



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PAPEL DE LA TUBASTATINA A EN LA  
PROLIFERACIÓN Y ACTIVIDAD DE GELATINASAS  
EN FIBROBLASTOS DE PULMÓN.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

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

**SOLEDAD AGUIRRE GARDUÑO**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA**

**Ciudad Universitaria, CD. MX. 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Aguirre  
Garduño  
Soledad  
5523551896  
Universidad Nacional Autonoma de Mèxico  
Facultad de Ciencias  
Biologia  
309015578

2. Datos del Tutor

Dr.  
José Guadalupe  
Cisneros  
Lira

3. Datos del sinodal 1

Dra.  
María de Lourdes  
Segura  
Valdez

4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Víctor Manuel  
Ruiz  
López

5. Datos del sinodal 3

Dr.  
Jorge Antonio  
García  
Alvarez

6. Datos del sinodal 4

Dra.  
María Sandra  
Cabrera  
Benítez

7. Datos del trabajo escrito

Papel de la tubastatina A en la proliferación y actividad de gelatinasas en fibroblastos de pulmón.  
48p  
2017

## **AGRADECIMIENTOS**

Le dedico este trabajo a mi familia, en especial a mi mamá y papá por su apoyo y paciencia así como por su motivación para seguir adelante y no rendirme.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, así como la Facultad de Ciencias por todos los conocimientos que me otorgaron a lo largo de la carrera.

A mis amigos en especial a Fernanda, Angeles y Marco por sus enseñanzas, ayuda y apoyo para realizar este trabajo.

A mis amigos de la prepa por su motivación para seguir adelante y brindarme momentos de diversiones cuando más los necesitaba.

Al laboratorio de biología celular del INER por los conocimientos que me ha otorgado.

Al Dr. José Cisneros por sus enseñanzas, paciencia y apoyo para realizar este trabajo.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Ciclo celular</b> .....	<b>11</b>
1.1. <i>Regulación del ciclo celular</i> .....	<b>11</b>
<b>2. Apoptosis</b> .....	<b>12</b>
<b>3. Metaloproteinasas de matriz extracelular</b> .....	<b>13</b>
<b>4. Gelatinasas</b> .....	<b>15</b>
<b>5. Epigenetica</b> .....	<b>15</b>
5.1. <i>Modificaciones de histonas</i> .....	<b>16</b>
5.1.1. <i>Acetilacion</i> .....	<b>17</b>
5.2. <i>Desacetilasas de histonas (HDACs)</i> .....	<b>17</b>
5.2.1. <i>HDAC 6</i> .....	<b>19</b>
5.2.2. <i>Inhibidores de HDACs</i> .....	<b>19</b>
<b>6. ANTECEDENTES</b> .....	<b>20</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>22</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>Objetivo Generales</b> .....	<b>23</b>
<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>23</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
<b>1. Cultivo celular</b> .....	<b>24</b>
<b>2. Ensayo de Proliferación</b> .....	<b>24</b>
<b>3. Detección de apoptosis</b> .....	<b>24</b>
<b>4. Detección de apoptosis por microscopia de fluorescencia</b> .....	<b>25</b>
<b>5. Ciclo celular</b> .....	<b>26</b>
<b>6. Zimografia</b> .....	<b>27</b>
<b>7. Análisis estadístico</b> .....	<b>27</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>

<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>43</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS.

Cdks:	Cinasas dependientes de ciclinas
MEC:	Matriz extracelular
MMPs:	Metaloproteinasas de matriz extracelular
TGF- $\beta$ :	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- $\alpha$ :	Factor de necrosis tumoral
IPF:	Fibrosis pulmonar idiopática
HAT:	Histonas acetiltransferasas
HDACs:	Desacetilasas de histonas
TSA:	Tricostatina A
$\alpha$ -SMA:	$\alpha$ -actina de musculo liso
SAHA:	Ácido suberoilánilida hidroxámico
Tub A:	Tubastatina A
CPCNP:	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
MT-MMP:	Metaloproteinasas asociadas a membranas
H2A:	Histona 2A
H2B:	Histona 2B
H3:	Histona 3
H4:	Histona 4
acetil-CoA:	Acetil coenzima A
HDAC6:	Desacetilasa de histona 6
NES:	Señal de exportación nuclear
SE14:	Tetrapéptido Ser-Glucontaining
VPA:	Ácido valproico
PI:	Yoduro de propidio
STS:	Estauroesporina

## LISTA DE FIGURAS.

Fig. 1. Esquema de los niveles de ciclinas en el ciclo celular.....	12
Fig. 2. Vía de activación de las caspasas. ....	13
Fig. 3. Representación estructural de las MMPs. ....	14
Fig. 4. Esquema de los principales mecanismos epigenéticos.....	16
Fig. 5. Dominios funcionales de la HDAC6. ....	19
Fig. 6. Efecto de los inhibidores de HDAC en la proliferación celular. ....	28
Fig. 7. Efecto de los inhibidores de HDAC en la apoptosis celular en la línea CCL-206..	31
Fig. 8. Fibroblastos con marca positiva para la caspasa-3 y 7. ....	32
Fig. 9. Detección de la caspasa-3 y caspasa-7 en fibroblastos. ....	32
Fig. 10. Efecto de los inhibidores de HDAC sobre el ciclo celular en células CCL-206. ...	35
Fig. 11. Efecto de los inhibidores de HDAC sobre la actividad de la MMP-2 y MMP-9 en medios condicionados de las células CCL-206. ....	36
Fig. 12. Efecto de los inhibidores de HDAC y TGF- $\beta$ [10nM] en la proliferación de fibroblastos. ....	37
Fig. 13. Efecto de los inhibidores de HDAC mas TGF- $\beta$ (10nM) sobre la actividad de la MMP-2 y MMP-9 en medios condicionados de las células CCL-206.....	38

## LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Función de las ciclinas y sus cdk asociadas.....	11
Tabla 2. Descripción general de la acetilación de histonas. ....	17
Tabla 3. Clasificación de las HDAC. ....	18
Tabla 4. Clasificación de los inhibidores de HDAC. ....	20

## **RESUMEN.**

Las HDAC son enzimas altamente conservadas y son parte importante del control epigenético debido a que pueden modificar la expresión génica por lo que se les ha asociado con diferentes procesos celulares como la proliferación, migración y la apoptosis, entre otras. En los últimos años el estudio de estas enzimas ha tomado importancia debido a que se ha sugerido que su inhibición farmacológica puede reducir la progresión de enfermedades como el cáncer y enfermedades fibrosantes; sin embargo, en la mayoría de estos trabajos se han utilizado inhibidores generales como el SAHA o TSA y el uso de inhibidores específicos como la tubastatina A (Tub A), que inhibe a la HDAC6 ha sido poco estudiado. En el presente trabajo utilizamos tubastatina A y analizamos sus efectos en la proliferación, apoptosis y actividad de gelatinasas en fibroblastos de pulmón de ratón y así mismo evaluamos si estos inhibidores modifican la respuesta fibrosante de los fibroblastos inducida por TGF- $\beta$ . Encontramos que el uso de este inhibidor reduce significativamente la proliferación de los fibroblastos y que esto se puede deber a un aumento de la apoptosis y a un arresto de las células en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular. Así mismo, la Tub A reduce los efectos pro-fibrosantes del TGF- $\beta$  ya que disminuye la proliferación y la actividad de MMP-2 y MMP-9. Estos resultados sugieren que la HDAC6 desempeña un papel importante como molécula reguladora del proceso fibrosante y ponen en la mesa a las gelatinasas como otro elemento importante para ser considerado en futuros trabajos relacionados con el uso de inhibidores de deacetilasas como agentes útiles para el tratamiento de enfermedades como la fibrosis pulmonar.

## INTRODUCCIÓN.

La proliferación celular es un proceso que forma parte del ciclo celular y es controlada por proteínas cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) en diferentes puntos del ciclo tales como la fase G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>, siendo la fase G<sub>1</sub> uno de los puntos más importantes para que la célula se divida, la progresión de estas etapas depende de los estímulos externos e internos que presente la célula, la ausencia de los estímulos mantiene a las células en estado de reposo llamado G<sub>0</sub>, en espera de señales extracelulares que vuelvan a iniciar el ciclo celular (1).

En cuanto a la apoptosis o muerte celular programada es un importante proceso fisiológico que mantiene la homeostasis tisular, asegurando un balance entre la proliferación y muerte celular en los diferentes tipos de tejidos. Es un proceso que se caracteriza por la formación de cuerpos apoptóticos, los mecanismos de apoptosis implican dos fases: la de iniciación, en la cual los estímulos apoptóticos activan las pro-caspasas y la de ejecución, donde las caspasas ejecutoras inducen la muerte celular. Existen dos vías por las cuales una célula puede entrar en apoptosis: la vía extrínseca, la cual es activada por receptores extracelulares que activan las pro-caspasas iniciadoras 8 o 10 y la vía intrínseca que es activa en respuesta al daño o estrés celular, requiere de la liberación del citocromo C de la mitocondria, el cual activa a la pro-caspasa iniciadora 9. Tanto la vía extrínseca como la intrínseca activan a las caspasas ejecutoras 3 y 7, las cuales inducen la apoptosis (2).

Por otro lado, el mantenimiento, degradación y producción de la matriz extracelular (MEC) es esencial para la reabsorción y remodelación del tejido, debido a lo cual la actividad proteolítica adecuada de enzimas como las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) juegan un papel central en estos procesos. La MMP-2 y MMP-9 también llamadas gelatinasas, son enzimas que degradan principalmente los componentes de la membrana basal y pueden tener efecto sobre la activación, liberación de citoquinas y otras moléculas con propiedades profibrosantes como factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y moléculas de adhesión. Una inadecuada regulación de estas moléculas puede tener consecuencias patológicas en enfermedades como la fibrosis pulmonar (3-4).

El equilibrio dinámico entre la proliferación, la apoptosis, la síntesis y degradación de las moléculas que forman parte de la MEC es requerido para mantener la adecuada función y estructura de todos los órganos, incluyendo al pulmón. Bajo ciertas circunstancias el equilibrio de estos procesos puede romperse desencadenando una proliferación de fibroblastos excesiva, así como la acumulación de MEC en el intersticio pulmonar dando

lugar a una remodelación anormal y por lo tanto a un proceso fibrotico. La fibrosis pulmonar es un estado patológico que representa la fase final de diferentes enfermedades pulmonares, particularmente de las llamadas enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID), entre las cuales se encuentra la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) de etiología desconocida. Independientemente de su origen, la fibrosis se caracteriza por la proliferación anormal de fibroblastos y la acumulación de MEC, que dan como resultado la distorsión irreversible de la arquitectura del pulmón que pueden conducir a la muerte del individuo (4-5).

En las células, la acetilación y desacetilación de histonas forman parte de los mecanismos epigenéticos y son procesos altamente dinámicos capaces de regular la expresión génica y modificar procesos celulares, están regulados por histonas acetiltransferasas (HAT) y desacetilasas de histonas (HDAC) (6). Existen inhibidores específicos de las HDAC como la tubastatina A (TubA) la cual inhibe específicamente a la HDAC6, que es una desacetilasa de clase II, localizada principalmente en el citoplasma, es capaz de actuar en diferentes tipos de sustratos incluyendo las histonas tales como Hsp90,  $\alpha$ -tubulina, entre otros (7-10). Por lo cual el estudio de la participación de la HDAC6 en diversas patologías es de gran interés y, por ejemplo, en cáncer de pulmón se ha visto que la inhibición de HDAC6 aumenta la apoptosis inducida por cisplatino y también se reportó que la inhibición selectiva de HDAC6 reduce la proliferación de células e induce la apoptosis en glioblastoma (11-12).

## MARCO TEÓRICO.

### 1. Ciclo celular

Es un proceso implicado en el crecimiento y la proliferación celular, así como la regulación de la reparación del daño al ADN, es regulado por varias proteínas cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) que dirigen a la célula a través de una secuencia de eventos específicos culminando en la mitosis y la producción de dos células hijas. El ciclo celular se divide morfológicamente en interfase y etapas de la fase M, que incluye la profase, metafase, anafase y telofase. La interfase abarca  $G_1$ , S y  $G_2$  (1).

La fase  $G_1$  y  $G_2$  representan las “brechas” en el ciclo celular que se producen entre la síntesis del ADN y la mitosis. La fase  $G_1$  representa el primer punto de control donde la célula se prepara para la síntesis de ADN que ocurre en la fase S. En la segunda “brecha”, la fase  $G_2$ , la célula se prepara para la mitosis o fase M. Por otra parte, en la fase  $G_0$  la célula no presenta un ciclo activo, pero tiene el potencial para dividirse (1).

#### 1.1. Regulación del ciclo celular

La regulación de la progresión del ciclo celular en sus diferentes etapas está controlada por complejos que contienen cdks y ciclinas. Las cdks son proteínas quinasas que se activan en puntos específicos del ciclo celular y son indispensables para la progresión del ciclo (1). Por otro lado, las ciclinas son subunidades reguladoras de los cdks que controlan la progresión del ciclo celular a través de los puntos de control mediante la fosforilación e inactivación de sustratos, así como activando a las cdks en momentos específicos del ciclo celular (Tabla.1).

Tabla 1. **Función de las ciclinas y sus cdk asociadas.**

Ciclinas	Cdk Asociada	Función
A	cdk1, cdk 2	Entrada a la fase S
B1, B2	cdk1	Salida de $G_2$ , mitosis
C	cdk8	Transición de $G_0$ a S
D1, D2, D3	cdk4, cdk6	Transición de $G_0$ a S
E	cdk2	Transición de $G_1$ a S
F	-	Transición de $G_2$ a M

Modificado de Johnson, D. G y Walker, C. L. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1999

Por lo tanto, la entrada y salida de una fase del ciclo celular está asociada con la síntesis y degradación de ciclinas específicas. En general, antes de que una célula pueda entrar en la siguiente fase del ciclo celular, la ciclina de la fase anterior se degrada, y la ciclina de la siguiente fase es sintetizada (Fig. 1) (13).

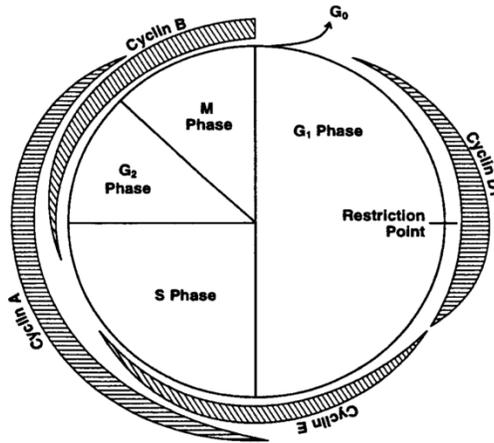


Fig. 1. Esquema de los niveles de ciclinas en el ciclo celular. El grosor de las barras indica la concentración relativa intracelular de las ciclinas. (Schafer, K. A. *Veterinary pathology*. 1998).

## 2. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada, es un importante proceso fisiológico implicado en el desarrollo y mantenimiento tisular, asegurando el equilibrio entre el recambio y la proliferación celular. La apoptosis consta de dos fases, una de iniciación donde los estímulos apoptóticos estimulan la activación de pro-caspasas y la fase de ejecución, durante la cual las caspasas inducen la muerte celular. Una célula en apoptosis se somete a diversos cambios morfológicos que incluyen contracción celular, formación de ampollas en la membrana, escisión de ADN cromosómico, picnosis nuclear, condensación de la cromatina, redondeo celular, colapso del citoesqueleto y la liberación de cuerpos apoptóticos que son fagocitados por los macrófagos sin la activación de la respuesta inmune (2, 14).

La apoptosis puede ser iniciada por tres vías. La extrínseca, llamada también la vía del receptor de muerte celular, implica la activación de un receptor de muerte celular presente en la membrana celular, el cual funciona como sensor de la superficie celular para la detección de señales de peligro extracelulares mediante la unión de un ligando, cuando este se une a su ligando provoca la activación de un adaptador de proteína llamado dominio de muerte activa que a su vez activa a la pro-caspasa 8; la intrínseca, denominada también

mitocondrial, es iniciada por el estrés celular que provoca un aumento en la permeabilidad de la mitocondria lo que culmina en la liberación del citocromo C y posterior activación de la pro-caspasa 9; por último, la vía granzima B, donde las células B secretan perforina, una proteína capaz de crear poros en la membrana celular de células diana. Las tres vías convergen en la fase de ejecución en donde la caspasa activada en las diferentes vías, activa la pro-caspasa 3 o 7 lo que culmina en la muerte celular (2, 15) (Fig. 2).

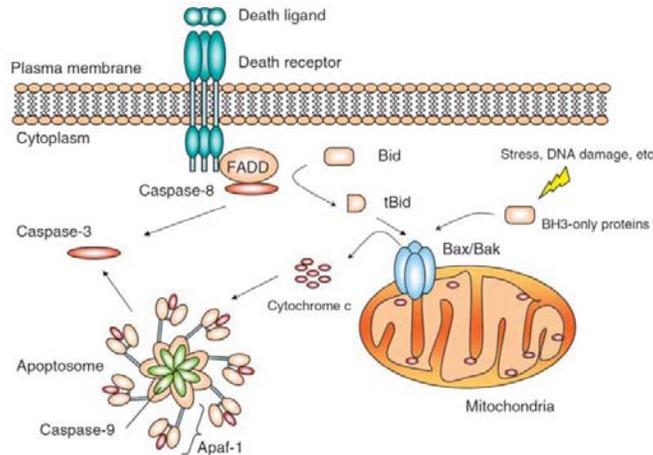


Fig. 2. Vía de activación de las caspasas. Esquema de la representación de la extrínseca (muerte mediada por receptor) y la intrínseca vía de activación de las caspasas. (Li, J & Yuan, J. *Oncogene*. 2008)

### 3. Metaloproteinasas de matriz extracelular

Las MMP's son enzimas que participan en diferentes procesos incluyendo la degradación de MEC, remodelación tisular, pueden procesar factores de crecimiento, moléculas de adhesión y están ligadas a procesos de migración, proliferación y muerte celular. Una pérdida de control en la actividad de las MMPs puede resultar en enfermedades como la artritis, cáncer, enfisema o fibrosis pulmonar (16-18).

En el humano se han registrado 23 MMPs que de acuerdo a la especificidad del sustrato o componente de la MEC que degradan se han clasificado en: Colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13 y MMP-18) que son capaces de escindir el colágeno intersticial tipo I, II y III, Gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) que degradan el colágeno desnaturalizado o gelatina y colágena tipo IV que es abundante en las membranas basales, Estromelinasas (MMP-3, MMP-10 y MMP-11) que degradan diversos componentes de la MEC, Matrilinasas (MMP-7 y MMP-26) que pueden degradar proteoglicanos, caseína, elastina, fibronectina, gelatina, vitronectina; y Metaloproteinasas asociadas a membranas (MT-MMP), las cuales se dividen

en: proteínas transmembrana unidas a la membrana por un sitio hidrófobo (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24) y las proteínas que poseen glicofosfatidilinositol (MMP-17 y MMP-25) estos dos grupos forman parte de las membranas basales e intervienen en la actividad proteolítica de otras MMPs (17).

Estas enzimas se sintetizan como zimógenos y se caracterizan por tener un pro-péptido en el cual se encuentra un motivo de cisteína con secuencia PRCGXPD que mantienen a las MMPs en su forma de zimógeno, un dominio catalítico con un sitio de unión a zinc en una secuencia conservada HEXGHXXGXXH, y un dominio carboxilo terminal tipo hemopexina (excepto MMP-7 y MMP-26) el cual se conecta con el dominio catalítico por medio de un péptido rico en prolina (Fig. 3). Adicionalmente las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 poseen en el dominio catalítico tres repeticiones del dominio fibronectina tipo II que le confieren afinidad por los sustratos, particularmente de membranas basales y las MT-MMPs presentan una región transmembranal y un dominio intracelular (18,19).

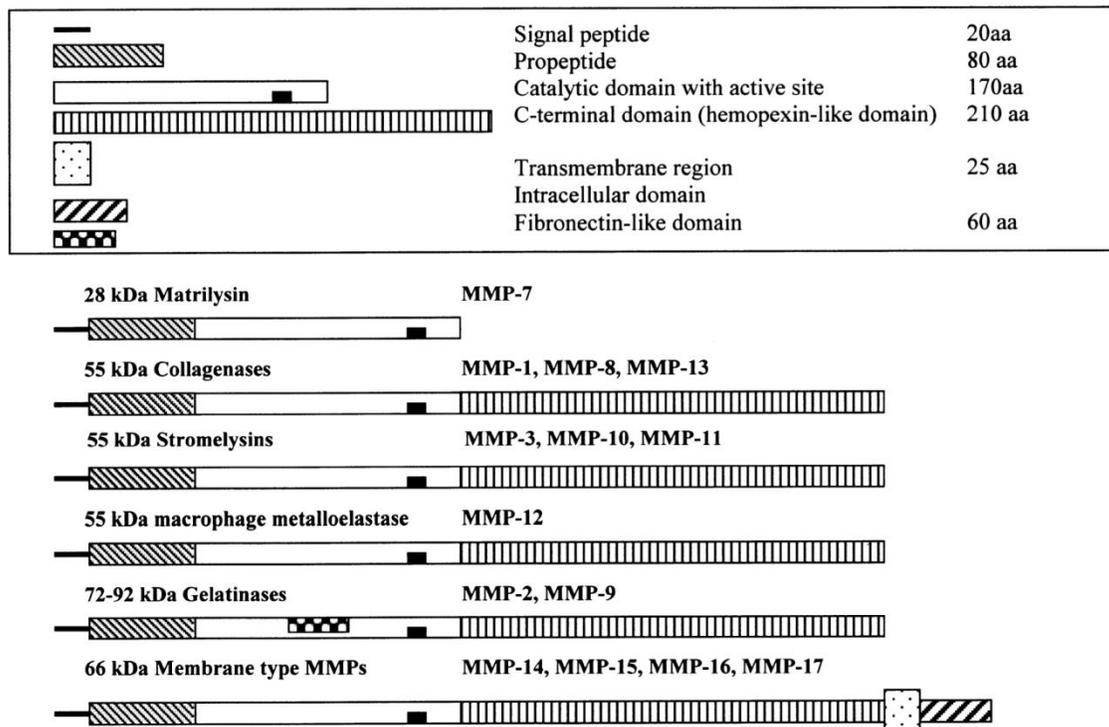


Fig. 3. Representación estructural de las MMPs. Todos los miembros presentan el péptido señal, el pro-péptido y el dominio catalítico. La maltrisin (MMP-7) no presenta el dominio C-terminal. Las gelatinasas tienen un módulo de fibronectina adicional insertado en el dominio catalítico. (Corbel, M., Belleguic, C., Boichot, E. & Lagente, V. *Cell Biology and Toxicology*. 2002).

#### **4. Gelatinasas**

Como ya se mencionó, MMP-2 y MMP-9 también conocidas como gelatinasa A y B respectivamente, degradan proteínas de membranas basales como colágena tipo IV, lamina y elastina, además de colágeno desnaturalizado (18). MMP-2 tiene un peso molecular de 72kDa y 62kDa para la pro-enzima y la enzima activa, respectivamente y se expresada de manera constitutiva en las células de tejidos estructurales incluyendo fibroblastos, células endoteliales y epiteliales (20). La MMP-9 es la más grande del grupo ya que adicionalmente tiene un dominio similar a la colágena tipo V en el dominio carboxilo terminal, pesa 92kDa en su forma inactiva y 82kDa en la forma activa y es expresada principalmente en células inflamatorias tales como macrófagos, neutrófilos y eosinófilos (20-24).

#### **5. Epigenética**

Es el estudio de los procesos que regulan la expresión de los genes, los cuales son cambios heredables y reversibles que afectan la expresión del ADN y RNA pero no cambian sus secuencias. La información genética es expresada de manera diferente en los organismos gracias a mecanismos epigenéticos que modifican la conformación de la cromatina. Los mecanismos epigenéticos más estudiados son la metilación del ADN, las modificaciones de histonas y los procesos asociados a RNAs no codificantes (25-26) (Fig. 4).

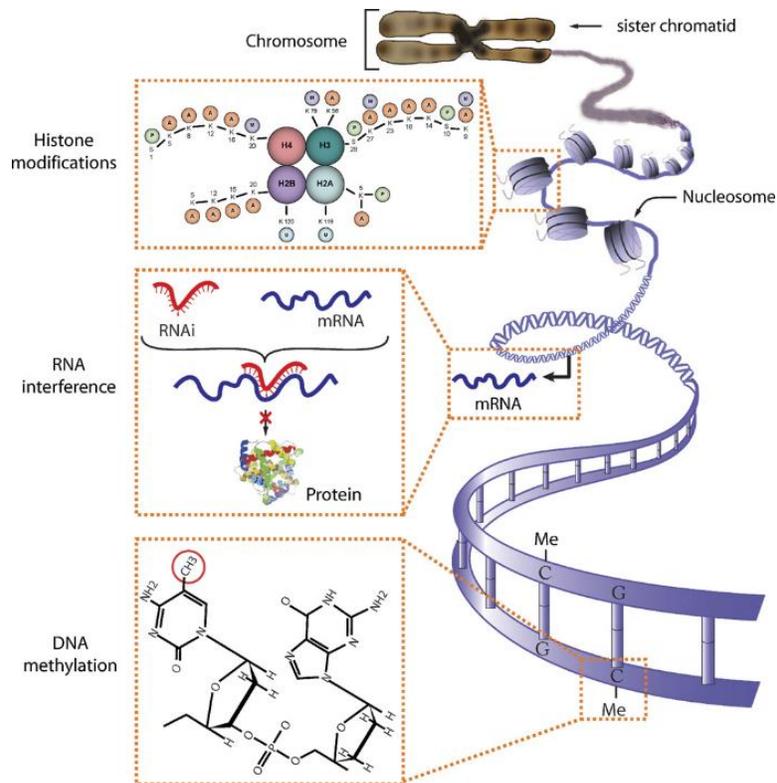


Fig. 4. Esquema de los principales mecanismos epigenéticos: metilación del ADN, modificaciones de las histonas y silenciamiento génico mediado por RNA. La metilación del ADN es una modificación covalente de la citosina en un dinucleótido CpG. Modificaciones de histonas son modificaciones post-traduccionales de las colas N-terminales de las histonas (H3, H4, H2A y H2B). El más reciente mecanismo epigenético involucra RNAs no codificantes (Kim, G. H., et.al., Pulm. Circ., 2014).

### 5.1. Modificaciones de histonas

En la cromatina activa el ADN se encuentra no metilado y presenta acetilación de histonas, mientras que en la cromatina inactiva hay metilación del ADN y desacetilación de histonas que resultan en la compactación de la estructura de la cromatina y por lo tanto en la represión de la transcripción de genes; por ello, la acetilación y desacetilación de histonas es uno de los mecanismos más estudiados (25).

Las modificaciones de histonas participan en mantener la conformación de ADN en eucromatina, donde el ADN se encuentra accesible para la transcripción, y en heterocromatina donde el ADN está en forma compacta y por lo tanto inaccesible para la transcripción. Las histonas son las principales proteínas de la cromatina, el complejo de ADN y proteínas que conforman los cromosomas, forman parte de los nucleosomas, paquete de aproximadamente 146 pares de bases de ADN envuelto alrededor de un octamero de proteínas de histonas. Cada nucleosoma consiste en dos pares de histonas: H2A, H2B, H3 y H4. Existen dos principales mecanismos que pueden modificar las

estructuras de las histonas y la cromatina: la acetilación y la metilación, los cuales son procesos pos-traduccionales que se caracterizan por la adición de un grupo acetilo o metilo en el extremo amino terminal de las histonas (26-28).

### 5.1.1. Acetilacion

La acetilación de histonas es una modificación reversible en residuos específicos en las colas de las histonas, se refiere a la adición de un grupo acetilo al grupo  $\epsilon$ -amino de las cadenas laterales del aminoácido lisina del extremo amino terminal de la histona, lo cual neutraliza la carga positiva de la lisina y confiere el potencial de debilitar las interacciones entre las histonas y el ADN aumentando así la accesibilidad del ADN a la maquinaria de transcripción. Este mecanismo se encuentra controlado por enzimas HAT y las HDAC que actúan como co-activadores y co-represores, respectivamente (27-29).

Las HAT son las encargadas de catalizar la transferencia de un grupo acetilo a residuos específicos de las colas de las histonas mediante el uso de del cofactor acetil-CoA. Existen dos clases principales de HAT: tipo A y tipo B. La HAT de tipo B son predominantemente citoplasmáticas, encargadas de acetilar las histonas libres, pero no las que ya se encuentran en la cromatina. Las HAT de tipo A son capaces de modificar múltiples sitios dentro de las colas amino terminales de la histona (29). La acetilación de lisinas en las colas de las histonas H3 y H4 está asociado con la activación de la transcripción y replicación (Tabla 2) (30-31).

Tabla 2. Descripción general de la acetilación de histonas.

Histona	Residuo	Modificación	Función
H3	Lys56	Acetilación	Transcripción, replicación.
	Lys64	Acetilación	Transcripción
	Lys79	Acetilación	Transcripción
	Lys122	Acetilación	Transcripción
H4	Lys91	Acetilación	Transcripción, replicación.

Modificado de Tessarz, Peter & Kouzarides, Tony. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014

### 5.2. Desacetilasas de histonas (HDACs)

Las enzimas HDAC se oponen a los efectos de las HATs por lo cual eliminan el grupo acetilo del aminoácido lisina por una unión N-e acetil lisina con el átomo de zinc en el sitio activo, tras la activación el grupo N-acetilo es atacado por una molécula de agua, produciendo un

lisina libre y ácido acético, lo cual restaura la carga positiva de la lisina y provoca la estabilización de la arquitectura de la cromatina local lo que conlleva a una represión transcripcional. Las HDACs también son responsables de la desacetilación de los residuos de lisina de un gran conjunto de proteínas que participan en diferentes funciones como factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto, proteínas implicadas en la señalización celular, apoptosis, respiración del ADN etc., por lo cual se encuentran involucradas en múltiples funciones celulares entre las que se encuentra la regulación transcripcional, la progresión del ciclo celular y la motilidad celular (29, 32).

La familia HDAC comprende once enzimas dependientes de zinc que tienen un dominio de acetilasa altamente conservado, tienen una longitud heterogénea que va de 347 aminoácidos hasta 1215 aminoácidos y se clasifican en 4 grupos: la clase I incluye las desacetilases HDAC1-3 y HDAC8, la clase II la conforman las desacetilases HDAC4-7 y HDAC9-10; las sirtuinas (SIRT1-7) conforman la clase III y cuya actividad requiere NAD<sup>+</sup>; por último, la clase IV contiene solo HDAC11 (Tabla. 3) (32).

Tabla 3. Clasificación de las HDAC.

Clase	Subclase	Nombre	Localización	Co-factor	Expresión	Catalítico dominio
I		HDAC1	Núcleo	Zn <sup>++</sup>	Ubicuo	 482 aa
		HDAC2	Núcleo			 488 aa
		HDAC3	Núcleo			 428 aa
		HDAC8	Núcleo/citoplasma			 377 aa
II	A	HDAC4	Núcleo/citoplasma	Zn <sup>++</sup>	Específico	 1084 aa
		HDAC5	Núcleo/citoplasma			 1122 aa
		HDAC7	Núcleo/citoplasma			 952 aa
		HDAC9	Núcleo/citoplasma			 1011 aa
	B	HDAC6	Citoplasma			 1215 aa
		HDAC10	Núcleo			 (Inactive) 669 aa
III		SIRT-1	Núcleo	NAD <sup>+</sup>	Variable	 NAD 747 aa
		SIRT-2	Citoplasma			 NAD 389 aa
		SIRT-3	Mitocondria			 NAD 399 aa
		SIRT-4	Mitocondria			 NAD 314 aa
		SIRT-5	Mitocondria			 NAD 310 aa
		SIRT-6	Núcleo			 NAD 355 aa
		SIRT-7	Nucléolo			 NAD 400 aa
IV		HDAC11	Núcleo/citoplasma	Zn <sup>++</sup>	Ubicuo	 347 aa

Modificado de Shirakawa *et al.*, Trends Microbiol. 2013

### 5.2.1. HDAC 6

Es un miembro único dentro de la clase II debido a que presenta dos dominios catalíticos homólogos, ambos son funcionales de forma independiente, a la actividad general de la HDAC6. Está formada por 1 216 aminoácidos, se encuentra principalmente en el citoplasma debido a los dominios NES y SE14, aunque también se encuentra en la región perinuclear y en bordes principales de regiones subcelulares. Presenta un dominio en dedo de zinc de unión a ubiquitina en su región C-terminal y un dominio de unión a dineína (Fig. 5) (33-34)

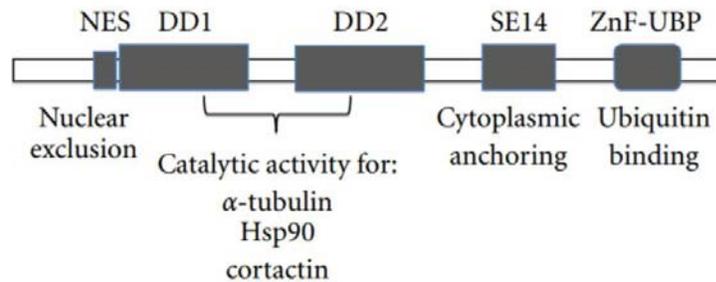


Fig. 5. Dominios funcionales de la HDAC6. El único HDAC con dos dominios catalíticos en tándem, los dominios desacetilasa (DD1 y DD2). Tubulina, Hsp90 y cortactina se han encontrado como sustratos HDAC6. La señal de exportación nuclear (NES) evita la acumulación de la proteína en el núcleo y la región del tetrapéptido Ser-Glucontaining (SE14) asegura un anclaje estable de la enzima en el citoplasma. El enlazador entre ambos dominios es capaz de unirse a dineína y el dominio de dedo de cinc de unión a ubiquitina de alta afinidad (ZnF-UBP). (Aldana-Masangkay, Grace I. & M. Sakamoto, Kathleen. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011)

### 5.2.2. Inhibidores de HDACs

Existen cuatro principales quimio tipos de inhibidores de HDAC: ácidos hidroxámicos, ácidos grasos de cadena corta, tetrapéptidos cíclicos y benzamidas. Todos los inhibidores comparten un patrón de farmacóforo común que consiste en un dominio de unión al zinc, un dominio enlazador que imita el sustrato y ocupa el canal del sitio activo, una unidad de conexión y una unidad de protección que contacta la superficie de la enzima. Los ácidos hidroxámicos en su mayoría son pan-inhibidores, debido a que son incapaces de discriminar isoformas pertenecientes a las mismas o diferentes clases de HDAC, dentro de este grupo se encuentran el SAHA y TSA que son potentes inhibidores para las isoformas de clase I y IIB. Los tetrapeptidos cíclicos inhiben a las HDAC de clase I, los ácidos grasos de cadena corta inhiben a las HDAC de clase I y II, el ácido valproico (VPA) forma parte de este grupo y las benzamidas inhiben a las HDAC de clase I y IV (Tabla 4) (35-37). Adicionalmente, moléculas como el sirtinol inhiben específicamente a las HDACs de clase III. Por otra parte, existen inhibidores específicos como la tubastatina A (Tub A) que es un

potente y selectivo inhibidor de segunda generación de la HDAC6. Sintetizado a partir de un inhibidor de ácido hidroxámico, la molécula se encuentra compuesta por dos elementos estructurales, un ácido p-tolilhidroxámico y un ácido modificado.

Tabla 4. Clasificación de los inhibidores de HDAC.

Clasificación	Ejemplos	Especificidad de HDAC
<b>Ácidos hidroxámicos</b>	SAHA (vorinostat)	Pan-inhibidor
	PXD101 (belinostat)	Pan-inhibidor
	LBH589 (panobinostat)	Clase I y II
	TF2357 (givinostat)	Pan-inhibidor
	4SC-201 (resminostat)	Pan-inhibidor
	PCI 24781 (abexinostat)	Clase I y II
	Tubacina	Clase IIb
	TSA	Pan-inhibidor
<b>Ácidos grasos de cadena corta</b>	Butirato	Clase I y II
	Ácido valproico	Clase I y II
<b>Tetrapéptidos cíclicos</b>	Depsipéptido/FK228 (romidepsin)	Clase I
	Apicidin	Clase I
<b>Benzamidas</b>	MS-275 (entinostat)	Clase I
	MGCD0103 (mocetinostat)	Clase I
	CI-994 (tacedinaline)	Clase I
	MGCD-0103	Clase I y IV

Modificado de Tandon, Nidhi et al. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*. 2016.

## 6. ANTECEDENTES

Debido a la capacidad que las HDACs tienen para controlar y modificar la expresión de genes implicados en la diferenciación, control del ciclo celular, apoptosis y replicación de ADN, en los últimos 10 años se ha incrementado significativamente el estudio de los efectos de la inhibición de estas enzimas y su repercusión en el desarrollo de diferentes enfermedades incluyendo trastornos neurológicos, cáncer, enfermedades cardiovasculares y respiratorias entre otras y existen trabajos que han puesto sobre la mesa el potencial uso de los inhibidores de HDACs como moléculas anti-fibrosantes. En este sentido, se ha reportado que el TSA, un inhibidor de amplio espectro de las HDACs, reduce la producción de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y colágena mediada por TGF- $\beta$ 1 (9). Adicionalmente, se ha reportado que el TSA induce apoptosis y causa arresto del ciclo celular en células inflamatorias (38) y también reduce la proliferación y transición epitelio mesénquima a través de la inhibición de los complejos ciclina/cdk, inducción de p21 y p27, y la inactivación

de las vías PI3K/Akt, p38MAPK y ERK1/2, así como el bloqueo de las vías de señalización canónica TGF- $\beta$ /Smad2 y jagged/Notch (39). En el caso de la HDAC6, se ha reportado que su inhibición con Tub A previene la fibrosis e inflamación renal inducida por TGF- $\beta$  (38, 40) y reduce la proliferación de glioblastoma (12) así como también aumenta la apoptosis inducida por cisplatino en cáncer de pulmón (11).

Como ya se mencionó, las MMPs juegan un papel importante en patologías pulmonares como la fibrosis pulmonar (21) ya que se ha visto que las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 participan activamente en la migración de fibroblastos y miofibroblastos subepiteliales a los espacios alveolares además de que se ha reportado que ambas enzimas pueden activar el TGF- $\beta$  latente, que es una de las principales moléculas profibrosantes (4, 22). Adicionalmente hay trabajos que sugieren que las HDAC juegan un papel importante en procesos fibroticos, como en la FPI en donde se demostró que SAHA un inhibidor de amplio espectro de las HDAC redujo la expresión de colágena III en fibroblastos (7), así como también induce la apoptosis en fibroblastos de humanos y disminuye la síntesis de colágena inducida por TGF- $\beta$  (8). A pesar de ello, en este campo de estudio los efectos de inhibidores selectivos, como la tubastatina A (Tub A) no han sido del todo dilucidados.

## **HIPÓTESIS**

El inhibidor de la HDAC6 (Tub A) reducirá el potencial proliferativo de fibroblastos normales de pulmón, probablemente debido a un aumento de la apoptosis celular y también disminuirá la actividad de gelatinasas.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Generales**

- Evaluar el efecto de la tubastatina A sobre la proliferación y la apoptosis de fibroblastos de pulmón y analizar si modifica la actividad de gelatinasas.

### **Objetivos específicos**

- Cuantificar la proliferación celular utilizando un reactivo que mide cantidad de DNA en fibroblastos pulmonares de ratón tratados con Tub A y TSA, en presencia y ausencia de TGF- $\beta$ .
- Cuantificar la apoptosis por citometría de flujo y microscopia de fluorescencia.
- Cuantificar por FACS el ciclo celular en fibroblastos tratados con Tub A y TSA.
- Evaluar por zimografía la actividad de MMP-2 y MMP-9 en medios condicionados de fibroblastos tratados con Tub A y TSA, en presencia y ausencia de TGF- $\beta$ .

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Cultivo celular.**

Fibroblastos de pulmón normal de ratón de la línea celular CCL-206 (ATCC) fueron cultivados en medio EMEM (Lonza) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB) (GIBCO) y una mezcla de antibiótico/antimicótico. Los cultivos se propagaron hasta el pasaje 10 manteniendo una atmosfera húmeda a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta su uso. En todos los experimentos se utilizaron células entre los pasajes 4-6 y se incluyeron fibroblastos tratados con TSA como un control positivo.

### **2. Ensayo de Proliferación.**

El efecto de la Tub A sobre la proliferación fue medido con un ensayo de fluorescencia utilizando el reactivo CyQuant (Invitrogen). El reactivo CyQuant se basa en el uso de un colorante verde fluorescente el cual se activa y emite fluorescencia al unirse con los ácidos nucleicos.

Las células ( $7 \times 10^3$ ) se sembraron en placas de 96 pozos en un volumen final de 100  $\mu$ l. Durante el ensayo las células se mantuvieron en medio EMEM con 2% de SFB. Se estimuló con Tub A [30 $\mu$ M] o con TSA [50nM] por un periodo de 24, 48, 72 horas. En experimentos en paralelo, los cultivos también se mantuvieron en presencia y ausencia de TGF- $\beta$  [10nM]. Concluidos los experimentos, los pozos fueron lavados con 200 $\mu$ l de buffer de fosfatos (PBS) y congelados a -80° por una hora. Se agregaron 200 $\mu$ l del reactivo CyQuant y se incubó en agitación por 20 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Los 200 $\mu$ l de solución fueron transferidos a una microplaca negra de 96 pozos de fondo claro. La medición de fluorescencia se llevó a cabo en un lector de ELISA (Synergy HT, Biotek) a 480/520nm. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado y se repitieron dos veces.

### **3. Detección de apoptosis.**

Para evaluar el efecto de la Tub A en la apoptosis, los fibroblastos se marcaron con Anexina V y 7-AAD y se hizo un análisis por citometría de flujo. La anexina es una glucoproteína que presenta una alta afinidad por la fosfatidilserina. Este fosfolípido se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesto a la cara externa cuando comienza el proceso de apoptosis. Por otro lado, el 7-AAD (7-amino actinomicina) es un colorante impermeable a la membrana plasmática en las células vivas. En células muertas el colorante se une a la doble hebra de ADN al intercalarse en los pares de bases G-C.

Los fibroblastos se sembraron en placas de 12 pozos a una confluencia de  $4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Durante el experimento las células se mantuvieron en EMEM al 2% de SFB, Las células se estimularon con TSA [50nM] o Tub A [15 y 30µM] por 24 horas. Al concluir el experimento los medios fueron recuperados en tubos de 15ml y las células se lavaron con PBS. Para recuperar las células de los pozos se agregaron 200µl de tripsina y se monitorearon hasta que éstas se desprendieron. La reacción de la tripsina se detuvo con 200µl de SFB y se colocaron donde previamente se habían recuperado los medios. Los tubos se centrifugaron a 2,200 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y el pellet se resuspendió en 100µl de buffer de Anexina V (BD pharmigen). En oscuridad se agregó 2µl de Anexina V y/o 2µl de 7-AAD, un colorante impermeable a la membrana celular que se usa para discriminar entre células muertas y células apoptóticas. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, transcurrido este tiempo las células se agitaron cuidadosamente y se pasaron en el citometro de flujo FACS Aria (BD biosciencias) adquiriendo 50000 células para cada tubo. El ensayo se realizó por duplicado y se repitió dos veces.

En todos los ensayos se utilizaron como controles de compensación células tratadas con tritón al 1% y células tratadas con cisplatino [40 µM], un inductor de apoptosis. El análisis de los datos para determinar la distribución de las células en apoptosis temprana o tardía se realizó en el software Flowjo (V 10).

#### **4. Detección de apoptosis por microscopia de fluorescencia**

El efecto de los inhibidores de las HDAC sobre la activación de la caspasa-3 y la caspasa-7 en las células CCL-206 fue medido con un ensayo de microscopia de fluorescencia utilizando el reactivo CellEvent Caspase-3/7 (Invitrogen) que se basa en el uso de un colorante verde fluorescente el cual se activa y emite fluorescencia al unirse con los ácidos nucleicos de las células que se encuentran en apoptosis.

Las células se sembraron en placas de 48 pozos a una confluencia de 80%. Durante el ensayo las células se mantuvieron en medio EMEM con 2% de SFB. Se estimuló con Tub A [30µM] o TSA [50nM] en presencia y ausencia de TGF-β [10nM] por un periodo de 24 horas. Concluido el experimento a los pozos se les removió el medio y se agregó 400µl del reactivo de CellEvent Caspase-3/7 [5µM] con Hoescht 33342 [1.1µg/ml] en PBS 5% SFB y se incubó en oscuridad por 30 minutos a temperatura 37° con una atmosfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>, protegido de la luz. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Las células

fueron observadas y fotografiadas en un microscopio Olympus iX81 con el objetivo 10X en las emisiones 460-490 (Hoesht) y 530 (Caspase-3/7). Para el conteo de células positivas para caspasa-3 y caspasa-7 las fotografías obtenidas fueron analizadas con el software Image J (V1.6).

## **5. Ciclo celular**

El ciclo celular se analizó por citometría de flujo marcando con yoduro de propidio (PI), el cual se une al ADN. El análisis con PI se basa en las propiedades de fluorescencia de cada célula en la población, en donde las células G1 tendrán una copia de ADN y por lo tanto tendrán la intensidad de fluorescencia 1X. Las células en G2 / M tendrán dos copias de ADN y en consecuencia, tendrá intensidad 2X. Dado que las células en la fase S están sintetizando ADN tendrán valores de fluorescencia entre las poblaciones 1X y 2X.

Los fibroblastos se sembraron en placas de 12 pozos a una confluencia del 80%. Durante el experimento las células se mantuvieron en EMEM al 2% de SFB y se estimularon durante 24 horas con o Tub A [15 y 30µM], TSA [50nM] o bien con nocodazol 0.5µM como control. Al concluir el experimento los medios fueron recuperados en tubos de 15ml y se lavaron las células con PBS 1X, el cual también fue recuperado. Para desprender las células de los pozos se agregaron 200µl de tripsina 0.5X, se detuvo la reacción de la tripsina con 200µl de SFB y se recuperaron las células donde previamente se habían recuperado los medios y el PBS. Los tubos se centrifugaron a 1,500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y el pellet se resuspendió en 1ml de PBS frío y se centrifugaron a 2,500 rpm por 5 minutos, posteriormente el pellet se resuspendió en 300µl de PBS 1X frío y se le fue agregando gota a gota en agitación constante 700µl de etanol al 100% frío. Los tubos se dejaron toda la noche a 4°C en oscuridad. Al día siguiente se centrifugaron a 2,500 rpm por 5 minutos para eliminar el etanol, se lavaron con 1ml de PBS 1X frío y se volvieron a centrifugar. El pellet se resuspendió en 300µl de buffer hipotónico de PI (0.1% Na Citrato, 0.1% Triton x-100, 75µl RNAsa (MBI), 50µg/ml PI (SIGMA ALDRICH)). Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, transcurrido este tiempo las células se agitaron cuidadosamente y se leyeron en el citómetro de flujo FACS Aria (BD biosciencias). Se registró la intensidad de fluorescencia emitida PE Texas Red. El ensayo se realizó por triplicado. La distribución de las células en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M se realizó en el software Flowjo (V 10).

## **6. Zimografia**

La actividad gelatinolítica de las gelatinasas fue evaluada por zimografia; esta técnica resuelve a las gelatinasas por su peso molecular y es apropiado para la detección de isoformas latentes y actividad de las metaloproteasas, debido a que el uso del detergente duodecil sulfato de sodio (SDS) desnaturaliza las enzimas exponiendo así su sitio catalítico, lo que permite que isoformas latentes exhiban su actividad gelatinolítica después de una renaturalización parcial.

Los medios de las células CCL-206 estimuladas se corrieron en geles de acrilamida al 8% polimerizada en presencia de gelatina 1% (Sigma-Aldrich) bajo condiciones no reductoras. Las muestras de medio fueron normalizadas por número de células cargando por muestra 20µl de medio mezclado con buuffer muestra 5x (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, glicerol-azul de bromofenol 0.05%). Los geles fueron sujetos a electroforesis a 150V por 60 minutos en frio. Pasado este tiempo los geles fueron lavados dos veces durante 20 minutos con Triton X-100 al 2.5% para remover el SDS de los geles y se incubaron toda la noche en buffer de Glicina 0.1%, pH8, CaCl<sub>2</sub> 5mM, ZnCl<sub>2</sub> 50mM a 37°C.

Los geles se tiñeron 40 minutos con Azul de Coomasie R250 (BioRad) al 0.1% y se realizó una decoloración por 30 minutos con solución de ácido acético 10% / metanol 40%. Con esta tiención las zonas de actividad enzimática se visualizan como bandas claras contra un fondo azul. Como control se utilizó medio condicionado de células de osteosarcorma (U2). Las imágenes se digitalizaron con un foto documentador (BioRad). Las bandas obtenidas fueron analizadas por densitometría con el software Image J (V1.6).

## **7. Análisis estadístico.**

A los resultados se les aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente se les aplicó la prueba U de Mann Whitney. Se consideraron diferencias significativas los valores de p<0.05. Este análisis se realizó con el programa Graph Pad Prism V.6.

## RESULTADOS

### Proliferación de fibroblastos de pulmón de ratón

El efecto de la Tub A en la proliferación de fibroblastos se analizó de 24 a 72 horas y como se muestra en la figura 6, encontramos que éste inhibidor disminuye significativamente el nivel de proliferación en comparación al grupo control a las 48 y 72 horas (Ctrl=106.38 ± 37.05% vs Tub A =24.50 ± 20.02% y Ctrl =223.75 ± 88.15% vs Tub A =86.25 ± 33.95%; para 48 y 72 horas respectivamente.  $p < 0.05$  en ambos casos). En el caso del TSA se pudo observar que las células tratadas con 50nM del inhibidor mostraron una reducción de proliferación respecto al control a las 48 horas (Ctrl =223.75 ± 88.15% vs TSA =65.88 ± 13.29%;  $p < 0.05$ ); sin embargo a las 72 horas los niveles de proliferación son muy similares al grupo control. Por otra parte se observa que existe una diferencia significativa entre los dos grupos experimentales a las 48 y 72 horas siendo las células tratadas con Tub A las que presenta una menor proliferación en comparación con las células tratadas con TSA (TSA =65.88 ± 13.29% vs Tub A =24.50 ± 20.02% y TSA =183.75 ± 104.58% vs Tub A =86.25 ± 33.95%; para 48 y 72 horas respectivamente.  $p < 0.05$  en ambos casos).

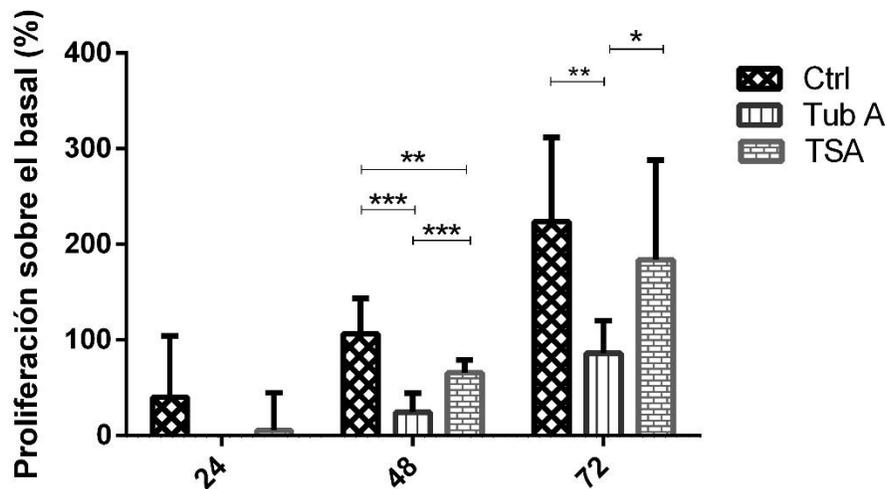


Fig. 6. Efecto de los inhibidores de HDAC en la proliferación celular. Se muestra la proliferación en la línea celular CCL-206 a las 24, 48 y 72 horas después del estímulo con Tub A [30 $\mu$ M] y TSA [50 nM]. Las barras representan el promedio y la desviación estándar. \* $p < 0.05$

## **Apoptosis**

El efecto de la Tub A en la apoptosis de la línea celular CCL- 206, se analizó por dos métodos distintos: citometría y microscopia de fluorescencia.

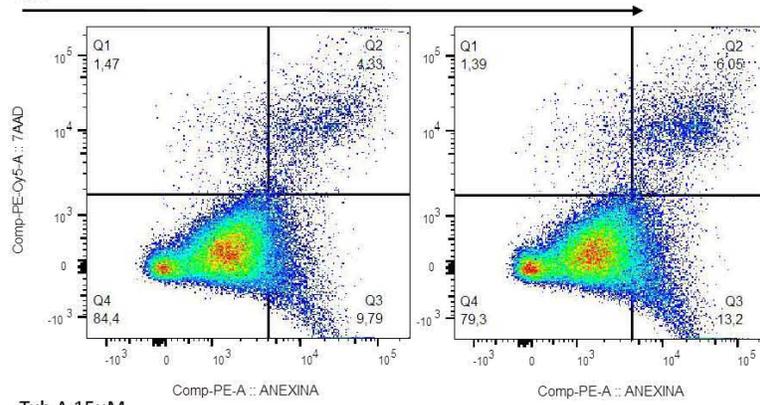
### **1. Citometría de flujo**

En el caso de la citometría de flujo se analizaron los porcentajes de células positivas para anexina V y negativas para 7AAD a las 24 horas después del estímulo, lo cual representa el porcentaje de células en apoptosis temprana.

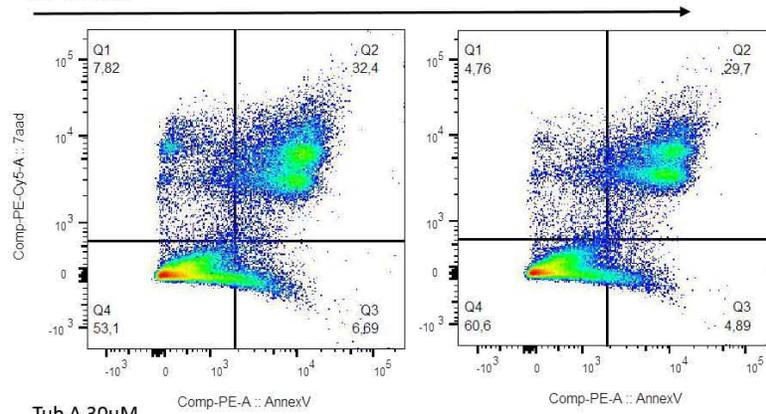
Como se muestra en la figura 7A y 7B, encontramos que el estímulo con Tub A a una concentración de 15 $\mu$ M no tiene efecto sobre la apoptosis comparando contra el grupo control y a una concentración de 30 $\mu$ M se puede observar una ligera tendencia de aumento en la apoptosis; sin embargo, no fue significativa (Ctrl=9.55  $\pm$  2.70% vs Tub A 15  $\mu$ M=8.07  $\pm$  2.76% y Tub A 30 $\mu$ M=12.25  $\pm$  1.00%; NS). Por otra parte, el estímulo con TSA a una concentración de 50nM induce un aumento significativo de la apoptosis temprana con respecto al control y a los otros dos grupos experimentales (TSA=19.00  $\pm$  3.06% vs Ctrl=9.55  $\pm$  2.70%, Tub A 15  $\mu$ M=8.07  $\pm$  2.76% y Tub A 30 $\mu$ M=12.25  $\pm$  1.00%; p<0.05).

A)

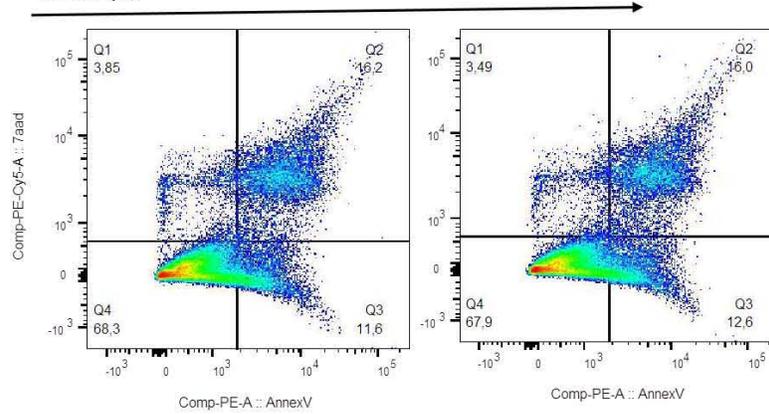
Ctrl



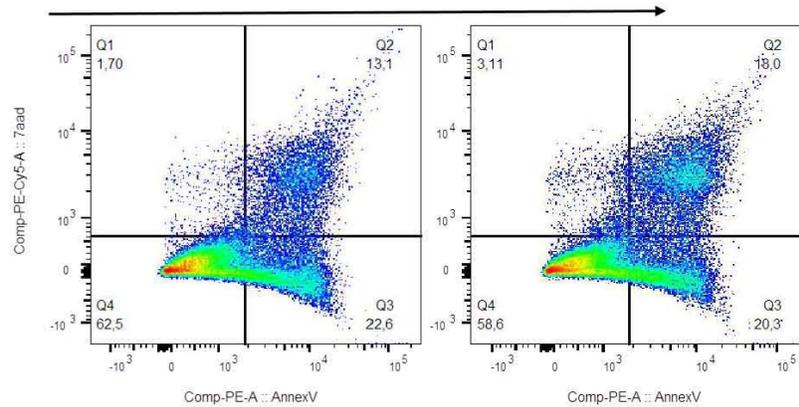
Tub A 15 $\mu$ M



Tub A 30 $\mu$ M



TSA 50nM



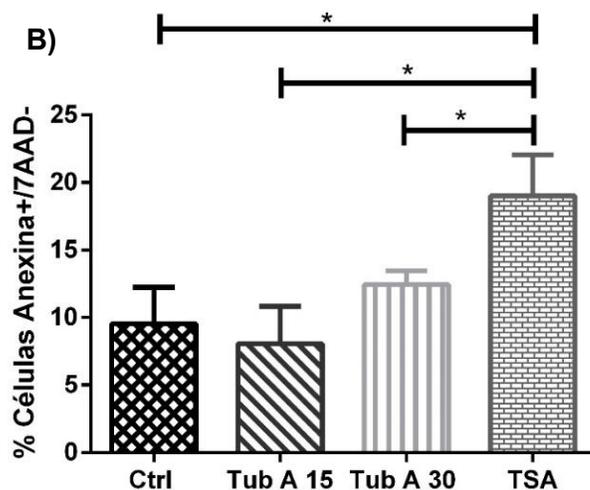


Fig. 7. Efecto de los inhibidores de HDAC en la apoptosis celular en la línea CCL-206. **A)** Expresión de Anexina V y 7AAD por citometría de flujo estimuladas con los inhibidores de HDAC por 24 horas. **B)** Porcentaje de células Anexina+/7AAD- en células CCL-206 estimuladas con los inhibidores HDAC por 24 horas. Las barras representan el promedio y la desviación estándar de n=4 experimentos. \*p<0.05

## 2. Microscopia de fluorescencia

La apoptosis también se analizó in vitro por microscopia de fluorescencia con un reactivo que identifica a las caspasas 3 y 7 activas directamente en las células que fueron tratadas con los inhibidores Tub A y TSA por 24 horas. No se observaron diferencias entre el grupo control y el tratado con Tub A 15 $\mu$ M. Sin embargo, en las células que recibieron Tub A 30  $\mu$ M y TSA 50 nM se observó que ambos inhibidores inducen de manera similar un incremento significativo de la expresión de estas caspasas con respecto al control (Ctrl=1.06  $\pm$  0.85% vs Tub A 30 $\mu$ M= 6.57  $\pm$  0.59% y TSA 50nM=7.77  $\pm$  6.35%; p<0.05 en ambos casos). (Fig. 8 y Fig. 9)

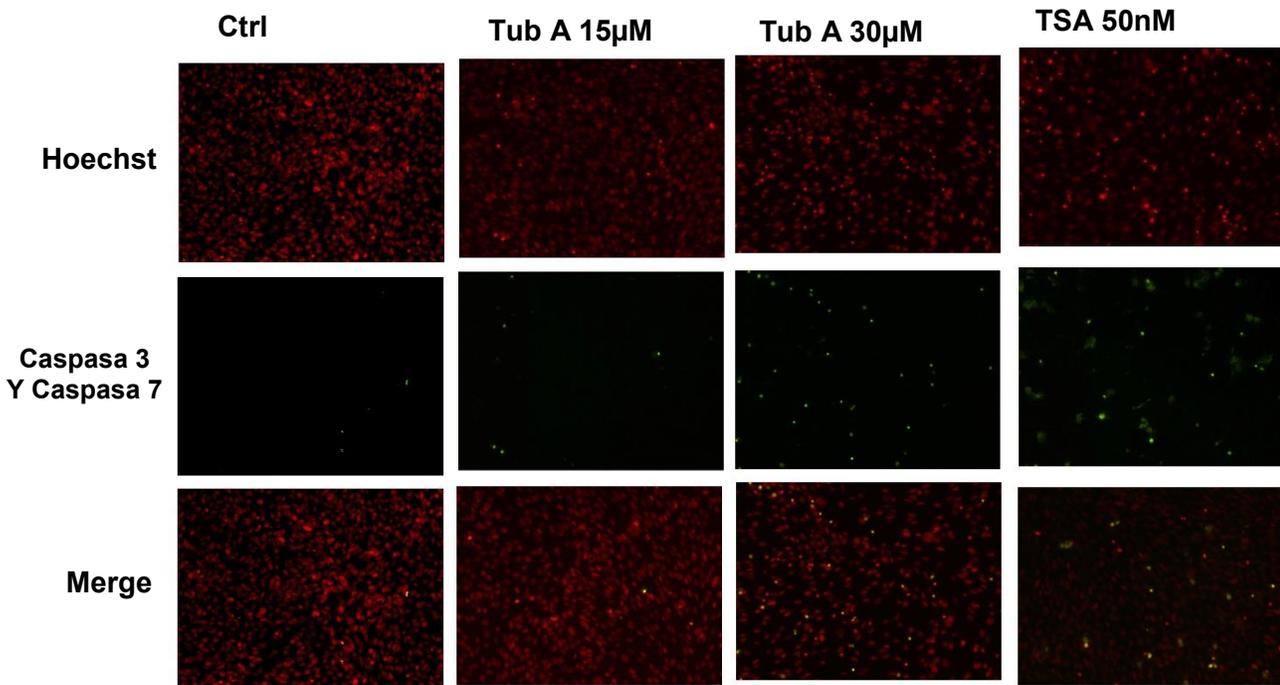


Fig. 8. Fibroblastos con marca positiva para la caspasa-3 y 7. Células con marca positiva para la caspasa 3 y 7 tratadas 24 horas con los inhibidores de HDAC a magnificación de 10X.

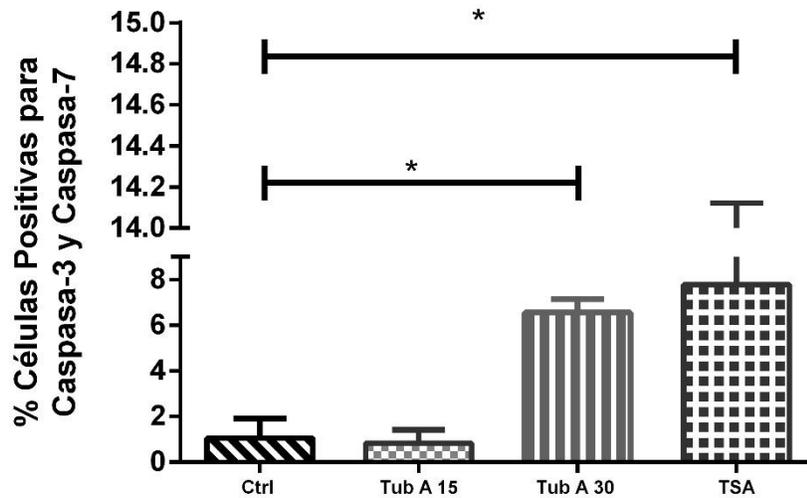
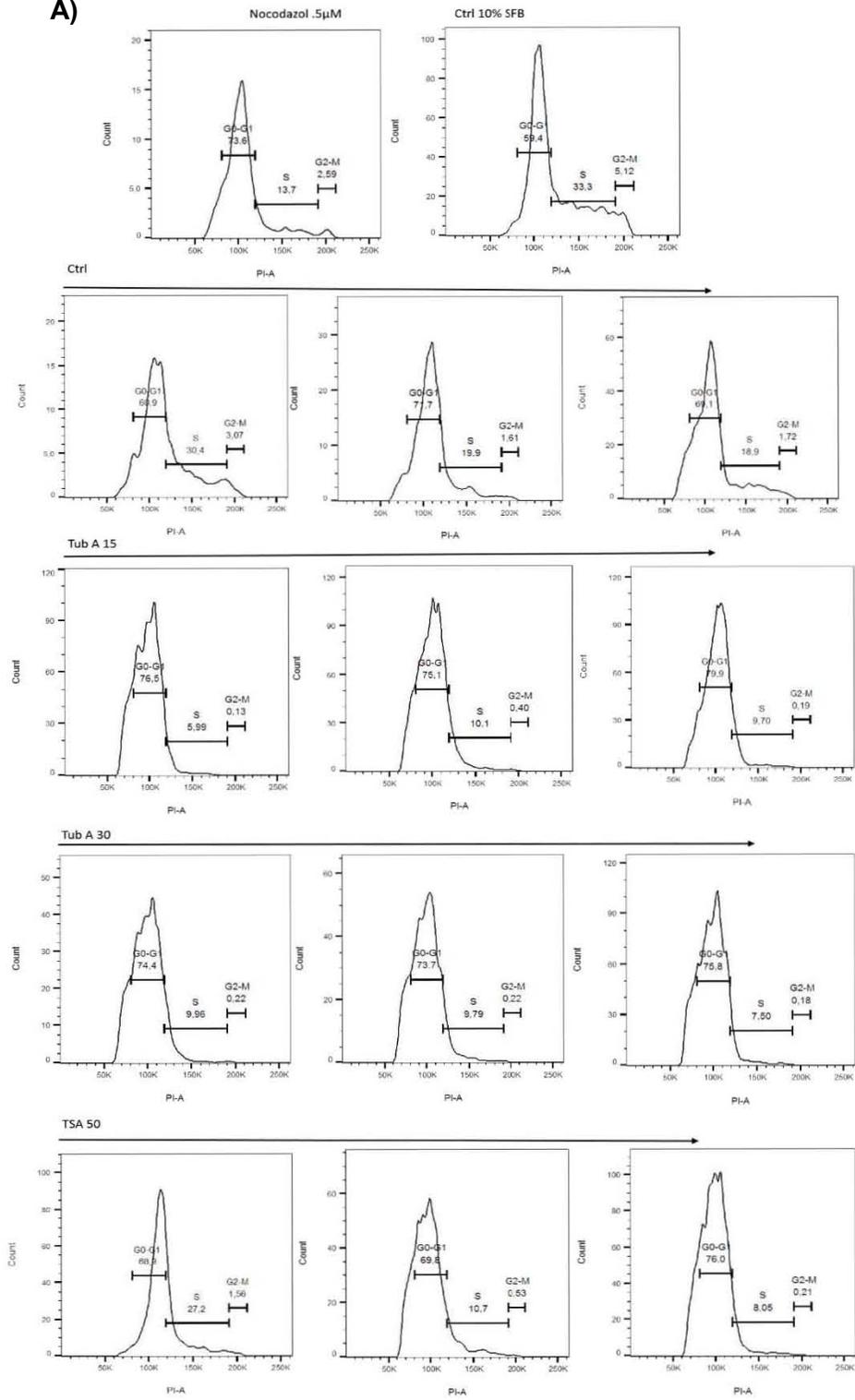


Fig. 9. Detección de la caspasa-3 y caspasa-7 en fibroblastos. Efecto de los inhibidores de HDAC sobre la expresión de la caspasa-3 y 7 en células CCL-206. Las barras representan el promedio y la desviación estándar de n=4 experimentos. \*p<0.05

## Ciclo celular

En la figura 10A se muestran los histogramas por triplicado de cada una de las condiciones experimentales y control utilizadas en el análisis del ciclo celular por FACS y la figura 10B están graficados los valores del promedio con su desviación. Encontramos que el tratamiento con Tub A 15  $\mu\text{M}$  incrementa significativamente las células en fase  $G_1/G_0$  ( $77.17 \pm 2.47\%$  en Tub A 15  $\mu\text{M}$  vs  $67.23 \pm 5.6\%$  en control;  $p < 0.05$ ). En la fase S se observó que el 23 por ciento de las células del grupo control se encontraban en esta fase y de manera importante, las células tratadas con Tub A redujeron significativamente este porcentaje a 8.6 y 9% (Ctrl= $23.07 \pm 6.37\%$  vs Tub A 15  $\mu\text{M}$ = $8.6 \pm 2.27\%$  y Tub A 30 $\mu\text{M}$ = $9.08 \pm 1.37\%$ ;  $p < 0.05$ ). Así mismo, Tub A disminuye de manera significativa el porcentaje de células en fase M (Ctrl= $2.13 \pm 0.81\%$  vs Tub A 15  $\mu\text{M}$ =  $0.24 \pm 0.14\%$  y Tub A 30 $\mu\text{M}$ =  $0.21 \pm 0.02\%$ ;  $p < 0.05$  en ambos casos).

A)



B)

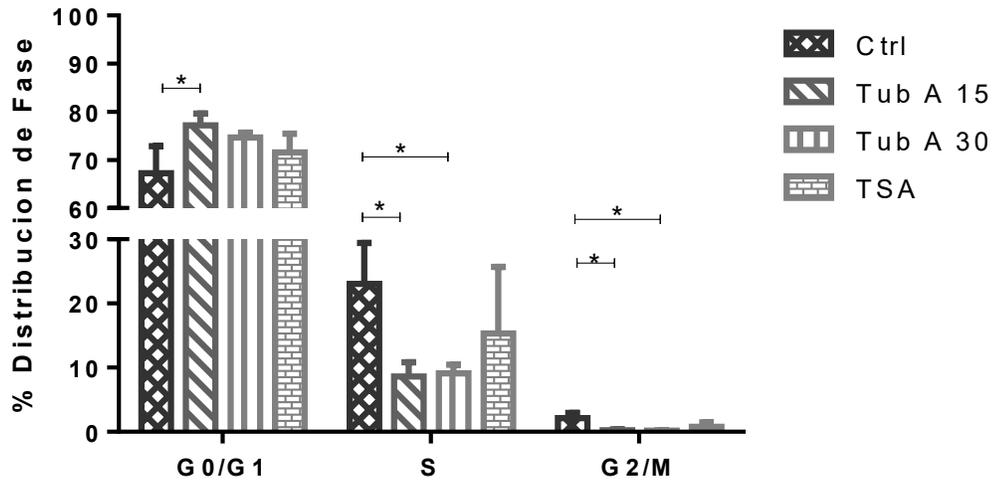
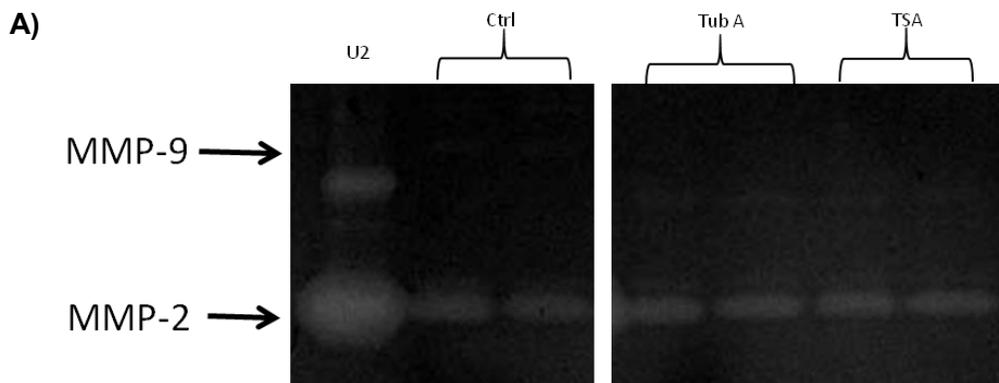


Fig. 10. Efecto de los inhibidores de HDAC sobre el ciclo celular en células CCL-206. **A)** Distribución de las fases del ciclo celular cuando se tratan con los inhibidores de HDAC. **B)** Efecto de los inhibidores de HDAC en las fases del ciclo celular. Las barras representan el promedio y la desviación estándar de n=3 experimentos. \*p<0.05. Como control positivo se utilizó nocodazol 0.5  $\mu$ M.

#### Actividad de las gelatinasas: MMP-2 y MMP-9.

La actividad de la MMP-2 y MMP-9 se analizó por zimografía en tres experimentos diferentes y como se puede observar en la figura 11 encontramos que los niveles de actividad de MMP-2 y MMP-9 en los grupos tratados con los inhibidores no muestran diferencias respecto al grupo control.



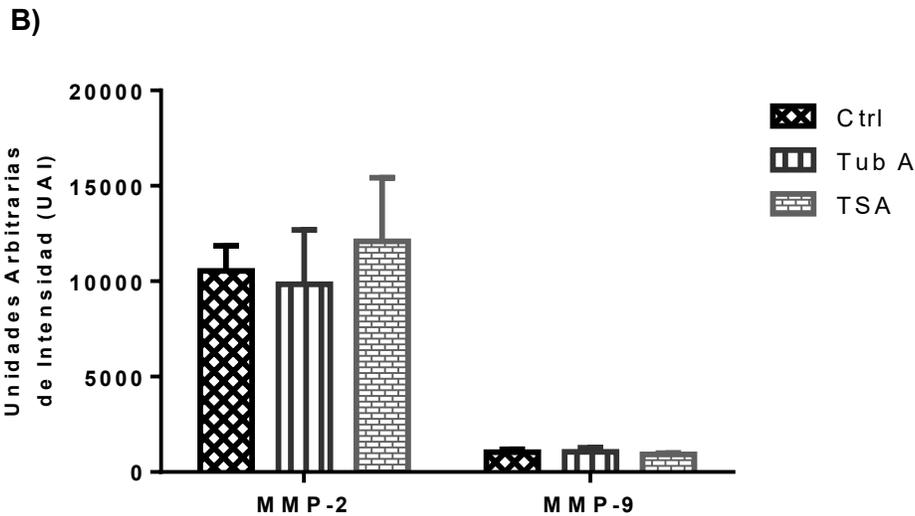


Fig. 11. Efecto de los inhibidores de HDAC sobre la actividad de la MMP-2 y MMP-9 en medios condicionados de las células CCL-206. **A)** Zimogramas que muestran la actividad de las gelatinasas en medios condicionados cuando se tratan con los inhibidores de HDAC. **B)** Efecto de los inhibidores de HDAC sobre la actividad de MMP-2 y MMP-9. Las barras representan el promedio y la desviación estándar de n=3 experimentos. Como control positivo se utilizó U<sub>2</sub>.

TGF- $\beta$  es considerada como la molécula pro-fibrosante por excelencia y desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la fibrosis pulmonar tanto en humanos como en modelos animales. Se ha demostrado que fibroblastos expuestos a TGF- $\beta$  adquieren un fenotipo fibrosante debido a que se incrementa la proliferación y la resistencia a la apoptosis (41-42), además de que se ha demostrado que esta molécula puede incrementar la actividad de las gelatinasas (43-44). Debido a la importancia de esta molécula, nosotros decidimos analizar si la Tub A y el TSA modifican la respuesta fibrosante inducida por TGF- $\beta$  en los fibroblastos y para ello se analizó la proliferación y la actividad de MMP-2 y MMP-9.

Como se muestra en la figura 12, el estímulo con TGF- $\beta$  induce un incremento significativo de la proliferación de los fibroblastos en todos los tiempos analizados en comparación con el grupo control ( $135 \pm 8\%$  en TGF- $\beta$  vs  $40 \pm 64\%$  en Ctrl a 24 horas;  $447 \pm 41\%$  en TGF- $\beta$  vs  $106 \pm 37\%$  en Ctrl a 48 horas y  $681 \pm 76\%$  en TGF- $\beta$  vs  $224 \pm 88\%$  en Ctrl a 72 horas;  $p < 0.05$  en todos los casos) y de manera importante se encontró que el tratamiento con los inhibidores disminuye significativamente la proliferación inducida por TGF- $\beta$ , siendo que este efecto es más claro a las 72 horas con Tub A ( $681 \pm 76\%$  en TGF- $\beta$  vs  $84 \pm 44\%$  en Tub A y  $213 \pm 107\%$  en TSA  $p < 0.01$ ).

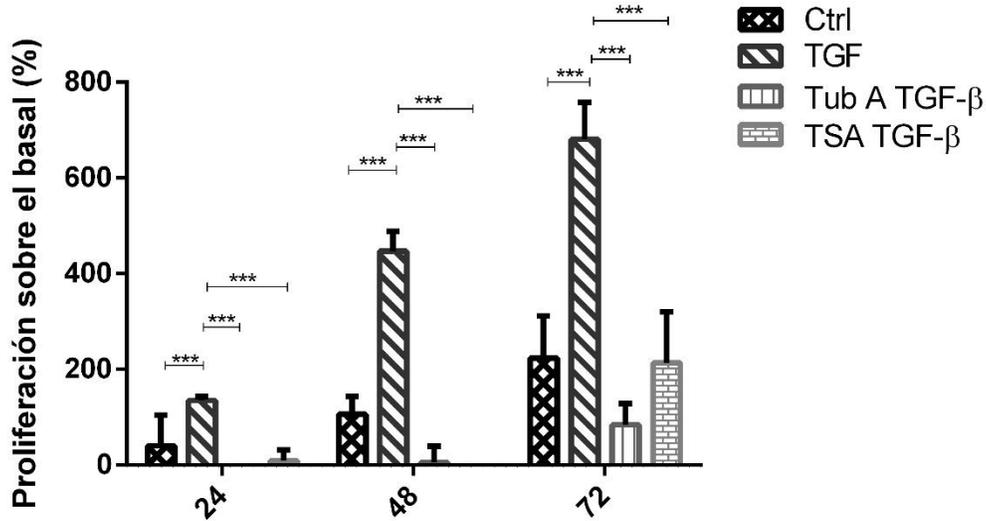


Fig. 12. Efecto de los inhibidores de HDAC y TGF-β [10nM] en la proliferación de fibroblastos. Se muestra la proliferación de la línea celular CCL-206 a las 24, 48 y 72 horas después del estímulo. Las barras representan el promedio y la desviación estándar de n=8 experimentos. \*p<0.05

### Actividad de las gelatinasas: MMP-2 y MMP-9 en presencia de TGF-β

Los resultados obtenidos en tres experimentos diferentes muestran claramente que el estímulo con TGF-β incrementa la actividad de MMP-2 y MMP-9 (Figura 13) y de manera interesante este incremento a causa del TGF-β se ve disminuido de manera significativa cuando las células fueron tratadas con Tub A o con TSA. En el caso de la MMP-2 los resultados del análisis por densitometría en Unidades Arbitrarias de Intensidad (UAI) fueron:  $10095 \pm 910$  en TGF-β vs  $4913 \pm 619$  en TGF-β+Tub A y  $4612 \pm 257$  en TGF-β+TSA;  $p < 0.01$ , en ambos casos. Así mismo, encontramos que el tratamiento con los inhibidores anula el efecto que el TGF-β tiene sobre la actividad de MMP-9 ( $9722 \pm 1437$  en TGF-β vs  $1622 \pm 70$  en TGF-β+Tub A y  $1077 \pm 112$  en TGF-β+TSA;  $p < 0.05$ , en ambos casos).

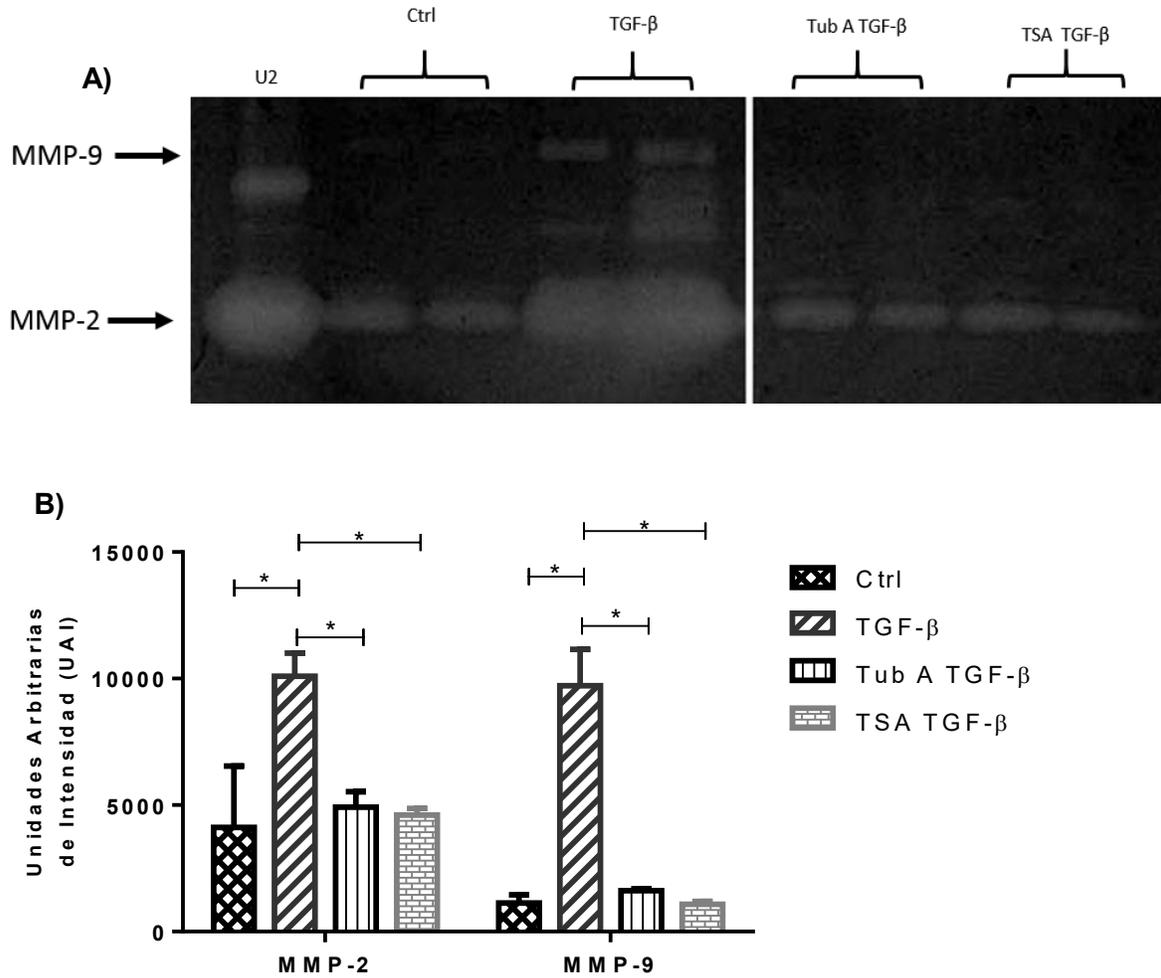


Fig. 13. Efecto de los inhibidores de HDAC mas TGF- $\beta$  (10nM) sobre la actividad de la MMP-2 y MMP-9 en medios condicionados de las células CCL-206. **A)** Zimogramas que muestran la actividad de las gelatinasas en medios condicionados cuando se tratan con los inhibidores de HDAC y TGF- $\beta$ . **B)** Efecto de los inhibidores de HDAC y TGF- $\beta$  sobre la actividad de MMP-2 y MMP-9. Las barras representan el promedio y la desviación estándar de n=3 experimentos. \*p<0.01 y p<0.05 para MMP-2 y MMP-9 respectivamente. Como control positivo se uso U2.

## DISCUSIÓN

Una parte importante del control epigenético en las células resulta del equilibrio entre las actividades opuestas de las HAT y HDAC. Las HDAC son enzimas altamente conservadas que participan en el control de la acetilación/deacetilación de histonas y proteínas no histónicas, por lo cual, las células regulan la actividad transcripcional, además de diversos procesos celulares como el control del ciclo celular, apoptosis, degradación de proteínas, angiogénesis, la invasión y motilidad celular (38-40). Diversos estudios sugieren que las HDAC pueden ser blancos importantes para el tratamiento de patologías como el cáncer y enfermedades fibrosantes, donde ya se ha demostrado que el uso de inhibidores como el TSA afecta directamente la proliferación celular y abate los efectos fibrosantes de moléculas como el TGF- $\beta$ , por lo cual el uso de los inhibidores de HDAC como potencial terapéutico hoy en día es ampliamente estudiado (45-46).

En este estudio trabajamos con Tubastatina A, un inhibidor específico de la HDAC-6 y analizamos sus efectos en la proliferación, la apoptosis y la actividad de gelatinasas en fibroblastos de pulmón de ratón. Adicionalmente, evaluamos si el inhibidor modifica algunos parámetros de la respuesta fibrosante que puede ser inducida por TGF- $\beta$ . En el caso de la proliferación basal encontramos que el uso de Tub A produce una disminución significativa y de manera importante, también tiene un efecto abatiendo la proliferación de fibroblastos inducida por TGF- $\beta$ . De hecho, los niveles de proliferación con Tub A fueron más bajos que aquellos que observamos con el tratamiento de TSA, un inhibidor de amplio espectro que utilizamos como un control positivo y que ya ha demostrado tener efectos reduciendo la proliferación de fibroblastos en una manera dosis dependiente (47). Sin embargo, en nuestras manos el TSA solo causó un efecto a 24 y 48 horas mientras que a 72 horas no vimos diferencias. Esto puede deberse a que en nuestro experimento utilizamos TSA a una concentración de 50 nM, mientras que en otros estudios se han utilizado concentraciones de hasta 300 nM en fibroblastos de pulmón (48). A pesar de ello, en nuestros experimentos mantuvimos 50 nM de TSA debido a que el resto de los experimentos fueron a 24 horas.

Debido a la disminución en la proliferación, lo siguiente que analizamos es si Tub A inducía un aumento en la apoptosis celular o si modificaba el ciclo celular de los fibroblastos. La evaluación de apoptosis por citometría no mostró diferencias entre el grupo control y el de Tub A; sin embargo, el análisis de caspasas 3 y 7 activas indica que el inhibidor si induce apoptosis y también encontramos que la Tub A provoca un arresto de las células en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular.

Los mecanismos moleculares que controlan la proliferación son diversos y en ellos participan una gran variedad de moléculas y cascadas de señalización (13) y en este contexto los efectos de las deacetilasas de histonas no se conocen con precisión. En el caso de la HDAC6 que es la enzima afectada por la tubastatin A, esta información es escasa siendo que la mayoría de los trabajos se han hecho en células de cáncer (49) y no existe información de algún trabajo que se haya hecho en fibroblastos de pulmón, por lo que nuestros resultados son los primeros en describir los efectos en este tipo celular.

En el contexto pulmonar un trabajo hecho por Whan (50) demostró que el uso de SAHA, un inhibidor general de deacetilasas disminuye la proliferación de fibroblastos de pulmón humano, pero no afecta la apoptosis de las células. Cabe mencionar que en este trabajo la apoptosis solo fue evaluada midiendo Anexina V por citometría y cuando nosotros hicimos la misma evaluación tampoco observamos apoptosis; sin embargo decidimos analizar in vitro la presencia de caspasas 3 y 7 activas en los cultivos de células tratadas con tubastatina A y ahí si observamos diferencias significativas, incluso los resultados fueron muy similares a los de las células que fueron tratadas con TSA que utilizamos como control positivo y que ya se ha reportado induce apoptosis (51-52). Es muy probable que esta diferencia se deba a que nuestro trabajo fue con fibroblastos de pulmón de ratón y en el trabajo de Whan se exploraron líneas comerciales de humano y obviamente a que se usaron inhibidores diferentes y en este sentido, SAHA es una molécula aprobada por la FDA como droga para el tratamiento de cáncer precisamente por tener efectos secundarios más benignos que otros inhibidores de deacetilasas (50).

Está bien documentado que la HDAC6 es una deacetilasa con múltiples funciones ya que además de proteínas histonas, tiene como sustratos otras proteínas de núcleo y citoplasma. Una de las principales proteínas no histonas que son sustrato de esta deacetilasa es la  $\alpha$ -tubulina, una proteína importante que regula procesos de migración y proliferación celular. Recientemente, en un trabajo publicado por Tao et al. (53) se mostraron evidencias de que el factor de transcripción MeCP2 puede regular negativamente la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina a través de la HDAC6 en fibroblastos de corazón fibrótico, lo cual afecta directamente la proliferación y el proceso de fibrosis; sin embargo, en este trabajo la inhibición de HDAC6 con tubastatina A si incrementa la acetilación de  $\alpha$ -tubulina pero no modifica la expresión de MeCP2 por lo que sería importante el análisis de esta vía en nuestro modelo ya que es probable que también sea parte de la respuesta de los fibroblastos de pulmón al uso del inhibidor.

No existen reportes de si la inhibición de la HDAC6 modifica el ciclo celular en fibroblastos de pulmón, pero ya se ha reportado que la inhibición de esta deacetilasa con tubastatina A induce un arresto en la fase G1 de células de cáncer de piel (49). Nuestros resultados son el primer indicativo de que la tubastatina A también provoca un arresto ciclo en la fase G0/G1 en fibroblastos de pulmón. Con los resultados anteriores podemos concluir que la inhibición de la HDAC6 con Tub A afecta negativamente la proliferación de fibroblastos de pulmón normal de ratón a través del arresto de las células en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y al menos en este tipo celular, también por inducción de apoptosis.

Los fibroblastos son las principales células efectoras en los procesos fibrosantes y en pulmón, su activación con TGF- $\beta$  induce la proliferación, diferenciación a miofibroblastos y síntesis exagerada de colágena. Adicionalmente, en la fibrosis pulmonar el recambio de matriz extracelular, particularmente la de membranas basales, juega un papel muy importante y en este proceso participan metaloproteasas de matriz como la MMP-2 y la MMP-9 (54-55). Nosotros analizamos si el tratamiento con tubastatina A modifica la proliferación inducida con TGF- $\beta$  y también evaluamos las actividades de MMP-2 y MMP-9 y encontramos que la tubastatina A abate significativamente la proliferación y el incremento de actividad de MMP-2 y MMP-9 inducido por TGF- $\beta$ .

No hay estudios que demuestren que la inhibición de HDAC6 con tubastatina A en fibroblastos modifique la proliferación inducida con TGF- $\beta$ , pero en fibroblastos cardiacos se demostró que el uso de un siRNA-HDAC6 disminuye la proliferación cuando las células son tratadas con TGF- $\beta$  (50). Aunque nosotros no evaluamos los posibles mecanismos implicados en la abrogación, existen algunas evidencias que sugieren que la sobreexpresión del supresor de tumores RASSF1 puede estar implicado en este fenómeno (56). Adicionalmente, ya se ha observado en otros tipos celulares que la tubastatina A puede bloquear los efectos del TGF a través de la inhibición de la vía de Smad 2/3 (40) y es muy probable que en nuestras células estos mismos mecanismos estén operando.

Por último, se ha reportado que el TGF- $\beta$  es capaz de regular positivamente la actividad de MMP-2 y MMP-9 activando la vía de ERK-1/2 y p38 MAPK en células epiteliales de humano. En fibroblastos de ratón se ha observado el mismo efecto en donde el tratamiento con TGF- $\beta$  resulto en 180% y 50% de incremento en la actividad de MMP-2 y MMP-9 respectivamente (23-24). Hasta el momento no hemos encontrado trabajos donde se analicen los efectos de la inhibición farmacológica de la HDAC6 en la actividad de gelatinasas en fibroblastos. Existen reportes de que el TSA inhibe la actividad de la MMP-2 mediante la activación de

la expresión de la molécula RECK lo que dio como resultado la inhibición de la invasión de las células de cáncer de pulmón (57), en otro estudio se observó que el TSA disminuye los niveles de proteína de la MMP-2 y MMP-9 en células escamosas de cáncer esofágico (58), estos resultados también se observaron en un estudio realizado por Mani en donde se observó que el TSA reduce la actividad de las gelatinasas mediante la inhibición de HDAC1, HDAC2 y HDAC3 en lisados totales de corazón de ratón (59). Consecuentemente, los resultados de nuestro trabajo toman mayor relevancia ya que encontramos un abatimiento casi total de los efectos de TGF-B en la actividad de gelatinasas cuando las células son tratadas con tubastatina A y podríamos proponer que la reducción de actividad de MMP-2 y MMP-9 es otro componente importante de los efectos antifibrosantes propuestos para inhibidores de deacetilasas (50).

A pesar de que nuestro trabajo es solamente descriptivo, los resultados de este trabajo sugieren que la HDAC6 podría desempeñar un papel importante como molécula reguladora de la fibrosis en pulmón y ponen en la mesa a las gelatinasas como otro elemento importante para ser considerado en futuros trabajos relacionados con el uso de inhibidores de deacetilasas como agentes útiles para el tratamiento de enfermedades como la fibrosis pulmonar.

## REFERENCIAS

1. Schafer, K. A. (1998). The cell cycle: a review. *Veterinary pathology*, 35(6), 461-478.
2. Drakopanagiotakis, F., Xifteri, A., Polychronopoulos, V. & Bouros, D. (2008). Apoptosis in lung injury and fibrosis, *European Respiratory Journal*, 32(6), 1631-1638.
3. Nagase H, Woessner F. (1999). Matrix Metalloproteinases Minireview. *J Biol Chem*. 274: 21491-21494.
4. Pardo, A., Cabrera, S., Maldonado, M. & Selman, M. (2016) Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*. 17-23(1), 1.
5. Selman, M., King, T., & Pardo, A. (2001) Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy. *Annals of Internal Medicine*. 134(2), 136-151.
6. Bannister, A & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*. 381-395.21 (3).
7. Zhang, X., Liu, H., Hock, T., Thannickal, V & Sanders, Y. (2013). Histone Deacetylase Inhibition Downregulates Collagen 3A1 in Fibrotic Lung Fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci*. 19605-19617. 14.
8. Sanders, Y, Hagood, J. (2010). The effects of histone deacetylase inhibitors on fibrotic lung fibrosis survival and apoptosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 181
9. Guo, W., Shan, B., Klingsberg, R., Qin, X & Lasky, J. (2009). Abrogation of TGF-1-induced fibroblast-myofibroblast differentiation by histone deacetylase inhibition. *AJP-Lung Cell Mol Physiol*. 864-870. 297 (5).
10. Glozak, M., Sengupta, N., Zhang, X & Seto, E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*. 15–23. 363.
11. Wang, L., Xiang, S., Williams, K., Dong, H., Bai, W., Nicosia, S., Khochbin, S., Bepler, G. & Zhang, X. (2012). Depletion of HDAC6 Enhances Cisplatin-Induced DNA Damage and Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cells. PLoS ONE*. 7(9).
12. Wang, Z., Hu, P., Tang, F., Lian, H., Chen, X., Zhang, Y., He, X., Liu, W & Xie, C. (2016). HDAC6 promotes cell proliferation and confers resistance to temozolomide in glioblastoma. *Cancer Letters*. 134–142. 379

13. Golias, c.h., charalabopoulos, a & charalabopoulos k. (2004). Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Clin pract.* 1134–1141. 58 (12)
14. Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus, C., Kadkhoda, K., Wiechec, E., Halayko, A & Los, M. (2009). Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet.* 497–510. 46.
15. Elmore, Susan. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology.* 495-516. 35.
16. Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200, 448-464.
17. Hernández, J., Pérez, G., Pérez, J., Montaña, M., Ramos, C., Ramírez, A., Camarena, A., Sansores, R & Falfán, R. (2014). Participación de las metaloproteinasas de matriz extracelular en la EPOC. *Neumol Cir Torax.* 128-137. 73 (2).
18. Visse R, Nagase H. (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, function and Biochemistry Review. *Circ Res.* 827-839. 92.
19. Nagase, H., Visse, R & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research.* 562–573. 69.
20. Roomi, M.W., Monterrey, J.C., Kalinovsky, T., Rath, M & Niedzwiecki, A. (2009). Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncology reports.* 1323-1333. 21.
21. Corbel, M., Belleguic, C., Boichot, E. & Lagente, V. (2002). Involment of galatinases (MMP-2 and MMP-9) in the development of airway inflammation and pulmonary fibrosis. *Cell Biology and Toxicology.* 51-61. 18
22. Giannandrea, Matthew & Parks, C. (2014). Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Disease Models & Mechanisms.* 193-203. 7.
23. Kim, E., Kim, M., & Moon, A. (2004). TGF- $\beta$ -induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. *International Journal of Oncology.* 1375-1382. 25.
24. Saed, Ghassan M., Zhang, Wendy & Diamond, Michael P. (2000). Effect of Hypoxia on Stimulatory Effect of TGF- $\beta$  on MMP-2 and MMP-9 Activities in Mouse Fibroblasts. *J Soc Gynecol Investig.* 348-354. 6 (7).
25. Sawan, C., Vaissiere, T., Murr, R & Herceg, Z. (2008). Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cáncer. *Mutation Research.* 1–13. 642.

26. Kouzarides, Tony. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*. 693-705. 128.
27. Vaissiere, T., Sawan, C & Herceg, Z. (2008). Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation Research*. 40–48. 659
28. Kim, G. H., Ryan, J. J., Marsboom, G., & Archer, S. L. (2011). Epigenetic mechanisms of pulmonary hypertension. *Pulmonary Circulation*. 347–356. 1(3).
29. Bannister, Andrew J & Kouzarides, Tony. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*. 381-395. 21(3).
30. Zentner, G. E. & Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 259–66. 20.
31. Tessarz, Peter & Kouzarides, Tony. (2014). Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 1-6.
32. Roche, Joëlle & Bertrand, Philippe. (2016). Inside HDACs with more selective HDAC inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 1-33.
33. Aldana-Masangkay, Grace I. & M. Sakamoto, Kathleen (2011). The Role of HDAC6 in Cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1-10.
34. Zhang, Yu., Gilquin, Benoit., Khochbin, Saadi & Matthias, Patrick. (2006). Two Catalytic Domains Are Required for Protein Deacetylation. *The journal of biological chemistry*. 2401-2404. 281 (5).
35. Tao, Hui., Shi, Kai-Hu., Yang, Jing-Jing., Huang, Cheng., Zhana, Hong-Ying & Li, Jun. (2014). Histone deacetylases in cardiac fibrosis: Current perspectives for therapy. *Cellular Signalling*. 521–527. 26.
36. Micelli, Carmina & Rastelli, Giulio. (2015). Histone deacetylases: structural determinants of inhibitor selectivity. *Drug Discovery Today*. 718-735. 20 (6).
37. Ononye, S. N., van Heyst, M., Falcone, E. M., Anderson, A. C., & Wright, D. L. (2012). Toward isozyme-selective inhibitors of histone deacetylase as therapeutic agents for the treatment of cancer. *Pharmaceutical patent analyst*. 207-221. 1 (2).
38. Hrgovic, Igor., Doll, Monika., Kleemann, Johannes., Wang, Xiao-Fan., Zoeller, Nadja., Pinter, Andreas., Kippenberger, Stefan., Kaufmann, Roland. & Meissner, Markus. (2016).The histone deacetylase inhibitor trichostatin a decreases

- lymphangiogenesis by inducing apoptosis and cell cycle arrest via p21-dependent pathways. *BMC Cancer*.
39. Chen, X., Xiao, W., Chen, W., Luo, L., Ye, S & Liu, Y. (2013). The epigenetic modifier trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses proliferation and epithelial–mesenchymal transition of lens epithelial cells. *Cell Death and Disease*. 4(10). 884
  40. Choi SY, Ryu Y, Kee HJ, Cho SN, Kim GR, Cho JY, Kim HS, Kim IK & Jeong MH. (2015). Tubastatin A suppresses renal fibrosis via regulation of epigenetic histone modification and Smad3-dependent fibrotic genes. *Vascular Pharmacol*. 130 –140. 72. 763. 16(1).
  41. Selman, M., López-Otín, C., & Pardo, A. (2016). Age-driven developmental drift in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*, 538-552. 48(2).
  42. Cabrera, S., Selman, M., Lonzano-Bolaños, A., Konishi, K., Richards, T. J., Kaminski, N., & Pardo, A. (2013). Gene expression profiles reveal molecular mechanisms involved in the progression and resolution of bleomycin-induced lung fibrosis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, L593–L601 304(9).
  43. Ramírez, Gustavo., Hagood, James S., Sanders, Yan., Ramírez, Remedios., Becerril, Carina., Segura, Lourdes., Barrera, Lourdes., Selman, Moisés & Pardo, Annie. (2011). Absence of Thy-1 results in TGF- $\beta$  induced MMP-9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts. *Laboratory Investigation*. 1206–1218. 91.
  44. Kim, E., Kim, M., & Moon, A. (2004). TGF- $\beta$ -induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. *International Journal of Oncology*, 1375-1382. 25.
  45. Pang, M., Kothapally, J., Mao, H., Tolbert, E., Ponnusamy, M., Chin, Y. E., & Zhuang, S. (2009). Inhibition of histone deacetylase activity attenuates renal fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. F996–F1005. 297(4)
  46. Manson, S. R., Song, J. B., Hruska, K. A., & Austin, P. F. (2014). The HDAC-Dependent Transcriptional Repression of *Bmp-7* Potentiates TGF- $\beta$ -Mediated Renal Fibrosis in Obstructive Uropathies. *The Journal of Urology*. 242–252. 191(1).

47. Jian-Sheng, D., Wen-Sen, X., Cheng-Gang, Y., Ying-Mei, W., Bing, L., Wei, X., Bei, L., Shu-Zhong, G & Xu-De, S. (2011). Trichostatin A inhibits collagen synthesis and induces apoptosis in keloid fibroblasts. *Arch Dermatol Res.* 573–580. 303.
48. Cisneros, José., Hagood, James., Checa, Marco., Ortiz, Q. Blanca., Negreros, Miguel., Herrera, Iliana., Ramos, Carlos., Pardo, Annie & Selman., Moisés. (2013). Hypermethylation-mediated silencing of p14ARF in fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* L295–L303. 303.
49. Woan, K. V., Lienlaf, M., Perez-Villaroel, P., Lee, C., Cheng, F., Knox, T., Woods, D.M., Barrios, K., Powers, J., Sahakian, E., Wang, H.W., Canales, J., Marante, D., Smalley, K.S.M., Bergman, J., Seto, E., Kozikowskic, A., Pinilla-Ibarz, J., Sarnaik, A., Celis, E., Webera, J., Sotomayor, E.M. & Villagra, A. (2015). Targeting histone deacetylase 6 mediates a dual anti-melanoma effect: Enhanced antitumor immunity and impaired cell proliferation. *Molecular oncology*, 1447-1457. 9(7).
50. Wang, Z., Chen, C., Finger, S. N., Jung, M., Schwarz, H., Swanson, N., Lareu, R.R. & Raghunath, M. (2009). Suberoylanilide hydroxamic acid: a potential epigenetic therapeutic agent for lung fibrosis?. *European Respiratory Journal.* 145-155. 34(1).
51. Ma, J., Guo, X., Zhang, S., Liu, H., Lu, J., Dong, Z., Liu, K., Ming, L. (2015). Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses proliferation and promotes apoptosis of esophageal squamous cell lines". *Molecular Medicine Reports.* 4525-4531. 11(6).
52. Diao, J. S., Xia, W. S., Yi, C. G., Wang, Y. M., Li, B., Xia, W., Liu, B., Guo, S. Z. & Sun, X. D. (2011). Trichostatin A inhibits collagen synthesis and induces apoptosis in keloid fibroblasts. *Archives of dermatological research.* 573-580. 303(8).
53. Hui, Tao., Yang, Jing-Jing., Shi, Kai-Hu & Li, Jun. (2016). Epigenetic factors MeCP2 and HDAC6 control  $\alpha$ -tubulin acetylation in cardiac fibroblast proliferation and fibrosis. *Inflamm Res.* 415–426. 65 (5).
54. Kim, J. Y., Choeng, H. C., Ahn, C., & Cho, S.-H. (2009). Early and Late Changes of MMP-2 and MMP-9 in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Yonsei Medical Journal*, 50(1), 68–77.

55. Pardo, A., & Selman, M. (2006). Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 383-388. 3(4).
56. Tao, H., Yang, J. J., Hu, W., Shi, K. H., & Li, J. (2016). Hdac6 Promotes Cardiac Fibrosis Progression through Suppressing Rassf1a Expression. *Cardiology*. 18-26. 133(1).
57. Liu, Li-The., Chang, Hui-Chiu., Chiang, Lien-Chai & Hung, Wen-Chun. (2003). Histone Deacetylase Inhibitor Up-Regulates RECK to Inhibit MMP-2 Activation and Cancer Cell Invasion. *Cancer Res.* 3069-3072. 63(12).
58. Wang, F., Qi, Y., Li, X., He, W., Fan, Q. X., & Zong, H. (2013). HDAC inhibitor trichostatin A suppresses esophageal squamous cell carcinoma metastasis through HADC2 reduced MMP-2/9. *Clinical & Investigative Medicine*. 87-94. 36(2).
59. Mani, S. K., Kern, C. B., Kimbrough, D., Addy, B., Kasiganesan, H., Rivers, W. T., Patel, R. K., Chou, J. C., Spinale, F.G., Mukherjee, R & Menick, D. R. (2015). Inhibition of class I histone deacetylase activity represses matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and preserves LV function postmyocardial infarction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. H1391–H1401. 308(11).