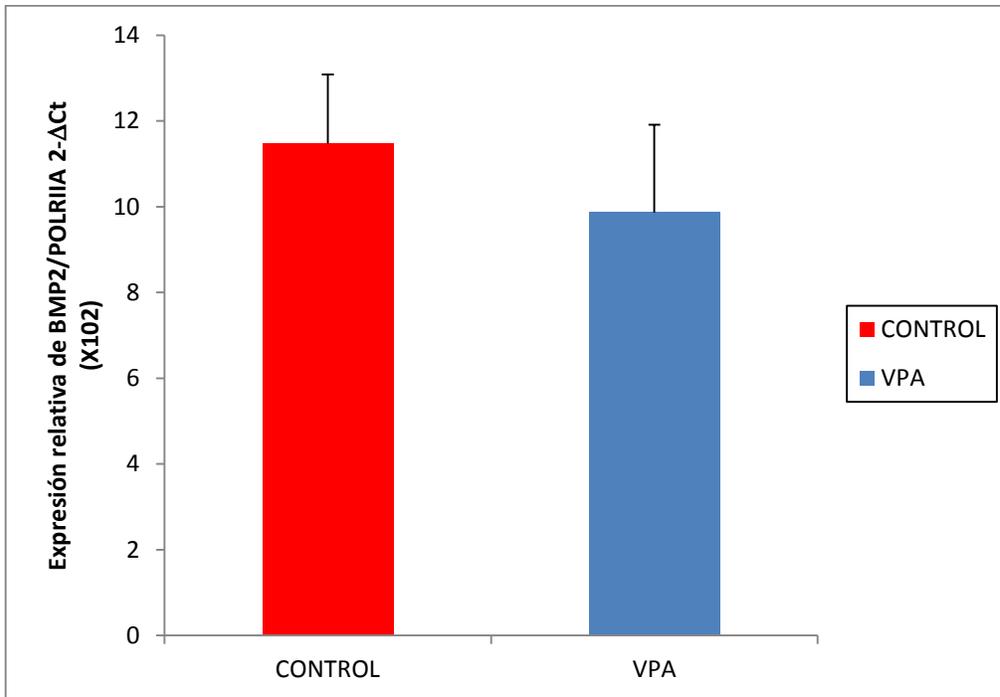


Fig.11. **Expresión relativa de BMP2/POLR1A en fibroblastos normales NHLF con VPA.** Gráfica que muestra la expresión relativa del gen BMP2 normalizado contra su endógeno POLR1A por el método 2- Δ Ct. El nivel de mRNA fue determinado por la técnica de PCR cuantitativo en fibroblastos humanos de pulmón normal de la línea comercial NHLF en pasaje 10, tratados con VPA. Los resultados son representativos de un experimento por duplicado y muestran las medias \pm la D.E. Los valores fueron multiplicados por la potencia (10^2) para hacerlos más ilustrativos. Control: Medio F12 s/suero y s/DMSO, VPA 1 μ M.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad devastadora, de etiología desconocida, crónica, progresiva e irreversible, de la cual se desconocen gran parte de los mecanismos moleculares que propician su desarrollo y evolución (1).

Actualmente por diversos estudios de microarreglos, se sabe que muchas vías de desarrollo embrionario se encienden en esta patología (7; 16; 34). Algunas de estas vías embrionarias ya han sido exploradas en trabajos anteriores, como son la vía de Shh (Sonic Hedgehog) (98), la de Wnt/ β catenina, entre otras, incluyendo la de TGF β y su superfamilia. BMP2 es uno de los miembros de la superfamilia de TGF β y participa en distintos procesos biológicos como el cierre de heridas, la remodelación de la matriz extracelular y el control de la transición epitelio mesénquima durante la embriogénesis (15; 18; 19). BMP2 es una de estas moléculas que por estudios de microarreglos y por PCR cuantitativo, se ha visto disminuida su expresión en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. Además se ha relacionado la baja expresión de BMP2 en otros procesos fibrosantes de otros órganos, principalmente en páncreas y en riñón (36; 37; 38; 39).

Se vuelve importante mencionar que no sólo este miembro de la superfamilia de TGF β y particularmente de la familia de las BMP's se ha visto implicado en procesos fibrosantes. Por ejemplo, BMP4 se ha visto sobreexpresado en tejidos pulmonares de pacientes con FPI, principalmente en células epiteliales alveolares. Por el contrario Gremlin, el cual es un inhibidor de varios miembros de la superfamilia de TGF β , se ha encontrado sobreexpresado en células mesenquimales del parénquima pulmonar, principalmente fibroblastos (34). En otros trabajos mencionan a BMP7 como un miembro de la superfamilia de TGF β que protege contra los procesos fibrosantes de distintos órganos y que tiene un efecto antagonista sobre TGF β , pero también puede modular los efectos de su gen blanco CTGF. BMP7 también se ha visto disminuido en FPI y en otros procesos fibrosantes como el hígado, el riñón, el corazón, etc (41; 45).

Actualmente se sabe que el silenciamiento de varios genes tanto en procesos fisiológicos como patológicos puede ocurrir a través de modificaciones epigenéticas (51). El ambiente es un claro modulador de la expresión génica y existen diversos modelos de estudio como el del ratón Agouti (por el color de su pelaje), en donde la dieta alta o baja en donadores de grupos metilo, puede modificar el fenotipo de los animales, haciéndolos propensos a enfermedades como la obesidad (52). Ya existen incontables trabajos publicados acerca del ambiente y su relación con el genoma, es decir, la epigenética (48; 49).

Dentro de las modificaciones epigenéticas que se han descrito, encontramos las modificaciones post-traduccionales en las histonas como la acetilación/desacetilación de los residuos de aminoácidos que se encuentran en los extremos amino terminales de las “colas” de histonas (51; 68; 69; 70). A su vez se ha propuesto que hay marcas en las histonas que combinadas pueden constituir un código que tiene un resultado final en la actividad transcripcional de algún gen en particular (52; 93).

Es por ello que nos interesó conocer si la actividad transcripcional del gen BMP2, el cual ya se mencionó se encuentra silenciado en la FPI, podía estar modulada por procesos epigenéticos. Inicialmente se intentó ver si había algún proceso de metilación en el promotor del gen BMP2. En fibrosis pulmonar idiopática existen pocos trabajos que abordan metilación global de los promotores de genes en el proceso patológico. Se ha encontrado que existe un patrón de hipometilación global e hipermetilación particular de ciertos genes, muy similar a lo que ocurre en enfermedades neoplásicas (52; 99; 100).” En realidad los resultados de ambos trabajos son poco convergentes, lo cual hace difícil su interpretación, aunque hay varios aspectos técnicos que podrían explicar tales diferencias. En estos estudios de metilación global se analiza la expresión de genes en tejido pulmonar total, lo cual a veces puede enmascarar lo que ocurre a nivel de un tipo celular en particular; además del pequeño tamaño muestral utilizado” (101). Por el contrario hay estudios donde se aborda la metilación de genes en FPI en modelos celulares in vitro por separado (62; 63). Se intentó ver si con el inhibidor de Dnmt's (5'-aza-2'-deoxicitidina) había una recuperación en la expresión del gen BMP2 en fibroblastos humanos normales y de FPI por PCR en tiempo real, sin embargo, no se observaron diferencias entre los tratados y controles (Datos no mostrados). Por lo tanto se decidió evaluar si era posible modificar la expresión del gen inhibiendo otro proceso epigenético que es la desacetilación de histonas. Se sabe que la modificación en la expresión por el uso de estos inhibidores no es del todo indiscriminada y en líneas celulares de linaje linfóide, se ha observado que con TSA el cual es un inhibidor de la clase de los hidroxamatos, se modifica la expresión de tan sólo el 2% de 340 genes analizados ya sea incrementándola o disminuyéndola. También se ha observado que en distintas líneas celulares tumorales cultivadas por 48 horas, se modifican entre el 7 y el 10% de los genes utilizando butirato, TSA, MS-275, SAHA o FK228. Por lo tanto la modificación en la expresión de ciertos genes es selectiva dependiendo de los complejos proteicos ubicados en esos sitios transcripcionales y se ha observado que esta es proporcional entre genes que aumentan su expresión y genes que la disminuyen (78). En algunas ocasiones la modificación en la expresión puede deberse directamente al aumento en la acetilación en los extremos amino terminales de las histonas de ciertos genes, o en otras ocasiones puede ser de una forma más

indirecta ya que las HDAC's también tienen efecto en proteínas no histónicas (75; 78).

En otros trabajos se han observado efectos positivos con el uso de TSA y SAHA en la recuperación de algunos genes importantes que se apagan en FPI, así como evitar la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos evitando de esa manera la presencia de las células efectoras del proceso fibrosante (61; 67; 80; 81; 82). Los otros dos inhibidores no han sido tan ampliamente utilizados y son compuestos experimentales, en los cuales se han visto resultados positivos principalmente en cáncer (SB939 y JGB1741, Cayman Chemical).

Con VPA no se observan diferencias significativas con respecto al control sólo, con medio F12 sin suero. Se comparó contra el control sólo y no contra el vehículo, ya que este inhibidor venía en polvo y no se diluyó en DMSO sino en PBS1X y posteriormente en medio F12 sin suero. Es importante recalcar que al menos en la clínica el VPA se ha usado en pacientes con desordenes neurológicos como ataques epilépticos, y que se usa en concentraciones mayores al TSA, es decir, en concentraciones del orden de mM (78). Sin embargo en distintos trabajos ha sido reportada la alta toxicidad que tiene este fármaco en esas concentraciones y en modelos celulares, en donde mencionan concentraciones de entre 100 y 200 μ M como dosis subtóxicas, lo cual puede ser una causa de porque con VPA no se observó ninguna diferencia, ya que al igual que TSA es un inhibidor de la clase I y IIa, pero principalmente de la I; sin embargo, es un inhibidor menos potente que el TSA o SAHA (78; 95). En este mismo trabajo se menciona la capacidad inhibitoria que tiene TGF β sobre BMP2 y BMP7, a través de las proteínas Ski y SnoN, y como con el uso VPA en las concentraciones mencionadas, se puede inducir la transcripción de estos genes midiéndolo con un aumento en la cantidad de luciferasa en el reportero de la Smad 1/5/8. Como se mencionó en los métodos, el inhibidor JGB1741 estaba diluido en un compuesto orgánico distinto al DMSO que es el DMF (Dimetilformamida), sin embargo, tiene propiedades químicas similares al DMSO y en la hoja técnica del inhibidor se menciona que puede ser usado indistintamente uno u otro (Cayman Chemical #10641).

Por lo tanto de una forma propositiva o sugerente, podríamos pensar que las HDAC's que podrían estar modulando y silenciando la expresión de BMP2 podrían pertenecer a la clase I o II, y en menor medida la III de desacetilasas de histonas, ya que con TSA se observó un aumento significativo ($p=0.000091$) en la expresión de BMP2 con respecto a su control (vehículo). A su vez se observó un aumento ($p=0.000030$) en la expresión con el pan inhibidor SB939, sin embargo, al inhibir a distintas clases de HDAC's se vuelve imposible inferir particularmente cual podría estar silenciando al gen con este inhibidor. Finalmente con el inhibidor JGB1741,

el cual es un inhibidor de sirtuinas, se observó una diferencia significativa ($p=0.036362$) con respecto al vehículo, lo cual también puede sugerir que algún miembro de la clase III de HDAC's, principalmente la sirtuina I, puede estar modulando la expresión de BMP2 aunque en menor medida. Como se menciona en la introducción, se podría aumentar la concentración del inhibidor para ver si se recupera más la expresión, ya que su IC_{50} es de $15\mu M$, aunque hay que tomar en cuenta que esta concentración fue determinada en condiciones diferentes (ensayo libre de células). A mayores concentraciones además puede inhibir a otros miembros de la clase III de sirtuinas por lo que se podría descartar su participación. El inhibidor de la HDAC8, PCI34051, no presentó diferencias significativas con respecto al vehículo, por lo que podríamos pensar que esta enzima que pertenece a la clase I no juega ningún papel en el silenciamiento de BMP2, además de ser más específica en sus sustratos. Este inhibidor tiene la capacidad de contrarrestar la actividad de otras HDAC's de la clase I y de la clase IIB, sin embargo, no se emplearon las concentraciones a las cuales tiene esas capacidades inhibitorias, por lo que un aumento en la concentración podría reflejar cambios en la expresión de BMP2. A la concentración utilizada también inhibe a las HDAC1, sin embargo, al no presentar diferencias, podríamos pensar que esta enzima tampoco juega un papel en el silenciamiento. En relación a lo último se ha reportado que tanto la concentración como el tiempo de exposición a distintos iHDAC's influye en la modificación de la expresión génica (⁷⁸).

Como se mencionó en la sección de resultados también se evaluó la expresión de BMP2 en la línea celular N13, procedente de un cultivo primario de una lobectomía. En este caso sólo pude observar la expresión de los controles endógenos, tanto de POLR2A como del 18S ribosomal. La posible explicación a esto es que entre distintas líneas celulares hay una gran heterogeneidad y que su expresión era tan baja que no alcanzó el Ct o ciclo umbral para poder analizarse. Otra explicación es que al proceder de una lobectomía practicada a pacientes con cáncer, a pesar de tomar una sección del tejido histológicamente "normal", la señalización parácrina que pueden tener las células tumorales ya ha sido documentada, pudiendo afectar la expresión génica de células en otras partes del tejido o en otros tejidos, sin embargo se desconoce la causa (¹⁰²).

Se hace necesario mencionar que este trabajo tiene como objetivo analizar la expresión de BMP2 en líneas celulares de fibroblastos humanos normales. Hace falta comparar estos resultados con líneas celulares derivadas de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y observar si realmente la expresión basal de BMP2 es menor en las últimas y si se observa una mayor recuperación con los distintos iHDAC's. Por otro lado también es importante analizar la expresión del gen a nivel de proteína, ya que entre el ARN mensajero y la proteína puede haber otros

puntos de regulación como ARN's de silenciamiento pequeños o miARN's que puedan afectar la expresión del gen. Otras técnicas como CHIP-PCR o alguna otra variante del CHIP (Chromatin Immunoprecipitation) también nos servirían para determinar exactamente que clases y que miembros de estas clases de HDAC's pueden estar modulando la expresión del gen y comparar líneas celulares normales con líneas derivadas de pacientes con FPI para observar si hay alguna diferencia (⁵¹). Además se hace necesario repetir los experimentos de metilación del gen con otras técnicas como bisulfito de sodio, por ejemplo, para observar si ocurre metilación en el promotor del gen, ya que hay islas CpG susceptibles de ser metiladas.

Podemos concluir que en la línea celular NHLF en pasaje 10 se observó un aumento en la expresión de BMP2 con TSA, SB939 y JGB1741, lo cual sugiere que este proceso epigenético de desacetilación puede modular la expresión de BMP2 en estas células y que los miembros de HDAC's que podrían estar participando en este silenciamiento pueden pertenecer a la clase I o II y también en menor medida a la clase III de sirtuinas. Podríamos también decir que la HDAC8 y HDAC1 que pertenecen a la clase I probablemente no participan en el silenciamiento de BMP2, sin embargo, hacen falta más estudios para esclarecer el papel de cada una de estas enzimas en el silenciamiento de BMP2 tanto en fibroblastos humanos de pulmón normal como en fibroblastos de FPI.

Finalmente los iHDAC's pueden tener un papel terapéutico en la fibrosis pulmonar idiopática, ya que se han visto involucrados en la recuperación de la expresión de otros genes importantes en el desarrollo de fibrosis pulmonar idiopática como COX2 por poner sólo un ejemplo u otros miembros de la familia de las BMP's, como BMP7, lo cual fue mencionado en la introducción (^{65; 80}).

REFERENCIAS:

- 1- Gross TJ, Hunninghake GW (2001). Idiopathic Pulmonary Fibrosis. New England Journal of Medicine 345: 517-525.
- 2- Selman M, King TE, Pardo A (2001). Idiopathic Pulmonary Fibrosis: prevailing and evolving hypothesis about its pathogenesis and implications for therapy. Ann Intern Med 134:136-151.
- 3- Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch JP 3rd, Martínez FJ (2004). Mechanisms of pulmonary fibrosis. Annu Rev Med. 55: 395-417.
- 4- King TE Jr. (2005). Clinical advances in the diagnosis and therapy of the interstitial lung diseases. Am J Respir Crit Care Med; 172: 268-79.
- 5- Lawson WE, MD, Loyd JE, MD, Degryse AL, MD (2011). Genetics in pulmonary fibrosis-familial cases provide clues to the pathogenesis of IPF. Am J Med Sci; 341(6): 439-443.
- 6- Keogh BA, Crystal RG (1982). Alveolitis:the key to the interstitial lung disorders. Thorax; 37:1-10.
- 7- Pardo A, Gibson K, Cisneros J, et al. (2005). Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. PLoS Med; 2:e251.
- 8- Selman M, Thannickal VJ, Pardo A, et al. (2004). Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. Drugs; 64: 405-430.
- 9- Andersson-Sjöland A, De Alba CG, Nihlberg K, et al. (2008). Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. Int J Biochem Cell Biol; 40: 2129-40.
- 10- Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, et al. (2005). Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta 1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Pathol; 166: 1321-32.
- 11- Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, et al. (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and regulated by the extracellular matrix. Proc Natl Acad Sci USA; 103: 13180-85.
- 12- Moustakas A, Heldin CH (2007). Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. Cancer Sci; 98: 1512-20.
- 13- Huber MA, Kraut N, Beug H (2005). Molecular requirements for epithelial mesenchymal transition during tumor progression. Curr Opin Cell Biol; 17: 548-58.
- 14- Selman M, Pardo A, Kaminski N (2008). Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs. PLoS Medicine; 5: 373-80.

- 15- Studer SM, Kaminski N (2007). Towards systems biology of human pulmonary fibrosis. Proc Am Thorac Soc; 4: 85-91.
- 16- Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, et al. (2006). Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. Am J Respir Crit Care Med; 173:188-198.
- 17- Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, et al. (2002). Gene expression analysis reveals matrylisin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. Proc Natl Acad Sci USA; 99: 6292-6297.
- 18- Lin SJ, Lerch TF, Cook RW, Jandetzky TS, Woodruff TK, (2006). The structural basis of TGF-beta, bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. Reproduction; 132: 179-190.
- 19- Wahab NA, Mason RM (2006). A critical look at growth factors and epithelial-to-mesenchymal transition in the adult kidney. Interrelationships between growth factors that regulate EMT in the adult kidney. Nephron Exp Nephrol; 104: e129-e134.
- 20- Lavery K, et al. (2008). J Biol Chem; 283 (30) 20948.
- 21- Kawabata M, Imamura T, Miyazono K (1998). Cytokine growth factor Rev; 9 (1) 49.
- 22- Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ (2007). Biochem Biophys Res Commun; 362 (3) 550.
- 23- Sieber C, et al. (2009). Cytokine Growth Factor Rev; 20 (5-6) 343.
- 24- Nelsen SM, Christian JL (2009). J Biol Chem; 284 (40) 27157.
- 25- Nohe A, et al. (2004). Cell Signal; 16 (3) 291.
- 26- Little SC, Mullins MC (2009). Nat Cell Biol; 11 (5) 637.
- 27- Israel DI, et al. (1996). Growth Factors; 13 (3-4) 291.
- 28- Anderson KV, et al. (1992). Cold Spring Harb Symp Quant Biol; 57 409.
- 29- Urist MR (1965). Science; 150 (698) 893.
- 30- Mazerbourg S, Hsueh AJ (2006). Hum Reprod; Update 12 (4) 373.
- 31- Bubnoff A von, Cho KW (2001). Dev Biol; 239 (1) 1.
- 32- Shi Y, Massagué J (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell; 113: 685-700.
- 33- Groope J, et al. (2008). Mol Cell; 29 (2) 157.
- 34- Koli K, Myllärniemi M, Vuorinen K, Salmenkivi K, Ryyänen MJ, Kinnula VL, Keski-Oja J (2006). Bone morphogenetic protein-4 inhibitor Gremlin is overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis. American Journal of Pathology; 169:1.
- 35- Shlyonsky V, Soussia IB, Naeije R, Mies F (2011). Opposing effects of bone morphogenetic protein-2 and endothelin-1 on lung fibroblasts chloride currents. Am J Respir Cell Mol Biol; 45: 1154-1160.
- 36- Gao X, Cao Y, Yang W, Duan C, Aronson JF, Rastellini C, Chao C, Hellmich MR, Ko TC (2013). BMP2 inhibits TGFβ induced pancreatic stellate cell

- activation and extracellular matrix formation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 304: G804-G813.
- 37- Gao X, Cao Y, Staloch DA, Gonzalez MA, Aronson JF, Chao C, Hellmich MR, Ko TC (2014). Bone morphogenetic protein signaling protects against cerulein-induced pancreatic fibrosis. *Plos One*; 9;2.
- 38- Yang YL, Liu YS, Chuang YL, Guh JY, Lee TC, et al. (2009). Bone morphogenetic protein-2 antagonizes renal interstitial fibrosis by promoting catabolism of type I transforming growth factor-beta receptors. *Endocrinology*; 150: 727-740.
- 39- Yang YL, Ju HZ, Liu SF, Lee TC, Shih YW, et al. (2011). BMP2 suppresses renal interstitial fibrosis by regulating epithelial mesenchymal transition. *J Cell Biochem*; 112: 2558-2565.
- 40- Thiery JP, Sleeman JP (2006). Complex networks orchestrate epithelial mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 7:131-142.
- 41- Weiskirchen R, Meurer SK, Gressner OA, Herrmann J, Borkham-Kamphorst E, Gressner AM (2009). BMP7 as antagonist of organ fibrosis. *Frontiers in Bioscience*; 14: 4992-5012.
- 42- Wang S, Hirschberg R (2004). Bone morphogenetic protein-7 signals opposing transforming growth factor beta in mesangial cells. *J Biol Chem* 279:23200-23206
- 43- Leask A, Abraham DJ (2006). All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci*; 119: 4803-4810.
- 44- Gressner OA, Gressner AM, (2008). Connective tissue growth factor: A fibrogenic master switch in fibrotic liver diseases. *Liver Int*; 28:1065-1079.
- 45- Myllärniemi M, Lindholm P, Ryyänen MJ, Kliment CR, Salmenkivi K, Keski-Oja J, Kinnula VL, Oury TD, Koli K (2008). Gremlin-mediated decrease in bone morphogenetic protein signaling promotes pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*; 177: 321-329.
- 46- Hu B, Wu Z, Phan SH (2003). Smad 3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 29: 397-404.
- 47- Feng Xin-Hua, Derynck R (2005). Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 21: 659-93.
- 48- Alegría-Torres JA, Baccarelli A, Bollati V (2011). Epigenetics and lifestyle. *Epigenomics*; 3; 3: 267-277.
- 49- Liu F, Killian JK, Yang M, Walker RL, Hong JA, Zhang M, Davis S, Zhang Y, Hussain M, Xi S, Rao M, Meltzer PA, Schrumph DS (2010). Epigenomic alterations and gene expression profiles in respiratory epithelia exposed to cigarette smoke condensate. *Oncogene*; 29: 3650-3664.
- 50-Haig D (2004). The (Dual) origin of epigenetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 69: 1-4.

- 51- Teperino R, Lempradl A (2013). Bridging epigenomics and complex disease: the basics. Cell Mol Life Sci; 70: 1609-1621.
- 52- Esteller Manel (2011). Epigenetic changes in cancer. F1000 Biology Reports; 3:9.
- 53- Kakihana M, Ohira T, Chan D, Webster RB, Kato H, Drabkin HA, Gemmill RM (2009). Induction of E-cadherin in lung cancer and interaction with growth suppression by histone deacetylase inhibition. J Thorac Oncol; 4;12: 1455-1465.
- 54- Feinberg AP (2007). Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. Nature; 447; 7143: 433-440.
- 55- Ling C, Groop L (2009). Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. Diabetes; 58; 12: 2718-2725.
- 56- Hewagama A, Richardson B (2009). The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. J Autoimmun; 33; 1: 3-11.
- 57- Schanen NC (2006). Epigenetics of autism spectrum disorders. Hum Mol Genet; 15; 2: R138-R150.
- 58- Pang M, Zhuang S (2010). Histone Deacetylase: A potential therapeutic target for fibrotic disorders. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics; 335: 266-272.
- 59- Yang IV (2012). Epigenomics of idiopathic pulmonary fibrosis. Epigenomics; 4; 2: 195-203.
- 60- Huang SK, Scruggs AM, Donaghy J, Horowitz JC, Zaslona Z, Przybranowski S, White ES, Peters-Golden M (2013). Histone modifications are responsible for decreased Fas expression and apoptosis resistance in fibrotic lung fibroblasts. Cell Death and Disease; 4: 1-8.
- 61- Zhang Xiangyu, Liu H, Hock T, Thannickal VJ, Sanders YY. Histone deacetylase inhibition downregulates collagen 3A1 in fibrotic lung fibroblasts. Int J Mol Sci; 14: 19605-19617.
- 62- Sanders YY, Pardo A, Selman M, Nuovo GJ, Tollefsbol TO, Siegal GP, Hagood JS (2008). Thy promoter hypermethylation. A novel epigenetic pathogenic mechanism in pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol; 39: 610-618.
- 63- Cisneros J, Hagood J, Checa M, Ortiz-Quintero B, Negreros M, Herrera I, Ramos C, Pardo A, Selman M (2012). Hypermethylation-mediated silencing of p14^{ARF} in fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Lung Cell Mol Physiol; 303: L295-L303.
- 64- Coward WR, Watts K, Feghali-Bostwick CA, Jenkins G, Pang L (2010). Repression of IP10 by interactions between histone deacetylation and hypermethylation in idiopathic pulmonary fibrosis. Molecular and Cellular Biology; 30; 12: 2874-2886.

- 65- Coward WR, Watts K, Feghali-Bostwick CA, Knox A, Pang L (2009). Defective histone acetylation is responsible for the diminished expression of Cyclooxygenase 2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Mol Cell Biol*; 29; 15: 4325-4339.
- 66- Winbanks CE, Wang B, Beyer C, Koh P, White L, Kantharidis P, Gregorevic P (2011). TGF- β Regulates miR-206 and miR-29 to control myogenic differentiation through regulation of HDAC 4. *The Journal of Biological Chemistry*; 286; 16: 13805-13814.
- 67- Guo W, Shan B, Klingsberg RC, Qin X, Lasky JA (2009). Abrogation of TGF β 1- induced fibroblast-myofibroblast differentiation by histone deacetylase inhibition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 297: L864-L870.
- 68- Tan M, et al., (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*; 146; 6: 1016-1028.
- 69- Martin C, Zhang Y (2007). Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol*; 19: 266-272.
- 70- Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, Allis CD (2007). Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding molecules. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 8: 983-994.
- 71- Jiang C, Pugh BF (2009). Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nature Reviews/Genetics*; 10: 161-172.
- 72- Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, Thannickal VJ, Kaminski N, Abraham E (2010). MiR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med*; 207; 8: 1589-1597.
- 73- Miele A, Dekker J (2008). Long-range chromosomal interactions and gene regulation. *Mol Biosyst*; 4; 11: 1046-1057.
- 74- Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*; 401: 188-193.
- 75- Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA (2007). Histone deacetylase inhibitors: Overview and perspectives. *Mol Cancer Res*; 5: 981-989.
- 76- Jones PL, Veenstra GJC, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics*; 19: 187-191.
- 77- Richards EJ (2002). Chromatin methylation: Who's on first?. *Current Biology*; 12: R694-R695.
- 78- Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*; 26: 5541-5552.
- 79- Butler LM, Zhou X, Xu W-S, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM (2002). The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cells growth,

- up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and downregulates thioredoxin. PNAS; 99; 18: 11700-11705.
- 80- Manson SR, Song JB, Hruska KA, Austin PF (2013). The HDAC- dependent transcriptional repression of BMP7 potentiates TGF β - mediated renal fibrosis in obstructive uropathies. The Journal of Urology (In Press).
- 81- Niki T, Rombouts K, De Blesser P, De Smet K, Rogiers V, Schuppan D, Yoshida M, Gabbiani G, Geerts A (1999). A histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, suppresses myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture. Hepatology; 29: 858-867.
- 82- Z Wang, Chen C, Finger SN, M SKM, Jung M, Schwarz H, Swanson N, Lareu RR, Raghunath M (2009). Suberoylanilide hydroxamic acid: a potential epigenetic therapeutic agent for lung fibrosis. Eur Respir J; 34:145-155.
- 83- Monneret C (2007). Histone deacetylase inhibitors for epigenetic therapy of cancer. Anticancer Drugs; 18: 363-370.
- 84- Grant C, Rahman F, Piekarz R, Peer C, Frye R, Robey RW, Gardner ER, Figg WD, Bates SE (2010). Romidepsin: a new therapy for cutaneous T-cell lymphoma and a potential therapy for solid tumors. Expert Rev Anticancer Ther; 10: 997-1008.
- 85- Noh H, Oh EY, Seo JY, Yu MR, Kim YO, Ha H, Lee HB (2009). Histone deacetylase-2 is a key regulator of diabetes- and transforming growth factor-beta 1- induced lung injury. Am J Physiol Renal Physiol; 297: F729-F739.
- 86- Kee HJ, Sohn IS, Nam KI, Park JE, Qian YR, Yin Z, Ahn Y, Jeong MH, Bang YJ, Kim N, et al., (2006). Inhibition of histone deacetylation blocks cardiac hypertrophy induced by angiotensin II infusion and aortic banding. Circulation; 113: 51-59.
- 87- Huber LC, Distler JH, Moritz F, Hemmatazad H, Hauser T, Michel BA, Gay RE, Matucci-Cerinic M, Gay S, Distler O (2007). Trichostatin A prevents the accumulation of extracellular matrix in a mouse model of bleomycin-induced skin fibrosis. Arthritis Rheum; 56: 2755-2764.
- 88- Wang JC, Chen C, Dumlao T, Naik S, Chang T, Xiao YY, Sominsky I, Burton J (2008). Enhanced histone deacetylase enzyme activity in primary myelofibrosis. Leuk Lymphoma; 49: 2321-2327.
- 89- Rubenstein RC, Egan ME, Zeitlin PL (1997). In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. J Clin Invest; 100: 2457-2465.
- 90- Miller TA, Witter DJ, Belvedere S (2003). Histone deacetylase inhibitors. J Med Chem; 46: 5097-5116.
- 91- Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK (2004). Histone deacetylase inhibitors. Adv Cancer Res; 91:137-168.

- 92- Dokmanovik M, Marks PA (2005). Prospects: histone deacetylase inhibitors. J Cell Biochem; 96: 293-304.
- 93- Marks PA, Xu WS (2009). Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. J Cell Biochem; 107: 600-608.
- 94- Mack GS (2006). Epigenetic cancer therapy makes headway. J Natl Cancer Inst; 98: 1443-1444.
- 95- Enhert S, Zhao J, Pscherer S, Freude T, Dooley S, Kolk A, Stöckle U, Nussler AK, Hube R (2012). Transforming growth factor β 1 inhibits bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-7 signaling via upregulation of Ski-related novel protein N (SnoN): possible mechanism for the failure of BMP therapy?. BMC Medicine; 10:101.
- 96- Lagenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P, Lagenfeld J (2003). The mature bone morphogenetic-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. Carcinogenesis; 24; 9: 1445-1454.
- 97- Fotinos A, Nagarajan N, Martins AS, Fritz DT, Garsetti D, Lee AT, et al. 2014. Bone morphogenetic protein focused strategies to induce cytotoxicity in lung cancer cells. Anticancer Research; 34: 2095-2104.
- 98- Lozano Bolaños A, Mendoza Milla C, Cisneros Lira J, Ramírez R, Checa M, Barrera L, García-Álvarez J, Carbajal V, Becerril C, Gaxiola M, Pardo A, Selman M (2012). Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol; 303: L978-L990.
- 99- Sanders YY, Ambalavanan N, Halloran B, Zhang X, Liu H, Crossman KD, Bray M, Zhang K, Thannickal VJ, Hagood JS (2012). Altered DNA methylation profile in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med; 186; 6: 525-535.
- 100- Ravinovich IE, Kapetanaki MG, Steinfeld I, Gibson KF, Pandit KV, et al. (2012). Global methylation patterns in idiopathic pulmonary fibrosis. Plos One; 7 (4): e33770.
- 101- Selman M, Pardo A (2014). Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med; 189; 10: 1161-1172.
- 102- Räsänen K, Herlyn M (2012). Paracrine signaling between carcinoma cells and mesenchymal stem cells generates cancer stem cell niche via epithelial-mesenchymal transition. Cancer Discovery; 2: 775-777.