



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**PAPEL DE MIR-487B SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE FIBROBLASTOS
DE PACIENTES CON NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ESPINA ORDOÑEZ MARCO ANTONIO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. BLANCA ORTIZ QUINTERO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**PAPEL DE MIR-487B SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE FIBROBLASTOS
DE PACIENTES CON NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ESPINA ORDOÑEZ MARCO ANTONIO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. BLANCA ORTIZ QUINTERO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2018

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 06 de noviembre de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **ESPIÑA ORDOÑEZ MARCO ANTONIO** con número de cuenta **307179812**, con la tesis titulada "**PAPEL DE miR-487b SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD**", realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA**:

- Presidente: DRA. ANNIE PARDO CEMO
- Vocal: DR. VÍCTOR MANUEL RUIZ LÓPEZ
- Secretario: DRA. BLANCA ORTIZ QUINTERO
- Suplente: DR. MIGUEL ÁNGEL VELÁZQUEZ FLORES
- Suplente: DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 09 de enero de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la oportunidad que me brindó para superarme académicamente y para poder ser algún día un investigador en materia de salud.

También agradezco el apoyo recibido por CONACYT por medio de una beca económica que me permitió pagar todos los servicios, equipos y materiales necesarios para concluir de manera satisfactoria esta gran meta en mi formación académica.

Al Dr. José Guadalupe Cisneros Lira por creer en mí y darme la oportunidad de realizar un posgrado bajo su tutoría y finalmente a mi comité tutor integrado por la Dra. Blanca Ortiz Quintero y la Dra. María de Lourdes Segura Valdez que debido a sus sugerencias y comentarios permitieron que este proyecto tomara el mejor rumbo para que se concluyera de manera satisfactoria.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Laboratorio Nacional de Soluciones para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT) por las facilidades brindadas para el uso de sus instalaciones y equipos que fueron esenciales para culminar el trabajo experimental de este proyecto.

A mi mamá y mi hermana por aguantarme a diario y por estar siempre ahí conmigo apoyándome de alguna u otra manera. Y a todo el resto de mi familia que saben que las quiero.

A mis compañeras de laboratorio Fernanda (Nerd), Ángeles y Soledad por apoyarme sacar algunos experimentos cuando se me atravesaba un embotellamiento, por aguantar mi amargura y por su valiosa amistad. ¡Las quiero!!!

A todos los integrantes del grupo de investigación dirigidos por el Dr. Moisés Selman y la Dra. Annie Pardo, los cuales conforman un gran equipo de investigación y del cual estoy orgulloso de pertenecer.

A mi amigo de la primaria el más teporocho de todos Aarón, que, a pesar de dejarnos de ver algunos años, seguimos siendo los mismos que de niños, por tus consejos, porque me consecuentas y aguantas en los embotellamientos que casualmente se arman.

A mis amigos de la prepa (La Bola) que son una gran familia y que sé que con ustedes siempre puedo contar. Muchas gracias.

Y a cada uno de mis amigos de la secundaria, prepa y universidad que se me estén pasando porque si no nunca terminaría estos agradecimientos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	IV
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	7
1. Enfermedades pulmonares intersticiales difusas	7
1.1 Clasificación	7
2. Neumonitis por hipersensibilidad	7
2.1 Epidemiología y etiología	8
2.2 Clasificación y diagnóstico	8
2.3 Inmunopatofisiología	10
2.4 Genética de la enfermedad	12
2.5 El fibroblasto pulmonar	12
2.6 Papel de los fibroblastos en la enfermedad	13
3. micro-RNAs	14
3.1 Biogénesis	14
3.2 Mecanismos de acción	15
3.3 Regulación transcripcional y post-transcripcional de miRNAs	17
3.4 Papel de miRNAs en el desarrollo de enfermedades pulmonares	17
3.5 miRNAs en el proceso fibrótico	18
4. miR-487b	18
4.1 Papel fisiológico y patológico de miR-487b	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
METODOLOGÍA	23
1. Cultivo de fibroblastos	23
2. Transfección de fibroblastos	23
3. Extracción de RNA y miRNAs	24
4. qPCR del miR-487b	24
5. Western Blot	25
6. qPCR de BMI-1	25
7. Ensayos de migración	25
8. Ensayo de tasa de crecimiento y proliferación	26
9. Detección de apoptosis	27
10. Análisis estadístico	27
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	46
LITERATURA CITADA	47

ABREVIATURAS

EPID. Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas

MHC II. Complejo Principal de Histocompatibilidad

TAP. Transportadores de procesamiento de antígeno

RNA. Ácido Ribonucleico

miRNA. micro RNA

UTR. Región no traducida (por sus siglas en inglés)

EPOC. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

FPI. Fibrosis Pulmonar Idiopática

NINE. Neumonía Intersticial No Específica

NID. Neumonía Intersticial Descamativa

NIA. Neumonía Intersticial Aguda

NIL. Neumonía Intersticial Linfocítica

TACAR. Tomografía Computarizada de Alta Resolución

IFN- γ . Interferón gama

TNF- α . Factor de Necrosis Tumoral alfa

MMP. Metalopeptidasa de Matriz

PDGF. Factor de crecimiento derivado de plaquetas

IGF-1. Factor de crecimiento a insulina

TGF- β . Factor de Crecimiento transformante beta

NKT. Linfocitos Natural Killers T

MHC. Complejo principal de histocompatibilidad

TAP. Proteína asociada al procesamiento de antígeno

GM-CSF. Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

EMT. Transición epitelio-mesénquima

GTP. Trifosfato de guanosina

TRBP. Proteína de unión

RISC. Complejo de silenciamiento inducido por RNA

HDL. Lipoproteína de alta densidad

ADAR. Deaminasas de adenosina que actúan sobre RNA

circRNA. RNA circular

ceRNA. Competidor endógeno de RNA

snoRNA. RNA pequeño nucleolar

qPCR. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

cDNA. DNA complementario

mRNA. RNA mensajero

SFB. Suero Fetal Bovino

SMAC. Segundo activador de caspasa derivado de la mitocondria

DIABLO. Proteína de unión al Inhibidor directo de apoptosis con bajo punto isoléctrico

WB. Western Blot

siRNA. RNA pequeño de interferencia

PDMS. Polidimetilsiloxano

IAP. Proteína inhibitoria de la apoptosis

UIP. Neumonía Intersticial Usual

BMP. Proteína morfogénica de hueso

NHLF. Normal Human Lung Fibroblast

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corte histológico de NH que muestra granuloma mal definido con células gigantes multinucleadas y una gran infiltración de células.	9
Figura 2. Mecanismos en la patogénesis de la Neumonitis por Hipersensibilidad.....	10
Figura 3. Vía canónica de biogénesis de miRNAs.	15
Figura 4. Mecanismos de acción de miRNAs.	16
Figura 5. Localización genómica del miR-487b.....	19
Figura 6. Expresión basal del miR-487b en fibroblastos normales y fibroblastos derivados con NH obtenidos en el análisis de perfil de expresión por qPCR.	21
Figura 7. Representación gráfica del bioanálisis del RNA de 9 muestras de fibroblastos..	28
Figura 8. Expresión basal del miR-487b en fibroblastos primarios. Se muestra mediana con rangos intercuartiles.	29
Figura 9. A) Expresión basal de SUZ12, BMI-1 y SMAC en fibroblastos normales y fibroblastos con NH. B) Expresión basal de WNT5A en fibroblastos normales y fibroblastos con NH..	30
Figura 10. Análisis densitométrico de la expresión basal de A) BMI-1, B) SUZ12, C) SMAC/DIABLO y D) WNT5A en fibroblastos.	31
Figura 11. Expresión basal del mensajero de BMI-1.....	31
Figura 12. Efecto de la transfección con el mimetizador o inhibidor de miR-487b sobre la expresión de A) BMI-1, B) SUZ12. C) SMAC/DIABLO y D) WNT5A.....	33
Figura 13. Análisis de expresión de BMI-1 por qPCR después de transfectar con el mimetizador o el inhibidor del miR-487b en fibroblastos normales y con NH.	34
Figura 14. Migración basal de fibroblastos pulmonares primarios.....	35
Figura 15. Efecto del miR-487b sobre la migración celular de una línea de A) fibroblastos de NH y B) una línea de fibroblastos control después de 48 horas post-ransfección con el mimetizador o inhibidor del miR-487b. Se muestran las gráficas representativas de la migración de la C) línea de NH y D) una línea control.....	36
Figura 16. Efecto del miR-487b y su silenciamiento sobre la migración de fibroblastos primarios en cámara de Boyden.	37
Figura 17. Proliferación basal de 2 líneas primarias de fibroblastos normales (líneas continuas) y dos líneas de fibroblastos de NH (líneas punteadas).....	37
Figura 18. Ensayo de tasa de crecimiento con el reactivo WST-1 en 2 líneas de fibroblastos normales (18A) y dos fibroblastos de NH (18B).....	38
Figura 19. Efecto del miR-487b sobre la proliferación celular de dos líneas de A) fibroblastos normales y de dos líneas de B) fibroblastos derivados de NH.	39

Figura 20. Gráfica representativa de al menos dos experimentos independientes por duplicado de la razón de cambio de fibroblastos en apoptosis temprana respecto a la condición control. .40

Figura 21. A) Expresión de caspasa 3 por Wb en una línea normales de fibroblastos y una línea de NH y una línea de fibroblastos transfectados con el mimetizador e inhibidor de miR-487b. B) Análisis densitométrico de la expresión relativa de caspasa 3 40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Antígenos implicados en el desarrollo de Neumonitis por Hipersensibilidad..... 8

Tabla 2. Análisis de regresión entre SNORD38b, U6, 5S y el índice Bestekeeper29

RESUMEN

Introducción. La neumonitis por hipersensibilidad (NH) es una enfermedad pulmonar compleja provocada por una respuesta inflamatoria e inmune exagerada a la inhalación de diferentes antígenos y puede provocar la activación y proliferación de fibroblastos, lo que puede conducir a un proceso fibrótico en el pulmón. El mecanismo patogénico involucrado en la fase crónica o fibrótica de la NH no se conoce con precisión y no existen estudios enfocados a estudiar el papel de los miRNAs en fibroblastos de pulmón derivados de pacientes con esta enfermedad. En este trabajo se analizó la expresión del miR-487b en fibroblastos de pacientes con NH y sujetos control, así como los efectos de su inhibición y sobreexpresión en la proliferación y migración de fibroblastos. miR-487b es considerado como un supresor de tumores, pero su papel en fibroblastos de pulmón no ha sido estudiado.

Métodos. Fibroblastos de cultivos primarios derivados de pacientes con NH y sujetos control (normales) se crecieron en medio completo y la expresión del miR-487b se cuantificó mediante qPCR. En fibroblastos normales, la expresión del miR-487b fue inhibida con un hairpin miRNA mientras que en fibroblastos de pacientes con NH el miRNA se sobre-expresó con un mimetizador. La expresión de BMI-1, SUZ12, WNT5A y SMAC/DIABLO, blancos de miR-487b, fue examinada por Western Blot antes y después de la transfección del miR-487b. La migración se evaluó mediante un ensayo de herida y con un ensayo en cámara tipo Boyden. La proliferación se analizó con ensayos que utilizan los reactivos WST y CyQuant y la apoptosis se determinó midiendo la presencia de Anexina-V por citometría de flujo y WB de caspasa 3.

Resultados. El análisis por qPCR mostró una disminución significativa en los niveles de expresión del miR-487b en fibroblastos de NH en comparación con fibroblastos normales ($p < 0.01$). En fibroblastos de pacientes con NH se observó un aumento significativo de la proliferación y migración en comparación con fibroblastos normales y los blancos del miR-487b (BMI-1, SUZ12 y SMAC/DIABLO) se encuentran aumentados. En fibroblastos normales, la inhibición del miR-487b provocó un incremento en la expresión de BMI-1 y SUZ12, así como una disminución de la capacidad proliferativa de los fibroblastos, pero no tiene efectos distinguibles en la migración. Por otra parte, la sobre-expresión del mimetizador de miR-487b en fibroblastos de NH induce una disminución de las proteínas BMI-1, SUZ12 y SMAC/DIABLO, reduce la proliferación y aumenta la migración. Adicionalmente, también se encontró un incremento de la apoptosis en fibroblastos normales en comparación con los de NH.

Conclusión. Los resultados obtenidos sugieren que miR-487b puede tener una función dual en fibroblastos pulmonares, como oncogen al estimular la migración celular y disminuir la expresión de la molécula pro-apoptótica SMAC/DIABLO y como supresor de tumores al promover apoptosis, disminuir la capacidad proliferativa de fibroblastos y regular negativamente la expresión del oncogen BMI-1. Los hallazgos indican que miR-487b podría desempeñar un papel importante en la NH ayudando a reducir la capacidad proliferativa de fibroblastos que pueden conducir a un fenotipo fibrosante en etapas crónicas de la enfermedad.

ABSTRACT

Introduction. Hypersensitivity pneumonitis (HP) is a complex lung disease caused by an exaggerated immune, and inflammatory response to the inhalation of environmental antigens that can produce an activation and proliferation of fibroblasts, which can lead a fibrotic process in the lung. The pathogenic mechanism involved in the chronic/fibrotic phase of HP is not fully understood and there are not studies focused on studying the role of miRNAs in lung fibroblasts derived from patients with this disease. Here, we analyzed the expression of miR-487b in normal and HP fibroblasts and the effects their inhibition and overexpression on the proliferation and migration of fibroblasts. miR-487b is considered like a tumor suppressor, but its role in lung fibroblasts has not been studied.

Methods. Fibroblasts from primary cultures derived from patients with HP and control subjects (normal) were grown in complete medium and the expression of miR-487b was quantified by qPCR. In normal fibroblasts, miR-487b was inhibited with a microRNA hairpin whereas in fibroblasts from patients, overexpression was achieved with a double-stranded RNA (microRNA mimic). The expression of BMI-1, SUZ12, WNT5A and SMAC/DIABLO, targets of miR-487b, was examined by WB before and after of transfection to inhibit or gain function. The migration was evaluated by wound healing assay and a Boyden chamber assay. Proliferation was analyzed with WST and CyQuant, and apoptosis was determined by Annexin-V staining assessed by flow cytometry and WB for caspase 3.

Results. qPCR analysis showed a significant decrease in the expression levels of miR-487b in HP fibroblasts compared to normal fibroblasts ($p < 0.01$). In fibroblasts from patients with HP a significant increase in proliferation and migration was observed in comparison with normal fibroblasts and the targets of miR-487b (BMI-1, SUZ12 and SMAC/DIABLO) are increased. In normal fibroblasts, inhibition of miR-487b caused an increase in the expression of BMI-1 and SUZ12, as well as a decrease in the proliferative capacity of fibroblasts, but has not distinguishable effect on migration. On another hand, over-expression of the miR-487b mimetizer induces a decrease in the BMI-1, SUZ12 and SMAC/DIABLO proteins, reduces proliferation and increases migration in in HP fibroblasts. Additionally, we found an increase of apoptosis in normal fibroblasts versus HP cells.

Conclusion. The results obtained suggest that miR-487b can have a dual function in lung fibroblasts, as an oncogene by stimulating cell migration and decreasing the expression of the pro-apoptotic molecule SMAC/DIABLO and as a tumor suppressor by promoting apoptosis, decreasing the proliferative capacity of fibroblasts and by regulating the expression of the BMI-1 oncogene. The findings indicate that miR-487b could play an important role in NH helping to reduce the proliferative capacity of fibroblasts that can lead to a fibrotic phenotype in chronic stages of the disease.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) constituyen un grupo heterogéneo de padecimientos con manifestaciones clínicas, radiológicas y funcionales similares y representan el 15% de todas las enfermedades respiratorias [1]. La Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) o también conocida como alveolitis alérgica extrínseca, es una EPID caracterizada por la inflamación del parénquima pulmonar que resulta de la exposición a una amplia variedad de antígenos orgánicos como proteínas aviarias, hongos y bacterias, así como a compuestos químicos de bajo peso molecular como los isocianatos [2] y en etapas crónicas genera un cuadro de fibrosis en el pulmón.

En México y en países como Reino Unido, esta enfermedad es causada principalmente por la exposición a antígenos aviarios en sujetos que conviven con aves; a esta variante de NH se le conoce como la enfermedad del cuidador de palomas, considerada como el cuadro clínico prototipo de la NH [3]. Debido a que la enfermedad es causada por diferentes agentes y a que los sujetos sólo acuden a consulta cuando se presenta un cuadro clínico agudo, es difícil estimar su incidencia y prevalencia. Adicionalmente, los estudios epidemiológicos carecen de un criterio diagnóstico uniforme. Sin embargo, se estima que su incidencia está en el orden de 1:100,000 para países como Reino Unido [4] mientras que para México no hay datos disponibles.

Esta enfermedad se desarrolla en individuos susceptibles que ante la inhalación de antígenos montan una respuesta inmunológica exagerada y como consecuencia ocurre un aumento en la infiltración y proliferación de linfocitos, lo que resulta en una marcada inflamación pulmonar. Sin embargo, la exposición crónica al antígeno puede inducir cambios que generan moléculas que activan a los fibroblastos y entonces se puede evolucionar a una fibrosis intersticial, dando como resultado un daño pulmonar severo debido a proliferación exagerada de fibroblastos y a la acumulación matriz extracelular [5]. Adicionalmente, no todos los sujetos expuestos a los antígenos desarrollan la enfermedad, lo que sugiere que factores genéticos están involucrados en su desarrollo; polimorfismos en el complejo principal de histocompatibilidad II (MHC II, por sus siglas en inglés) y en transportadores de procesamiento de antígeno (TAP, por sus siglas en inglés) han sido asociados con un mayor riesgo a desarrollar NH [6, 7].

Bajo este contexto, muchos de los pacientes que consultan en etapas crónicas de la enfermedad presentan cuadros de fibrosis pulmonar, donde los fibroblastos desempeñan un papel primordial. El conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que gobiernan el fenotipo fibrótico de los fibroblastos en las EPID permanece en constante estudio; sin embargo, para el caso de la NH estos estudios son escasos y en particular aquellos que están enfocados

a investigar los mecanismos epigenéticos son prácticamente nulos y en este sentido, no hay información que revele el papel que los micro RNAs (miRNAs) pueden tener en mecanismos que promueven el desarrollo de fibrosis en la NH.

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA endógeno no codificante de 21 a 23 nucleótidos de longitud que por lo general regulan de manera negativa la expresión génica a nivel post-transcripcional. Estos RNAs de cadena sencilla se unen por complementariedad de bases a la región 3' no traducida (3'UTR, por sus siglas en inglés) de los RNAs mensajeros (mRNA, por sus siglas en inglés) blancos, regulando negativamente su expresión por inhibición de la traducción o degradación del mensajero. Considerando la enorme capacidad de los miRNAs de regular la expresión de una gran cantidad de genes y tomando en cuenta el intrincado sistema de control en el que están involucrados, es comprensible que su desregulación tiene repercusiones sobre la homeostasis de un organismo [8].

Un número creciente de miRNAs han sido involucrados en diferentes enfermedades pulmonares como en Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), cáncer pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y asma [9].

Bajo el mismo contexto, se ha demostrado que los miRNAs son moléculas que desempeñan un papel trascendental en el desarrollo y progresión de diferentes enfermedades crónicas, por lo que su estudio como posibles blancos terapéuticos se ha incrementado considerablemente en los últimos 10 años. A pesar de ello, el estudio de estas moléculas en las enfermedades pulmonares intersticiales como FPI son pocos en comparación con los realizados en cáncer pulmonar, y en el caso de NH son prácticamente nulos. En este contexto, los trabajos encaminados al estudio de miRNAs son esenciales para determinar si estas moléculas tienen una función preponderante en el desarrollo de la NH y en el presente trabajo se explora el papel que tiene un miRNA sobre los mecanismos de proliferación y migración de fibroblastos derivados de pacientes con NH.

ANTECEDENTES

1. Enfermedades pulmonares intersticiales difusas

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) constituyen un grupo heterogéneo de padecimientos con manifestaciones clínicas, radiológicas y funcionales similares. Como su nombre lo indica, las EPID afectan principalmente el intersticio pulmonar, aunque también inciden en las vías aéreas pequeñas, alveolos y bronquiolos; muchas presentan un componente inflamatorio y la gran mayoría de ellas culmina en un proceso fibrótico variable que afecta el parénquima pulmonar lo cual conduce a la destrucción de la arquitectura del órgano y pérdida de su función [10]. A pesar de que representan un grupo de enfermedades con una prevalencia baja, se estima que constituyen cerca del 15% de las enfermedades respiratorias. Su etiología es variada y actualmente se conocen más de 150 agentes causales tanto orgánicos como inorgánicos que las desencadenan [11].

1.1 Clasificación

De acuerdo con su origen, las EPID actualmente se clasifican en tres grupos 1) neumonías intersticiales idiopáticas, 2) neumonías asociadas a otros procesos, y 3) neumonías de causas conocidas. La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es el prototipo de las neumonías intersticiales idiopáticas y es una enfermedad crónica y letal de etiología desconocida. [10]. Las neumonías asociadas a otros procesos son secundarias a padecimientos inmunes y granulomatosos, como la sarcoidosis y, por último, dentro de las neumonías de causas conocidas se encuentran enfermedades como la silicosis y la NH.

2. Neumonitis por hipersensibilidad

La NH es un síndrome complejo intersticial con variantes clínicas y con un componente inmunológico e inflamatorio importante en respuesta a la inhalación de una gran variedad de antígenos orgánicos y algunos químicos inorgánicos menores de 5µm en sujetos susceptibles [4]. En nuestro país los pocos datos existentes sugieren que la forma más común de NH es la que desarrollan personas que están expuestas a aves intradomiciliarias como palomas y canarios; a esta forma de NH se le conoce como enfermedad del cuidador de palomas [2].

2.1 Epidemiología y etiología

La NH fue originalmente descrita en 1713 como una enfermedad ocupacional en los granjeros y a partir de esa fecha se han descrito muchas partículas orgánicas de bajo peso molecular que pueden causar la enfermedad [12]. La incidencia y prevalencia de la NH es difícil de estimar con precisión debido a que es mal diagnosticada o no reconocida por los médicos y también por la carencia de un criterio de diagnóstico uniforme; sin embargo, en tres ciudades europeas representa del 4 al 15% de las enfermedades pulmonares [13], en Nuevo México esta cifra cae al 2% [14] y en el Reino Unido representa el 1.8% de todos los casos de enfermedades respiratorias relacionadas al trabajo [12].

Los datos anteriores sugieren que la incidencia de la NH es baja si se toman en cuenta la gran variedad de antígenos que la pueden causar. No existe un papel claro del sexo en el desarrollo de la enfermedad, pero la mayoría de las muertes ocurren en mujeres [15]; en cuanto a edad, la NH usualmente aparece entre la cuarta y sexta década de vida [16]. Actualmente, se han reportado diferentes agentes etiológicos que causan variantes de la enfermedad (Tabla 1) pero los más comunes son partículas orgánicas como: hongos, bacterias, proteínas animales, actinomicetos termófilos y protozoos, así como compuestos químicos de bajo peso molecular como los isocianatos, los cuales funcionan como haptenos que se unen a la albumina para crear una partícula antigénica [4].

Tipo de antígeno	Antígeno	Enfermedad
Bacteriano	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> , <i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	Pulmón de granjero
Fúngico	<i>Aspergillus sp</i> <i>Penicillium sp</i>	Pulmón de Enoki Suberosis
Micobacteriano	<i>Mycobacterium avium</i>	Pulmón de usuario de sauna
Aviario	Proteínas en pulmas, suero y excreta de aves	Enfermedad del cuidador de palomas
Químicos	Isocianatos Anhídridos ácidos	Pulmón de trabajador químico

Tabla 1. Antígenos implicados en el desarrollo de Neumonitis por Hipersensibilidad. *Modificada de Spagnolo, et al. (2015)*

2.2 Clasificación y diagnóstico

Aunque no existen criterios bien definidos, la NH ha sido clasificada en tres formas clínicas: aguda, subaguda y crónica pero dada la gran variabilidad de cuadros clínicos y el curso que pueden tomar, algunos autores como Selman [17] han propuesto otra clasificación que divide a la NH en activa no progresiva e intermitente, aguda progresiva intermitente y crónica tanto progresiva como no progresiva. Sin embargo, ninguna de las dos clasificaciones antes mencionadas se ha aceptado en su totalidad por los neumólogos.

Los síntomas de la forma aguda son similares a una infección viral o bacteriana y se presentan de 4 a 8 horas después de la exposición al antígeno, se reporta que el paciente experimenta escalofríos, fiebre, sudoración, dolor de cabeza y náuseas. Estos síntomas duran pocas horas y se pueden acompañar de síntomas respiratorios como tos y disnea. Esta forma se caracteriza por una respuesta macrófago-linfocitaria en bronquiolos.

La NH subaguda resulta de exposiciones bajas al antígeno causal, pero de manera continua y se caracteriza por la presencia de tos y disnea que puede llegar a ser severa, se presenta gradualmente en días o semanas después de la exposición pudiendo presentar fatiga, anoxia y pérdida de peso [2], esta forma se caracteriza por la formación de granulomas (Figura 1).

El cuadro crónico de la enfermedad puede provenir de dos distintos escenarios: de episodios agudos y subagudos no reconocidos que culminan en la forma crónica recurrente o de una enfermedad lenta y progresiva en pacientes expuestos a bajos niveles del antígeno sin historia clínica de episodios agudos [4], siendo ésta la forma que más se observa debido la tardanza del paciente por buscar ayuda médica y porque no es diagnosticada por médicos especializados. La forma crónica se caracteriza por una inflamación intersticial y un porcentaje importante de casos desencadena un proceso fibrosante que se caracteriza por la migración y proliferación desmedida de fibroblastos, con la subsecuente síntesis excesiva de matriz extracelular que condiciona a un pulmón que pierde su arquitectura funcional y que en muchos casos conduce a la muerte del individuo [18].

El primer paso para el diagnóstico de esta enfermedad es la sospecha clínica por síntomas respiratorios como disnea y tos, la realización de una historia clínica y ocupacional son necesarias para detectar antígenos causales de NH. La realización de pruebas respiratorias (espirometría y pletismografía), radiografía de tórax (opacidad tipo vidrio despulido), tomografía computarizada de alta resolución (TACAR) y estudios de laboratorio como lavado broncoalveolar (% de linfocitos T mayor al 40%), presencia de precipitinas en suero y biopsia pulmonar (histopatología) donde se puede observar la presencia de granulomas mal definidos, bronquiolos con agregados de macrófagos y células gigantes multinucleadas, así como una inflamación persistente (Figura 1)

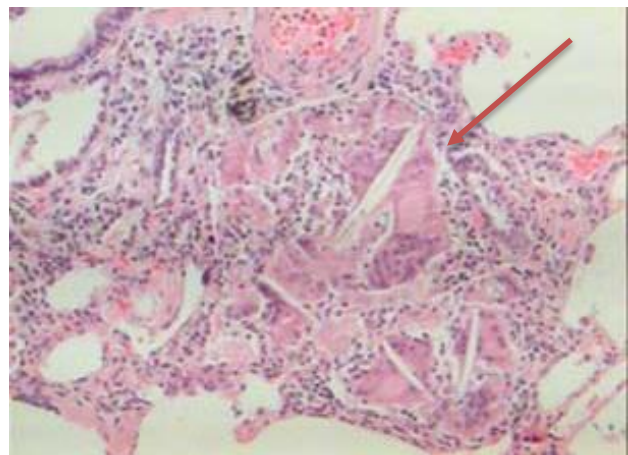


Figura 1. Corte histológico de NH que muestra granuloma mal definido con células gigantes multinucleadas y una gran infiltración de células. Tomado de Mejía, M *et al.* 2007. *Clinics in Chest Medicine.*

son los estudios confirmatorios para diagnosticar NH.

Los tratamientos comunes cuando la enfermedad es diagnosticada son la terapia basada en corticoesteroides para disminuir la respuesta inmune, así como la inflamación local y en la mayoría de los casos se recomienda evitar la fuente de origen del antígeno causal, lo que resulta en una considerable mejoría para el paciente [19].

2.3 Inmunopatofisiología

La patogénesis de la NH es compleja y no del todo comprendida, pero en ella participa un gran componente inmunológico donde mecanismos humorales y celulares contribuyen a la lesión pulmonar.

De manera breve, un sujeto normal que inhala un antígeno resuelve la respuesta inmune sin consecuencias clínicas debido a que existe en él una tolerancia inmune.

Por otro lado, la coexistencia de factores genéticos y ambientales en un sujeto susceptible que inhala el mismo antígeno desencadena una respuesta inmune exagerada caracterizada por una inflamación pulmonar e infiltración de macrófagos y linfocitos activados que por la liberación de citocinas como el IFN- γ , favorecen la formación de granulomas, característicos en la enfermedad. Debido a la existencia de factores promotores como exposiciones futuras al antígeno o predisposición genética del individuo, ocurren cambios inmunológicos que inducen la expansión y activación de

fibroblastos y por ello una acumulación de componentes de matriz extracelular, lo que culmina en la mayoría de los casos crónicos de la enfermedad en un proceso fibrótico (Figura 2) [5].

En las formas agudas y subagudas de la enfermedad, la respuesta inmune es caracterizada por ser del tipo Th1 (liberación de citocinas

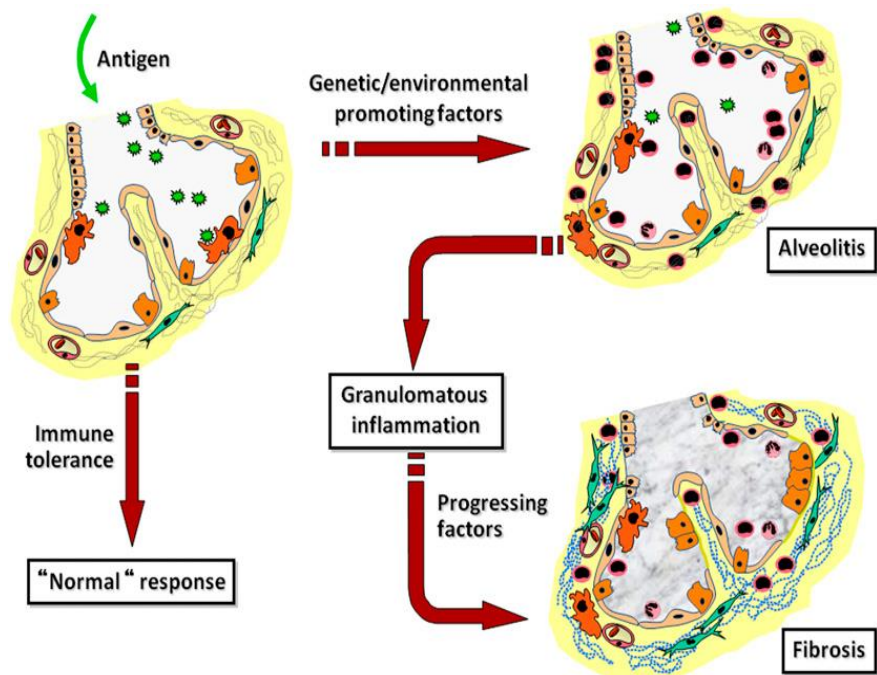


Figura 2. Mecanismos en la patogénesis de la Neumonitis por Hipersensibilidad. Tomado de Selman *et al.* 2012. *Am J Respir Crit Care Med.*

proinflamatorias como TNF- α , IL-12, IL-8 e IFN- γ) y las reacciones de hipersensibilidad prevalentes son del tipo III (mediada por complejos inmunes) pues se activa la vía del complemento liberándose C5a, que a su vez recluta y activa macrófagos y neutrófilos cargados con colagenasa 2 (MMP-8) y gelatinasa B (MMP-9) [20]; y del tipo IV (mediada por linfocitos T) donde los linfocitos T se activan, proliferan y disminuyen su apoptosis promoviendo la alveolitis característica de la enfermedad [21].

Otras anormalidades inmunes reportadas en NH son el aumento local de linfocitos T CD8 y de linfocitos Th17 donde la diferenciación de éstos últimos es inducida por el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés), estas células se han considerado potenciadoras importantes en el desarrollo de la enfermedad; un reporte demostró que la delección de IL-17A indujo una menor inflamación y confirió protección contra el desarrollo de la enfermedad [22], así mismo la IL-17A producida por neutrófilos favorece su propio reclutamiento provocando más inflamación en la etapa aguda de la enfermedad [23].

Otro reporte sugiere que la IL-4 producida por linfocitos Natural Killers T (NKT) inhibe la secreción de IFN- γ por neutrófilos teniendo de esta manera un efecto protector en el desarrollo de NH inducida por una especie de hongo en específico [24].

Aunado a lo anterior, se ha demostrado que, en formas agudas y subagudas, hay un aumento de linfocitos T CD8 mientras que en la forma crónica es de linfocitos T CD4 acompañado de una disminución de células T $\gamma\delta$ inducida por niveles altos de IL-22 [25].

Otros reportes demostraron que el aumento de linfocitos Th17 promueve la formación de depósitos de colágeno en el pulmón en respuesta a una exposición crónica al antígeno [4], por otro lado, se ha sugerido que células T regulatorias CD4⁺ CD25⁺ cumplen un papel supresor sobre el IFN- γ producido por células T, por lo que estas células regulatorias en NH no parecen estar llevando a cabo esa función supresora sobre la respuesta inmune inflamatoria [26].

En ratones también se ha mostrado que una polarización a Th1 hace que el individuo sea más susceptible al desarrollo de NH que una polarización Th2, esto debido a una baja expresión de IL-4 por células Th1 CD4 [27], lo que indica la importancia de esta interleucina en el curso de la enfermedad. Por otro lado, se han asociado factores ambientales a la aparición de la enfermedad que incluyen, alta exposición a insecticidas, humedad alta e infecciones virales por influenza, los cuales se ha demostrado que inducen el aumento de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 en macrófagos alveolares aumentando así su capacidad de presentación de antígeno [28].

Los efectos de fumar en el desarrollo de la NH no son claros pero las investigaciones sugieren que la NH es más frecuente en no fumadores que en fumadores, por lo que al tabaquismo se le

ha considerado que tiene un efecto protector contra el desarrollo de NH. Sin embargo, los pacientes que tienen la enfermedad y son fumadores presentan un peor pronóstico. [29].

2.4 Genética de la enfermedad

La mayoría de las personas expuestas a los antígenos causales de NH no desarrollan la enfermedad, lo que sugiere la existencia de una susceptibilidad genética (factor promotor) que junto con los antígenos causales (factores inductores) conforman a la hipótesis conocida como “two-hits”, donde ambos factores coexisten y permiten el desarrollo de una respuesta inmune exagerada con una marcada inflamación [5].

Dentro de las alteraciones genéticas, se han identificado polimorfismos en la región promotora del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés) [6], de genes que afectan la degradación proteosomal de péptidos que se cargarán en el complejo principal de histocompatibilidad clase 2 (MHC-II, por sus siglas en inglés) y en transportadores asociados a la presentación de antígeno (TAP, por sus siglas en inglés) [7], y se ha demostrado que algunas variantes en el promotor del gen del inhibidor tisular de metaloproteasas 3 (TIMP-3, por sus siglas en inglés) tienen un efecto protector, pues reduce el riesgo de desarrollar NH; sin embargo, el mecanismo responsable de este fenómeno no está bien esclarecido [30].

Por otro lado, se sabe que el transcriptoma deriva de la interacción entre el ambiente y factores genéticos y hablando de desórdenes crónicos pulmonares existe en la actualidad un crecimiento del conocimiento de la regulación epigenética en el desarrollo fibrótico que incluye metilación del DNA, modificaciones de histonas y regulación por RNA no codificantes [31], sin embargo, en el caso de la NH se desconoce el papel que cualquier mecanismo epigenético antes mencionado, pudiera tener en el fenotipo de los fibroblastos pulmonares en el contexto de inicio y cronicidad de esta enfermedad.

2.5 El fibroblasto pulmonar

Los fibroblastos representan el tipo celular más abundante y menos especializado del tejido conectivo e integran una familia muy heterogénea de células, presentes en casi todos los tejidos; sin embargo, son muy diferentes en términos de estructura, fisiología, comportamiento, función y receptores de superficie. Estudios en ratones, han identificado subpoblaciones de fibroblastos con función y fenotipos particulares, por ejemplo, los pericitos y los miofibroblastos, que representan una subpoblación de fibroblastos con un fenotipo similar al de células del

músculo liso, debido a que expresan α -actina de músculo liso (α -SMA, por sus siglas en inglés) en su citoesqueleto [32].

Algunas características de los fibroblastos pulmonares son su forma fusiforme o de huso, la expresión de actinas F, β y γ en su citoesqueleto, así como de un patrón de organelos poco desarrollados, y participan activamente en la remodelación de la matriz extracelular mediante la producción de diversas enzimas de la familia de las MMPs, proteoglicanasas, glicosaminoglicanasas y los TIMPs [33]. En términos patológicos, los fibroblastos son los responsables directos de conducir el proceso de fibrosis pulmonar.

Los fibroblastos pulmonares en cultivo se comportan como células permanentemente activadas que liberan espontáneamente citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés). Estas células, al ser activadas por la IL-4 o la IL-13 participan en la patogénesis de la inflamación bronquial y en la remodelación o destrucción de la vía aérea como ocurre en NH. Así mismo, los fibroblastos desempeñan un papel activo en la aparición de las enfermedades alérgicas respiratorias ya que también responden a las citocinas de una respuesta Th2 [34].

2.6. Papel de los fibroblastos en la enfermedad

Como se describió anteriormente, en las etapas crónicas de la NH se puede desencadenar un proceso fibrótico. Los procesos moleculares que ocurren entre la resolución de la alveolitis linfocítica y la progresión a la fibrosis, donde el tipo de respuesta cambia de Th1 a Th2 y la célula efectora pasa a ser el fibroblasto pulmonar, no se conocen con precisión. A pesar de ello, hay evidencias de que los fibroblastos podrían ser activados por células inmunes infiltradas a través de la secreción de IL-4 e IL-13 [2].

La mayor parte del conocimiento que se tiene acerca de los procesos moleculares y celulares implicados en la patogénesis de la fibrosis en pulmón provienen de estudios relacionados en FPI. En esta enfermedad se ha sugerido que los fibroblastos pueden tener tres orígenes distintos, el principal es de los fibroblastos residentes en el intersticio pulmonar que migran y proliferan excesivamente durante el proceso fibrótico, otra fuente es por diferenciación de células progenitoras de la médula ósea y por último, aquellos fibroblastos que derivan de la transición de células epiteliales a fibroblastos mediante el proceso de Transición Epitelio Mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) [35] y se ha sugerido que los fibroblastos derivados de pulmones con FPI son resistentes a la muerte celular. De manera interesante existen reportes de que los fibrocitos derivados de médula ósea son una fuente importante de

células con fenotipo pro-fibrotico y son abundantes en pacientes con NH y tienen efectos sobre la respuesta fibrótica en esta enfermedad.

Existen diferentes citocinas y factores que están implicados en la activación de fibroblastos durante la génesis de la fibrosis. Moléculas como PDGF, IGF-1 y TGF- β son esenciales para desencadenar una respuesta fibrosante. El TGF- β es la citocina profibrótica por excelencia y sus efectos en fibroblastos son contundentes favoreciendo la transición a miofibroblastos, un fenotipo más agresivo que expresa α -SMA. Adicionalmente, TGF- β induce la expresión de colágena y disminuye la producción de enzimas que degradan matriz extracelular, particularmente aquellas que degradan a la colágena y también participa en la EMT [36].

Un estudio en fibroblastos de NH demostró que existen poblaciones negativas para Thy-1, que es una glicoproteína unida a glucofosfatidilinositol; estas poblaciones se caracterizan por ser más pequeñas, tener una capacidad proliferativa mayor y que en presencia de TGF- β son capaces de secretar MMP-9, una metaloproteasa que ha sido implicada en el proceso fibrótico, lo cual hace que estos fibroblastos Thy1⁻ presentes en algunos pacientes con NH tengan un fenotipo profibrótico [37].

3. micro-RNAs

Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes endógenos que regulan post-transcripcionalmente la expresión génica de manera secuencial específica y desde su descubrimiento en 1993 por Victor Ambros y colaboradores durante el desarrollo larvario de *Caenorhabditis elegans*, donde se describieron como secuencias de aproximadamente 21 nucleótidos complementarias a la región 3' no traducida (3'UTR, por sus siglas en inglés) del RNA mensajero blanco, comenzó un nuevo campo de investigación en RNAs pequeños no codificantes [38].

3.1 Biogénesis

El genoma humano tiene registrados en las bases de datos más de 1000 miRNAs, la mayoría provienen de regiones intergénicas [39] y aproximadamente un 25% están localizados en regiones intrónicas y son transcritos en la misma dirección que el RNA mensajero [38].

Existen dos vías para la biogénesis de los miRNAs. La vía canónica (Figura 3) comienza en el núcleo con la transcripción del miRNA primario (pri-miRNA) por la RNA polimerasa II que produce un transcrito poliadenilado en el extremo 3' y con una 7-metilguanosa en el extremo 5', este pri-miRNA es modificado por el complejo microprocesador compuesto por DROSHA (RNAsa tipo III) y su cofactor DGCR8, que elimina las modificaciones en cada uno de los extremos generando un pre-mi-RNA de entre 60 y 70 nucleótidos de longitud. El pre-mi-RNA se exporta al citoplasma por el complejo formado por exportina y 5-Ran-GTP y es procesado en citoplasma por Dicer (RNAsa) y TRBP para generar un miRNA dimérico maduro [38]. Una de las dos hebras del miRNA dimérico se degrada mientras que la otra es incorporada junto con la proteína Argonauta 2 (Ago 2), al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés) que dirige el miRNA maduro a la secuencia 3'UTR del RNA mensajero blanco y por medio de complementariedad de bases se une y provoca la degradación del mensajero o la inhibición de la traducción [40].

La vía no canónica de biogénesis de miRNAs involucra aquellos que se originan de horquillas cortas de intrones derivados del proceso de empalme llamados mirtrones y que se generan por la acción de la enzima Ldbr que genera un pre-miRNA que después se procesa en citoplasma por DICER (Figura 4) [41].

Adicionalmente, existen clusters de miRNAs en humanos, como el localizado en el cromosoma 19 (C19MC) que son transcritos por la RNA polimerasa III, donde estos miRNAs están flanqueados por elementos Alu [42].

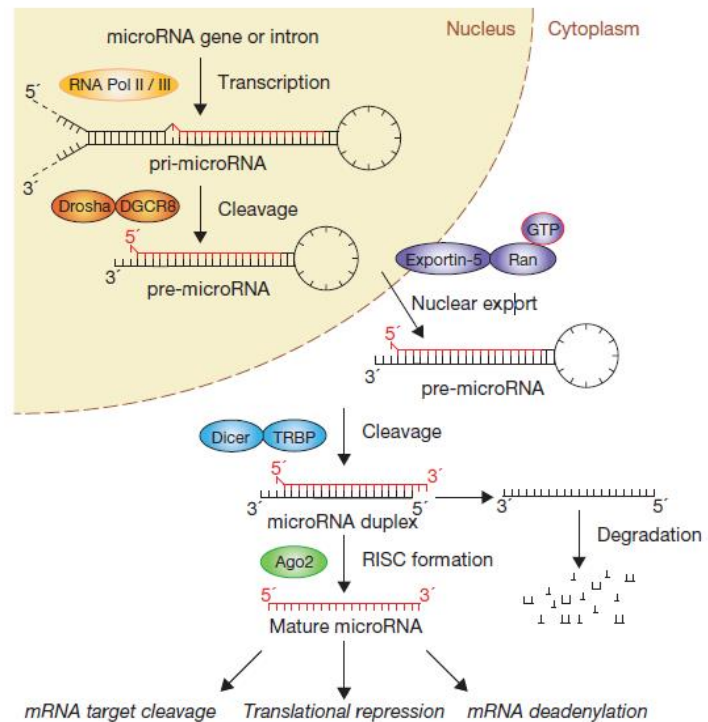


Figura 3. Vía canónica de biogénesis de miRNAs. Tomado de Winter, *et al.* 2009. *Nature cell biology*.

3.2. Mecanismos de acción

Para llevar a cabo su acción, los miRNAs se deben aparear en la región 3'UTR del mensajero blanco con la región semilla del miRNA, que es una zona en el extremo 5' comprendida entre

los nucleótidos 2 y 7 [43] y dependiendo del grado de complementariedad se puede dar la degradación del RNA mensajero blanco o una represión de la traducción (Figura 3). La unión de un miRNA y la 3'UTR de su RNA mensajero blanco también provoca el decaimiento del mensajero por deadenilación de su extremo 3' y el secuestro del RNA mensajero mediado por Ago2 a cuerpos P [44], en plantas y hongos inducen metilación del DNA y formación de heterocromatina [45].

La función más reportada de los miRNA es la regulación negativa de sus mensajeros blanco; sin embargo, hay algunos estudios donde se demuestra que algunos miRNAs potencian la expresión de mensajeros que tienen secuencias complementarias como el miR-373, que induce la expresión de E-caderina mediada por una secuencia complementaria en su promotor [46].

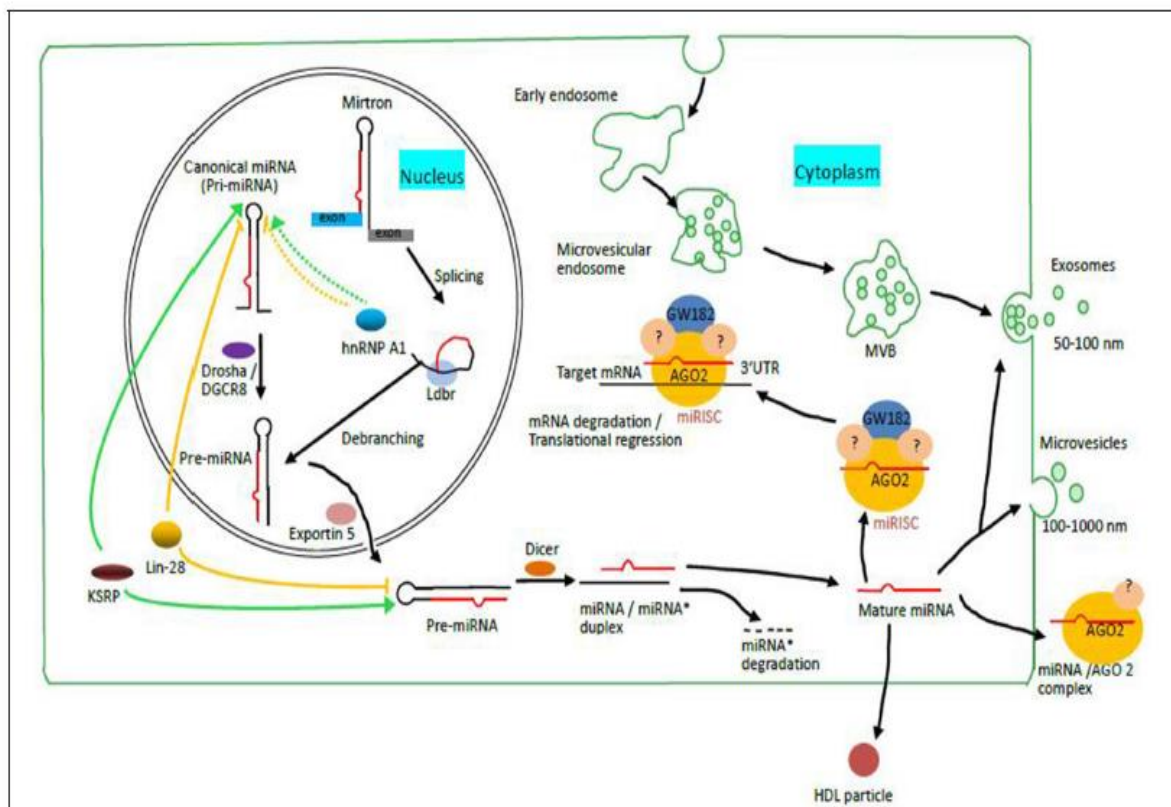


Figura 4. Mecanismos de acción de miRNAs. Tomado de Hou, *et al.* 2016. *Frontiers in genetics*.

Los miRNAs también pueden existir de manera extracelular asociados a proteínas como Ago2 o a partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) que evitan su degradación en circulación, así como también dentro de microvesículas o exosomas (Figura 4), lo que los hace tener funciones similares a las vistas a nivel intracelular, pero en diferente tipo celular del que fueron liberados. Esta facultad de poderse encontrar en circulación ha permitido

usar a los miRNAs como biomacadores de diagnóstico para diversas enfermedades como el cáncer [41].

3.3 Regulación transcripcional y post-transcripcional de miRNAs

Existen diversos mecanismos que regulan la expresión de un miRNA, desde la inducida por factores transcripcionales como es el caso de p53 que activa transcripcionalmente a miR-34a/b/c y de NF- κ B que activa a miR-146a hasta la unión de proteínas a los pri-miRNAs promoviendo de esta manera su maduración [47].

Otro nivel de regulación que afecta la transcripción de los miRNAs es por mecanismos epigenéticos, esencialmente por la metilación del DNA y modificaciones de histonas como la acetilación, como en el caso de miR-217, un miRNA que se expresa en células normales, pero no en células de cáncer y cuya expresión se ve considerablemente aumentada en células cancerosas cuando son tratadas con inhibidores de metilación [48].

Una vez que un miRNA es producido, puede sufrir algunas modificaciones como la uridilación, que ha sido asociada a una regulación negativa, una mono-uridilación inhibe su procesamiento y una poli-uridilación promueve su degradación; la adenilación ha mostrado tener tanto efectos positivos y negativos [49].

Cerca del 20% de los miRNAs primarios en humanos son sujetos a edición, lo que se refiere a que un residuo de adenosina es editado por un residuo de inosina por la Deaminasa de adenosinas que actúa en RNA (ADAR, por sus siglas en inglés) lo cual provoca bloqueo del procesamiento del pri-miRNA y su subsecuente acumulación [50]. Aunado a lo anterior, los miRNAs pueden ser secuestrados por otros tipos de RNAs no codificantes como los RNAs circulares (circRNA, por sus siglas en inglés) [51] y los competidores endógenos de RNAs (ceRNAs, por sus siglas en inglés) que funcionan como esponjas atrapando a los miRNAs para impedir su unión con sus RNA mensajeros blanco.

3.4 Papel de miRNAs en el desarrollo de enfermedades pulmonares

Existe un gran cuerpo de literatura que sugiere que hay expresión anómala de miRNAs específicos en patologías pulmonares. Por ejemplo, el cáncer de pulmón es quizá la enfermedad pulmonar en la que se ha estudiado más el perfil de expresión de miRNAs, de donde se ha obtenido mucha información que demuestra su expresión aberrante, como la disminución de la familia de let-7 que tiene gran impacto en procesos como proliferación celular, migración, apoptosis y angiogénesis en esta patología [52]. En asma, se ha reportado que la

sobre-expresión de miR-21 contribuye al proceso inflamatorio y la supresión de interleucina 12 (IL-12) teniendo así una respuesta Th2 que favorece la hipersensibilidad de vías áreas [53]. En enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), se reportó que la baja expresión de miR-452 está asociada con una mayor expresión de la metalopeptidasa de matriz 12 (MMP-12), un importante efector en enfermedades relacionadas con el tabaquismo [54].

3.5 miRNAs en el proceso fibrótico

En el campo de la fibrosis pulmonar, el miR-21 es de los miRNAs más estudiados tanto en modelos murinos como en pacientes con FPI y se ha demostrado que su sobre-expresión es inducida por TGF- β y es responsable de la activación de fibroblastos debido a que regula negativamente a una Smad inhibitoria, la Smad7 y se ha catalogado como un biomarcador de la enfermedad. En FPI también se ha identificado que miR-154 modula a la vía de WNT/ β -catenina para favorecer la proliferación y migración de fibroblastos [55-56]. Let-7d es un miRNA que en modelos de fibrosis pulmonar se encuentra disminuido y ha mostrado tener funciones anti-fibróticas, pues tiene como blancos a TGF- β y SMAD3 por lo que regula negativamente la EMT [57].

Otro miRNA implicado en la fibrosis es el miR-34a que tiene funciones pro y anti-fibróticas en el pulmón. Por un lado, la sobre-expresión de miR-34a en células epiteliales promueve fibrosis en ratones envejecidos, mientras que otro reporte demuestra que miR-34a tiene un efecto protector al desarrollo de fibrosis pulmonar en ratones ya que promueve sensibilidad a la apoptosis y disminuye la senescencia de fibroblastos pulmonares [58], lo que sugiere que su función depende del tipo de célula en el que se exprese y el contexto biológico en el que se estudie.

La familia de miR-29 es ampliamente conocida por tener funciones anti-fibróticas, se encuentra disminuido en FPI porque es regulado negativamente por TGF- β vía SMAD3 [59], se ha demostrado que disminuye expresión de colágenas y otras proteínas de ECM [60].

4. miR-487b

El miR-487b inicialmente fue descrito como biomarcador para el diagnóstico de cáncer y como marcador pronóstico para neuroblastoma [61]. Está ubicado en el cromosoma 14 dentro de un cluster conocido como 14q32.31 en el cual se localizan 54 miRNAs que inicialmente se describieron como supresores de tumores pues se encontraron disminuidos en glioblastoma [62]. Este cluster se encuentra dentro de la región genómica con impronta conocida como

DLK1-DIO3; el cluster 14q32.31 se divide a su vez en dos clusters: 14A y 14B, los cuales están separados por un cluster de RNAs nucleolares pequeños (snoRNAs, por sus siglas en inglés) de caja C/D [63] (Figura 5A).

Para el caso del miR-487b existen dos formas diferentes de acuerdo a la cadena de la cuales provienen, teniendo que el 5p proviene del brazo 5' del precursor y el 3p proviene del brazo 3' del precursor (Figura 5B).

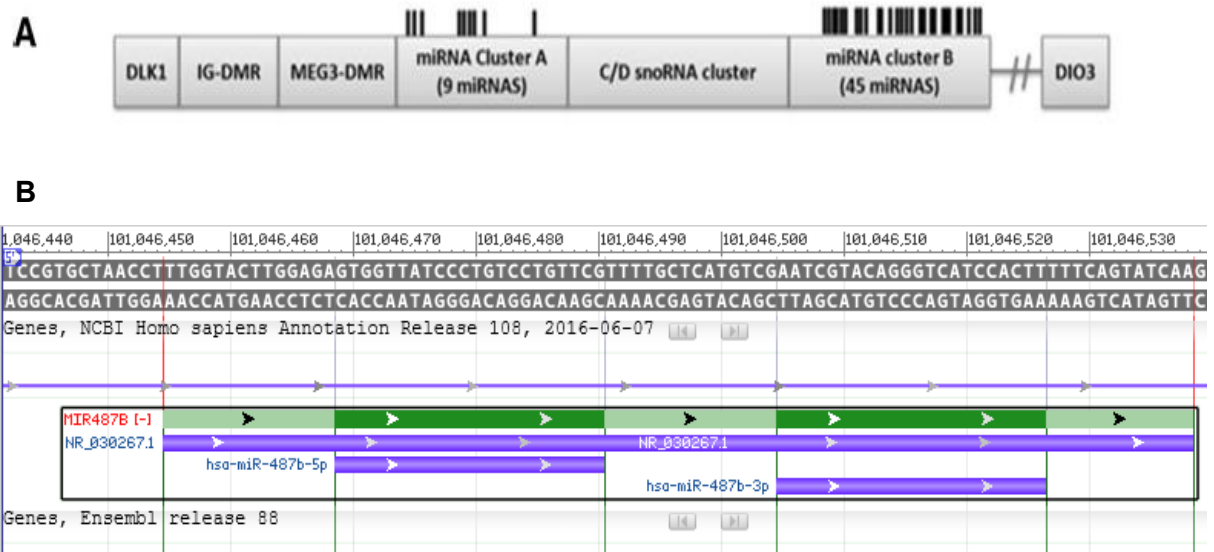


Figura 5. Localización genómica de miR-487b. **A)** Esquema de la localización genómica del cluster 14q32.31 dentro de la región improntada DLK1-DIO3. Tomado de Shahar, et al. (2016). *J Neurooncol.* **B)** Gráfico de la localización de las dos variantes de miR-487b dentro de su locus genómico.

4.1 Papel fisiológico y patológico de miR-487b

Existen pocos estudios a cerca de las funciones de miR-487b y los resultados indican que este miRNA tiene funciones duales. Por una parte, se ha demostrado que miR-487b promueve la proliferación, la migración de células endoteliales y participa en formación de vasos sanguíneos a través de regular negativamente a Trombospondina 1, lo que lo convierte en un miRNA con una función vital en personas con choque isquémico [64]. Así mismo, el miR-487b y otros miRNAs funcionan en condiciones normales como reguladores negativos de la diferenciación a músculo esquelético en mioblastos murinos [65], asegurando de esta manera que los mioblastos se diferencien en el linaje celular correcto.

El cambio de expresión de miR-487b en condiciones patológicas también ha sido demostrado desde que se reportó que miembros de la familia de miR-487b pueden tener funciones similares a un oncogen. Bajo este contexto, se ha demostrado que miR-487b y algunos miRNAs

localizados en su cluster 14q32 pueden promover la EMT inducida por TGF- β en un modelo *in vitro* de células pulmonares tumorales [66]. Estudios proponen a miR-487b-5p como biomarcador en adenocarcinoma pulmonar debido a que incrementa la resistencia a temozolomida, la proliferación y migración inducida por disminución de LAMP2, un receptor de autofagia mediada por chaperona [67].

Existen estudios que demuestran que miR-487b también puede tener funciones de supresor de tumor, debido a que regula negativamente algunos “sellos” del cáncer en células metastásicas de próstata [68]; regula negativamente la metástasis en carcinoma de hígado dependiente de KRAS y LRP6 [69], inhibe el proceso tumoral en cáncer de colon mediado por el eje GRM3/TGF- β [70] y regula negativamente la formación de colonias en agar en células de gliomas pediátricos de bajo grado [71].

En un estudio hecho por Xi, et al [72] se encontró que miR-487b está disminuido en líneas tumorales pulmonares por un proceso de hipermetilación de su locus genómico inducido por humo de cigarro. La disminución de miR-487b, correlaciona con la sobre-expresión de algunas de sus proteínas blanco como SUZ12, BMI-1 y WNT5A, las cuales están involucradas en el aumento de proliferación e invasión celular por lo que miR-487b podría ser considerado como un supresor de tumores en pulmón.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La NH es una enfermedad compleja y los trabajos encaminados al estudio de los mecanismos celulares y moleculares implicados en su desarrollo y progresión son escasos. La expresión alterada de miRNAs en fibroblastos pudiera estar íntimamente ligada al proceso fibrótico de la enfermedad; sin embargo, no existen reportes que ayuden a descifrar la función de estas moléculas. Por ello, es prioritario comenzar a explorar el perfil de expresión de miRNAs en esta enfermedad con el fin de determinar en qué mecanismos celulares y moleculares están involucrados. En este sentido, es importante estudiar si la inhibición o la sobre-expresión de miR-487b en fibroblastos de pulmón altera procesos como la migración y proliferación, que son vitales para el desarrollo de una respuesta fibrótica en el pulmón.

Debido a que no existen reportes acerca del papel que tienen los miRNAs en NH, en nuestro laboratorio se realizó un experimento piloto para explorar el perfil de expresión de 752 miRNAs en 4 líneas de fibroblastos derivados de pacientes con NH y 3 líneas de fibroblastos normales. En este estudio se decidió trabajar con miR-487b ya que en el estudio piloto encontramos que este miRNA está disminuido en fibroblastos con NH (0.0062 ± 0.0010) respecto a fibroblastos

normales (0.0138 ± 0.0041) y hay reportes de que la inhibición de miR-487 favorece la proliferación y migración (Figura 6).

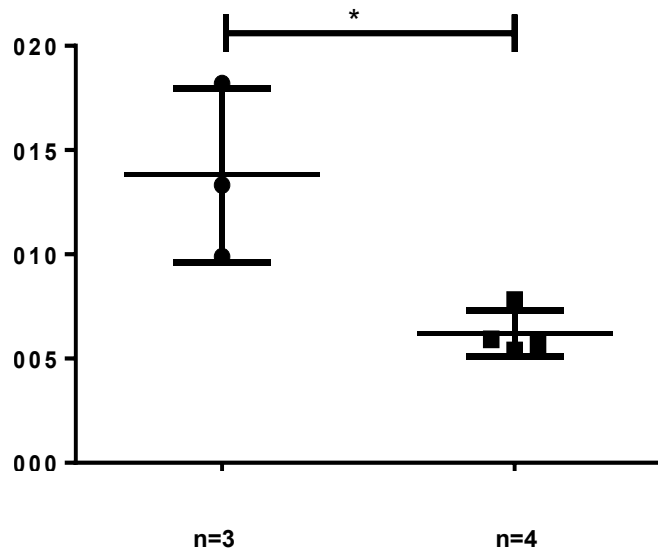


Figura 6. Expresión basal de miR-487b en fibroblastos normales y fibroblastos derivados con NH obtenidos en el análisis de perfil de expresión por qPCR. La expresión fue calculada usando el método de $2^{-\Delta Ct}$. * $p \leq 0.05$ por U de Mann-Whitney.

HIPÓTESIS

La sobre-expresión de miR-487b disminuirá la proliferación y migración de fibroblastos mientras que su inhibición incrementará estos procesos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel de miR-487b en la proliferación y migración de fibroblastos de pulmón derivados de pacientes con NH y donadores sin antecedentes de enfermedad pulmonar (normales).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar los niveles basales de miR-487b en fibroblastos de pacientes con NH y fibroblastos normales.
- Analizar la expresión de algunas proteínas blanco de miR-487b (BMI-1, SUZ12, WNT5A y SMAC/DIABLO).
- Sobre-expresar y silenciar a miR-487b en fibroblastos pulmonares y analizar su efecto en:
 - Expresión de proteínas blancos
 - Proliferación
 - Migración
 - Apoptosis

METODOLOGÍA

1. Cultivo de fibroblastos

Se utilizaron fibroblastos primarios de pulmón de un banco de células preexistente en el Laboratorio de Biología Celular del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias que previamente fueron obtenidos de biopsias de pacientes diagnosticados con NH y de donadores sin antecedentes de enfermedad pulmonar, estos últimos fueron etiquetados como fibroblastos normales. Todos los fibroblastos fueron descongelados entre el pasaje 4-5 y se mantuvieron en cultivo con medio F12 (Gibco, Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB) (Gibco, Life Technologies) y una mezcla de antibiótico/antimicótico (penicilina, anfotericina y ampicilina) (Sigma-Aldrich) en cajas de 25 cm² (Corning, Costar) en una incubadora con una atmosfera húmeda a 37°C con 5% de CO₂ hasta su uso en experimentos posteriores. Para propagar los cultivos, las células se cosecharon con tripsina/EDTA cuando se alcanzaba una confluencia entre 80-90% y se sembraron en una relación 1:2. Los experimentos se hicieron con células entre los pasajes 6-10. Las líneas de fibroblastos normales y de NH fueron pareadas por edad.

2. Transfección de fibroblastos.

Para analizar el efecto de la inhibición o la sobreexpresión del miR-487b en los fibroblastos, las células se sembraron a 75% de confluencia en cajas de 6, 12, 24 y 48 pozos dependiendo del ensayo. Previo a los experimentos, las condiciones de transfección se optimizaron utilizando diferentes concentraciones del lípido y del mimetizador o inhibidor de modo que la eficiencia de transfección fuera mayor del 80% y la viabilidad de las células fuera mayor a 50%.

Brevemente, las células fueron transfectadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante en medio Opti-MEM (Gibco) libre de antibiótico y con el lípido catiónico DharmaFECT (Dharmacon, GE LifeSciences) a una concentración de 0.05µg/ml. Para inhibir a miR-487 se utilizó un RNA sintético de una cadena miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor a una concentración de 12.5nM y para sobreexpresarlo se usó una molécula de RNA de doble cadena miRIDIAN microRNA mimics a una concentración de 12.5 nM, ambos de Dharmacon, GE Lifesciences. Después de 24 horas con la mezcla de transfección, el medio fue remplazado con F12 al 10% de SFB. Después de 48 horas de haber sido transfectadas, las células se lisaron con Trizol o con buffer RIPA. Como control se utilizó la secuencia de cel-miR-67 (Dharmacon) por no tener una secuencia blanco en el genoma humano.

3. Extracción de RNA y miRNAs

El mRNA se obtuvo lisando a los fibroblastos con el reactivo Trizol (Applied Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante y la fracción enriquecida de miRNAs de los fibroblastos fueron obtenidos por medio de columnas con el kit de extracción MicroRNA Purification Kit (Norgen Biotek) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras se eluyeron en 25µl de agua libre de RNAsas y se almacenaron a -70°C hasta su uso. El material obtenido se cuantificó y se evaluó que su relación 260/280 fuera mayor o igual a 1.7 con un nanodrop (ThermoScientific). La fracción enriquecida de RNAs pequeños (menor a 200nt) se analizó en un Bioanalyzer 2100 (Agilent) por medio de un chip para pequeños RNAs (Agilent Small RNA kit).

4. qPCR del miR-487b

Para cuantificar la expresión basal del miR487b, se utilizaron siete líneas primarias de fibroblastos de FPI, seis de NH y seis normales. Las células (8×10^5) se sembraron por duplicado en cajas de 12 pozos en medio F12 con suero y después de 12 horas se hizo la extracción de miRNAs como se describió en el párrafo anterior. Se sintetizó cDNA a partir de 200ng de la fracción enriquecida de miRNAs de cada línea de fibroblastos utilizando el kit para miRNAs First Strand cDNA Synthesis Kit (Origene) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La expresión del miR-487b fue analizada por PCR en tiempo real con primers específicos contra la forma madura del miRNA (origene) y una mezcla de reacción que contenía Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) y 10 ng de cDNA en un volumen de 15 µl, utilizando un bloque de 384 pozos en un termociclador LightCycler480 (Roche). Los niveles de expresión relativa de miR-487b fueron obtenidos con la fórmula $2^{-\Delta Ct}$. Para analizar la expresión del miR487b, se determinó el RNA no codificante de referencia que mejor se ajustaba a nuestro modelo. Para este fin se hizo un análisis preliminar donde se realizó una PCR con todas las muestras para miR-487 junto con los RNAs no codificantes U6, SNORD38b y 5S. Los datos de este primer experimento se analizaron con el software Bestkeeper V.1. Para el análisis de expresión, los experimentos se hicieron tres veces por triplicado.

5. Western Blot

Para analizar la expresión de proteínas se obtuvieron lisados totales de fibroblastos creciendo en medio completo (Basal) y de fibroblastos 48 horas después de haber sido transfectados con el inhibidor o el mimetizador. Las células se sembraron en cajas de 6 pozos y cuando se alcanzó el 75% de confluencia se lavaron con PBS frío y se lisaron con 100 μ l de buffer RIPA (ThermoScientific) con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma). La cantidad de proteína se cuantificó con el reactivo de Bradford, se cargaron 30 μ g ó 20 μ g de proteína por pozo y se corrieron en geles de poliacrilamida al 10%. La transferencia se hizo en cámara húmeda en membranas de PVDF y se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios contra SUZ12 (Abcam), BMI-1 (Invitrogen), WNT5A (Thermo Scientific), SMAC/DIABLO (R&D), Caspasa 3 (EMC Biosciences) y GAPDH (Thermo Scientific) que se utilizó como control de carga. Después de lavar las membranas con PBS-Tween 20 al 0.05%, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios rabbit-anti-Mouse-HRP ó goat-anti-Rabbit-HRP (Amersham). Para visualizar las bandas, las membranas se incubaron con Luminol y la reacción fue visualizada con quimioluminiscencia en un fotodocumentador (ChemiDoc-XRS, Bio-rad). Las imágenes fueron analizadas por densitometría en el software Image J.

6. qPCR de BMI-1

Fibroblastos sembrados en cajas de 12 pozos fueron transfectados con el mimetizador y el inhibidor del miR-487b. Después de 48 horas se lisaron con el reactivo de TRIzol (Thermo Fisher Scientific). Se sintetizó cDNA a partir de 1 μ g de RNA total utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1621 (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. La expresión de BMI-1 fue analizada por qPCR en ensayos con sondas TaqMan (Applied Biosystems) en mezclas de reacción de 10 μ l en placas de 384 pozos que contenían 20 ng de cDNA. HPRT fue utilizado como gen de referencia y los datos de expresión para BMI-1 fueron obtenidos con la fórmula $2^{-\Delta Ct}$. Los experimentos se repitieron 2 veces por triplicado.

7. Ensayos de migración

Para evaluar el efecto de la inhibición y la sobre-expresión del miR-487b sobre la migración celular, fibroblastos (2×10^5) creciendo en medio completo (Basal) o transfectados se sembraron en cajas de 48 pozos a las que previamente se les colocó un inserto circular de

aproximadamente 1 mm de diámetro hecho de PDMS (Polidimetilsiloxano). Después de 24 horas el inserto fue retirado y el medio se sustituyó con medio F12 con suero al 10% y se tomaron fotos del progreso del cierre de herida en un microscopio invertido a las 24 y 48 horas. El porcentaje de extensión de herida fue calculado con el software Image J. Estos experimentos se hicieron 3 veces por duplicado.

Adicionalmente, se realizó un ensayo tipo cámara de Boyden en donde los fibroblastos fueron sembrados en la parte superior de insertos Transwell con una membrana de policarbonato (CytoSelect™ 96-Well Cell Migration Assay; 5 µm Fluorometric Format, Cell Biolabs, CA) en 100µl de medio F12 libre de suero y con 5% de Albúmina y se colocaron inmediatamente en la placa de 96 pozos que contenía 150µl de medio F12 suplementado con 10% de SFB que sirve como agente inductor de migración. Después de 6 horas las células que migraron se disociaron de la membrana de policarbonato, se lisaron y se cuantificaron utilizando el reactivo CyQuant siguiendo las instrucciones del fabricante. Este experimento se realizó solo una vez por triplicado.

8. Ensayo de tasa de crecimiento y proliferación

El crecimiento celular fue analizado por el metabolismo del reactivo WST-1 (Roche, Applied Science) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fibroblastos (6×10^3) se sembraron por triplicado para cada condición experimental en placas de 96 pozos en un volumen final de 100 µl y se mantuvieron creciendo en medio F12 con SFB al 10% por 24, 48 y 72 horas. Transcurrido el tiempo, a cada pozo se le agregaron 10µl del reactivo WST-1 en 100µl de F12 con 2% de SFB y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Synergy HT, Biotek). Para este ensayo se realizaron dos experimentos independientes por triplicado.

Para el ensayo de proliferación, las células se sembraron de la misma manera que para el ensayo con WST-1 pero en este caso cuando se concluyeron los tiempos de análisis de 24, 48 y 72 horas, los pozos donde se encontraban las células se lavaron 2 veces con PBS y las placas se congelaron a -80°C por un lapso no mayor a 5 días. La proliferación se analizó utilizando el kit de proliferación celular CyQuant (ThermoScientific) que utiliza un reactivo fluorescente que se incorpora al DNA siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente a cada pozo se agregaron 200µl del reactivo CyQuant y se incubó en agitación por 20 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Los 200µl de solución fueron transferidos a una microplaca para fluorescencia 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 triplicado y se repitieron dos veces.

9. Detección de apoptosis

La apoptosis en los fibroblastos fue analizada midiendo la expresión de caspasa 3 por western blot como previamente se describió y por citometría de flujo. Para esta última, los fibroblastos se sembraron en placas de 12 pozos a una confluencia de 4×10^4 células/cm². Las células se transfectaron por 24hrs como previamente ya se describió y se reemplazó el medio con F12 al 10% son SFB por 24 horas más. Después de este tiempo, los fibroblastos se despegaron con tripsina/EDTA y junto con el medio de cultivo se centrifugaron a 2,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se eliminó y el pellet se resuspendió en 100µl de buffer de Anexina V (BD pharmigen). Las células se tiñeron con 2µl de Anexina V y/o 2µl de 7-AAD, según fuera el caso; se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y trascurrido este tiempo las células se adquirieron en un clitómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciencias) 15,000 células para cada tubo. El ensayo se repitió dos veces por duplicado. En todos los ensayos se utilizaron como controles de compensación células tratadas con tritón al 0.01% como 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 Flow jo (V 10).

10. Análisis estadístico

A cada conjunto de resultados obtenidos se les aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk; si los datos se distribuyeron normalmente se compararon con una T de student y si no pasaban la prueba de normalidad se analizaron con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Para comparaciones múltiples se utilizó una ANOVA de dos vías usando la prueba de Holm-Sidak. Se consideraron diferencias significativas los valores de $p < 0.05$. Este análisis se realizó en el programa Graph Pad Prism V.6.

RESULTADOS

Expresión basal de miR-487b

Antes de hacer la PCR para analizar la expresión basal de miR-487b, las muestras de la fracción enriquecida de miRNAs se analizaron en un equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent). La gráfica 2 ilustra los resultados representativos en donde se observa que en todos los casos se logró obtener una fracción enriquecida de RNAs pequeños < 200 pb (eje X) y aunque la cantidad de RNA entre las muestras (dado por la altura de picos en el eje Y) es diferente, no se encontraron diferencias en el porcentaje obtenido de miRNAs entre las muestras analizadas, que osciló entre 10 y 15% (Figura 7).

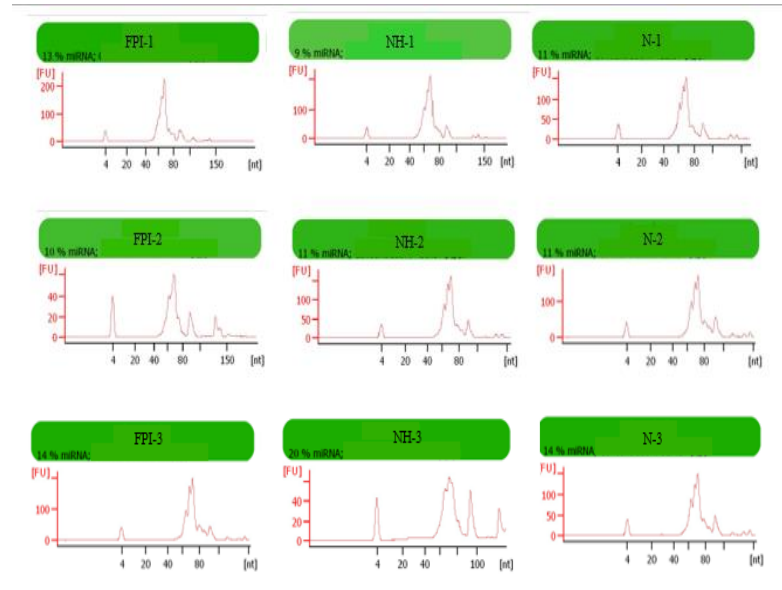


Figura 7. Representación gráfica del bioanálisis del RNA de 9 muestras de fibroblastos. En el eje “X” se indica la longitud de los RNA en nucleótidos y en el eje “Y” la cantidad en unidades de fluorescencia.

Para cuantificar la expresión basal del miR-487b en los fibroblastos, primero se determinó el endógeno de referencia que mejor se ajustaba a nuestras muestras. Con ayuda del software Bestkeeper V.1 se encontró que de los tres probables endógenos de referencia (SNORD38b, U6 y 5S) que se utilizaron, U6 es el que tiene mejor coeficiente de correlación entre las muestras ($r=0.97$) y aunque el 5S aparentemente tiene mayor poder para ser usado como gen de referencia (2.14), su coeficiente de correlación y coeficiente de determinación son más bajos, además que fue descartado debido a que presentó una alta variación inicial (Desviación estándar ≥ 1) entre las líneas celulares (datos no mostrados), lo cual indica que U6

es el mejor endógeno para normalizar los datos de expresión por qPCR debido a que la variación dentro las muestras analizadas fue la más pequeña (Tabla 2).

Regression Analysis: HKG vs. BestKeeper			
	SNORD38b	U6	5S
	HKG 1	HKG 2	HKG 3
	vs.	vs.	vs.
	BK	BK	BK
coeff. of corr. [r]	0,84	0,97	0,94
coeff. of det. [r ²]	0,71	0,95	0,88
intercept [CP]	10,53	0,60	-7,22
slope [CP]	0,70	1,08	1,10
SE [CP]	±0,547	±0,313	±0,491
p-value	0,001	0,001	0,001
Power of HKG [x-fold]	1,62	2,12	2,14

Tabla 2. Análisis de regresión entre SNORD38b, U6, 5S y el índice Bestkeeper

La figura 8 muestra el resultado del análisis de expresión del miR-487b en 6 líneas de fibroblastos derivados de NH, 6 líneas de normales y 7 líneas de pacientes con FPI; éstas últimas fueron incluidas con el objetivo de comparar con otra patología pulmonar que involucra al intersticio pulmonar, pero con mecanismos patogénicos diferentes. Los resultados muestran que miR-487b se encuentra disminuido en fibroblastos de pacientes con NH (0.2180 ± 0.1961) y FPI (0.4244 ± 0.5472) en comparación con fibroblastos normales (1.683 ± 1.854), siendo más robusta la diferencia en fibroblastos de NH ($p < 0.01$) que en fibroblastos de FPI ($p < 0.05$). No se observaron diferencias de expresión del miR-487b entre fibroblastos alveolíticos y fibróticos.

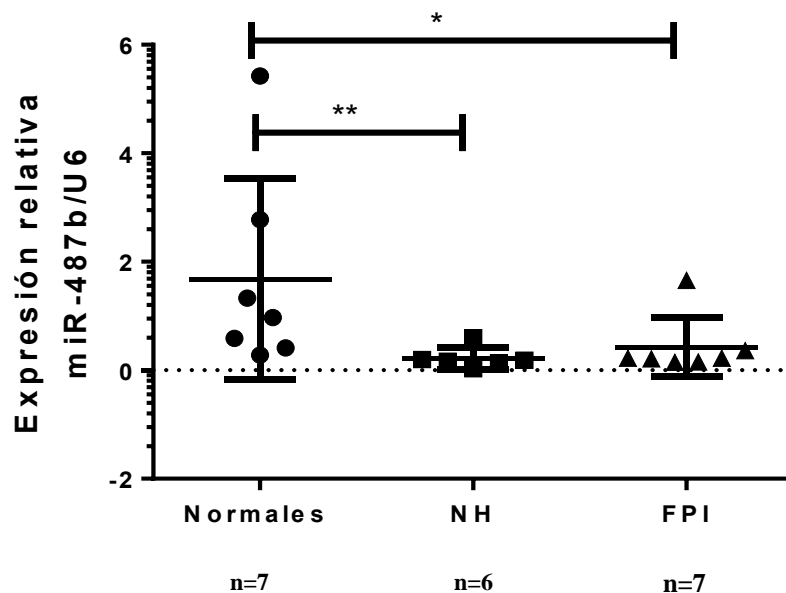


Figura 8. Expresión basal del miR-487b en fibroblastos primarios. Se muestra mediana con rangos intercuartiles. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ por U de Mann-Whitney

Expresión basal de proteínas blanco de miR-487b

Para determinar si la baja expresión de miR-487b correlaciona con un aumento en la presencia de sus proteínas blanco, se analizó por western blot la presencia o ausencia de tres proteínas blanco validadas: BMI-1, SUZ12 y WNT5A; además de SMAC/DIABLO, una proteína blanco predicha en tres bases de datos (Qiagen, Exiqon V3.0 y MiRanda). El análisis se hizo en 2 líneas de fibroblastos normales que tuvieron los niveles más altos de expresión de miR-487b en el ensayo de qPCR y en 2 líneas de fibroblastos de NH que mostraron los niveles más bajos de expresión.

De las 4 proteínas analizadas, sólo BMI-1, SUZ12 y SMAC/DIABLO presentan una mayor expresión basal en fibroblastos de NH comparado con fibroblastos normales (Figura 9A); por otro lado, no se observaron diferencias en la expresión de WNT5A entre fibroblastos de NH y fibroblastos normales (Figura 9B).

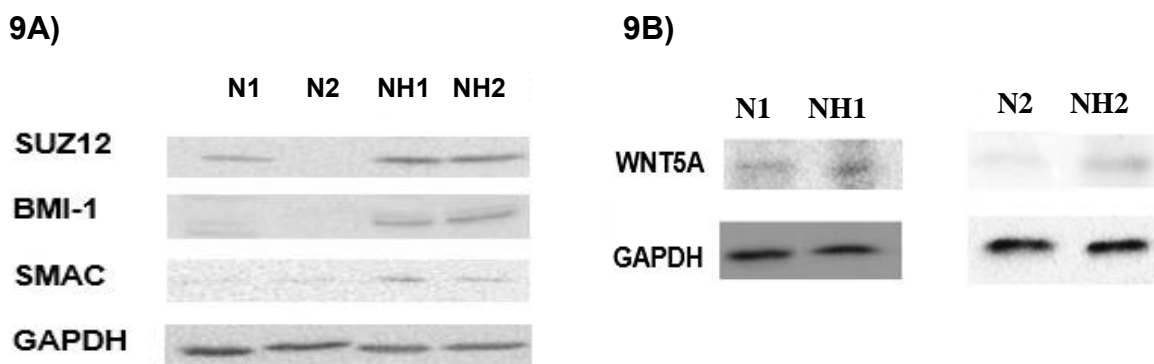
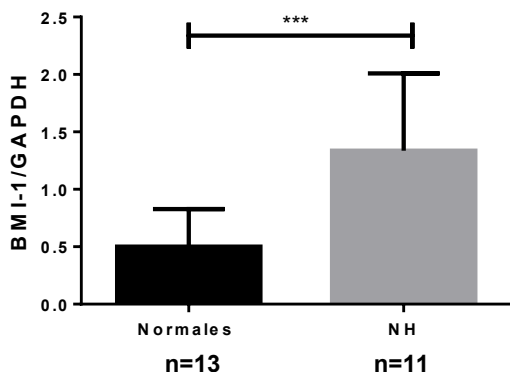


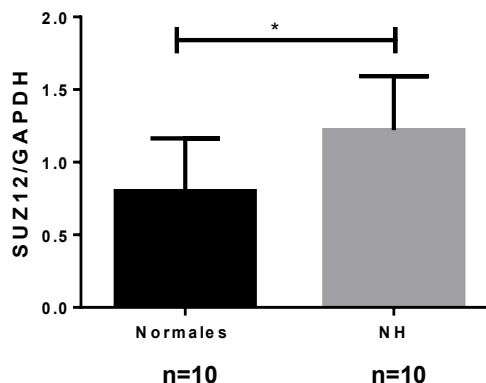
Figura 9. A) Expresión basal de SUZ12, BMI-1 y SMAC en fibroblastos normales y fibroblastos con NH. B) Expresión basal de WNT5A en fibroblastos normales y fibroblastos con NH. Resultados representativos de al menos tres experimentos independientes.

El análisis de densitometría de al menos tres experimentos independientes se muestra en la figura 10. Los resultados de este análisis muestran que en condiciones basales los fibroblastos de NH tienen significativamente más cantidad de las proteínas BMI-1 (1.137 ± 0.6713) ($p < 0.001$) (Figura 10A), SUZ12 (1.220 ± 0.3717) ($p < 0.05$) (Figura 10B) y SMAC/DIABLO (0.7708 ± 0.2705) ($p < 0.05$) (Figura 10C) en comparación con fibroblastos normales [BMI-1 (0.5018 ± 0.3256), SUZ12 (0.8013 ± 0.3633) y SMAC/DIABLO (0.4389 ± 0.1357)]. En el caso de WNT5A, aunque se observa una tendencia que podría indicar una mayor expresión en fibroblastos de NH (0.6569 ± 0.4047), el análisis no mostró diferencias significativas respecto a fibroblastos normales (0.3372 ± 0.1705) (Figura 10D).

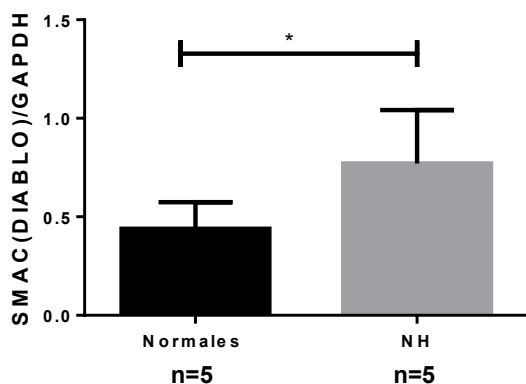
10A)



10B)



10C)



10D)

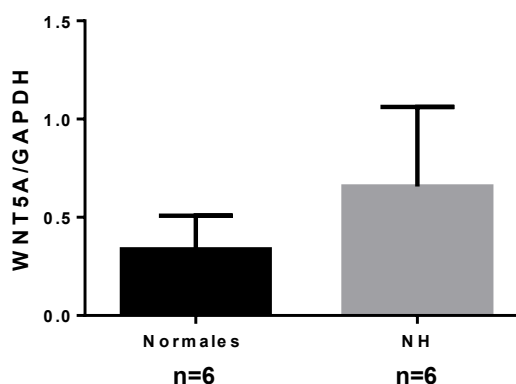


Figura 10. Análisis densitométrico de la expresión basal de A) BMI-1, B) SUZ12, C) SMAC/DIABLO y D) WNT5A en fibroblastos. Los datos están representados como la media \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ por U de Mann-Whitney.

Expresión basal de BMI-1

Del análisis por western blot se observó que la proteína BMI-1 siempre fue la más contundente debido a que en todos los experimentos prácticamente no se detectó en los fibroblastos de NH y entonces se decidió cuantificar la expresión del mensajero de esta proteína por qPCR.

El análisis reveló que los fibroblastos de NH (4.050 ± 0.3978) tienen prácticamente 2 veces más expresión del mRNA de BMI-1 en comparación con los normales (2.042 ± 0.3654), siendo ésta una diferencia significativa de $p < 0.01$ (Figura 11).

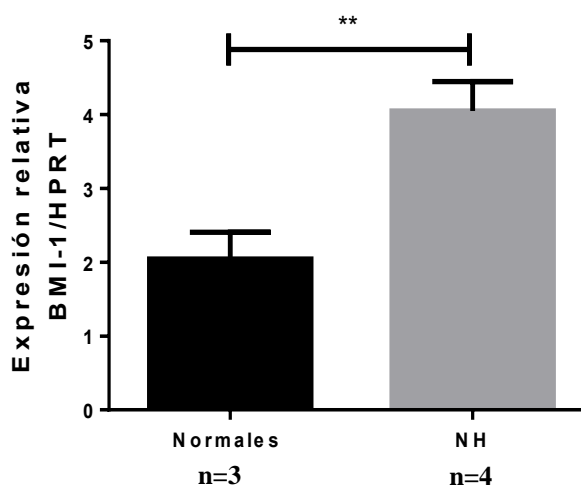


Figura 11. Expresión basal del mensajero de BMI-1. Representativo de dos experimentos independientes realizados por triplicado. ** $p < 0.01$ por U de Mann-Whitney.

Efectos de la sobreexpresión y silenciamiento de miR-487b

Con el fin de establecer si miR-487b modula la traducción de las proteínas blanco analizadas, así como examinar el posible papel que este miRNA pudiera tener en los procesos de migración, proliferación y apoptosis, se hicieron experimentos de ganancia y pérdida del miR-487b. Para lograr este objetivo, los fibroblastos se transfectaron con un mimetizador y con un RNA de horquilla para su inhibición. La eficiencia de transfección se determinó analizando la expresión del miR-487b por qPCR a las 24, 48, 72 y 96 horas. Los resultados mostraron que se logró la sobreexpresión y el silenciamiento de miR-487, ambos con una diferencia significativa $p < 0.001$ (datos no mostrados) y que en ambos casos el efecto de la transfección es consistente hasta las 96 horas por lo cual se decidió hacer los ensayos funcionales hasta un máximo de 72 horas. La transfección con un miRNA de *C. elegans* (cel-miR-67) no produjo cambios en la expresión del miR-487b.

Después de transfectar, la expresión de las proteínas blanco se analizó por western blot. Como se puede observar en la figura 12, en fibroblastos normales el silenciamiento de miR-487b provocó un aumento significativo en la expresión de las proteínas BMI-1 (2.0808 ± 0.8639 ; figura 12A) y SMAC/DIABLO (1.2506 ± 0.1240 ; figura 12C) mientras que SUZ12 (2.10618 ± 1.1205 ; figura 12B) tiende a incrementarse, pero no alcanzó diferencia significativa; así mismo en el caso de WNT5A (1.009 ± 0.1683 ; figura 12D) no se observaron diferencias respecto a la condición control.

En el caso de fibroblastos de NH, se encontró que la sobreexpresión del miR-487b provoca una disminución significativamente en los niveles de las proteínas BMI-1 (0.6759 ± 0.1739 ; figura 12A) y SMAC/DIABLO (0.8598 ± 0.1001 ; figura 12C); en el caso de SUZ12 (1.2843 ± 0.8943 ; figura 12B) y WNT5A (1.2125 ± 0.0594 ; figura 12D) no se observaron diferencias respecto a la condición control. Estos resultados sugieren que miR-487b podría estar modulando post-transcripcionalmente la expresión de BMI-1 y SMAC/DIABLO en fibroblastos pulmonares de NH.

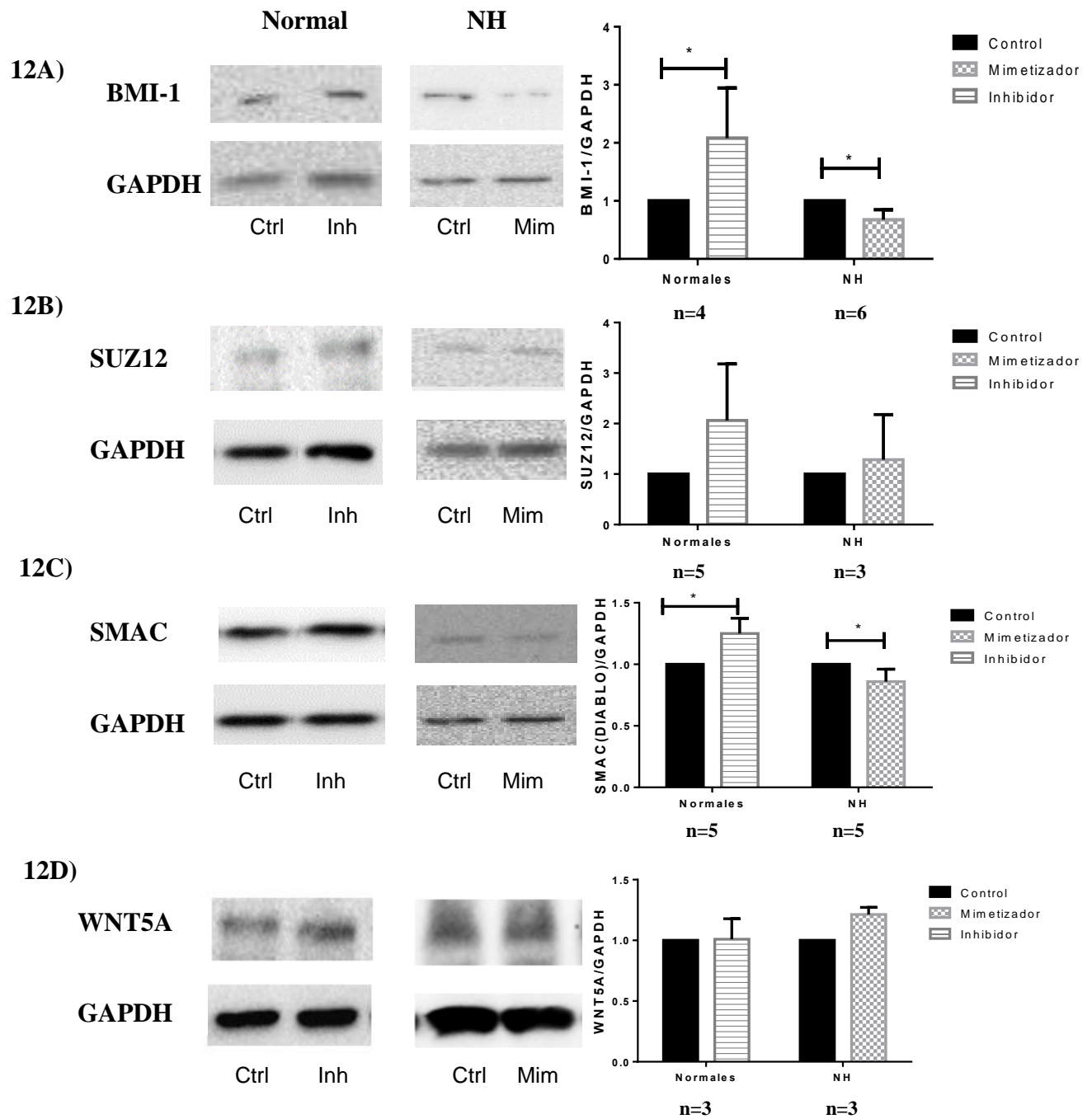


Figura 12. Efecto de la transfección con el mimetizador o inhibidor de miR-487b sobre la expresión de **A) BMI-1, B) SUZ12, C) SMAC/DIABLO y D) WNT5A.** Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes. Ctrl: control, Mim: mimetizador, Inh: Inhibidor. * $p < 0.05$ por U de Mann-Whitney.

Efecto de la transfección de miR-487b sobre el mensajero de BMI-1

Debido a que en condiciones basales la expresión de BMI-1 fue significativamente mayor en fibroblastos de NH, el mRNA de esta proteína fue analizado después de sobre-expresar al miR-487b en fibroblastos de NH o después de silenciarlo en fibroblastos normales. Como se puede observar en la figura 13, la sobreexpresión de miR-487b en fibroblastos de NH disminuye significativamente la expresión de BMI-1 en las tres líneas analizadas (0.6089 ± 0.1833 ; $p < 0.05$) mientras que la inhibición de este miRNA en fibroblastos normales provocó un aumento significativo solo en una de las líneas de fibroblastos normales (1.6239 ± 0.0390 ; $p < 0.05$) (Figura 13).

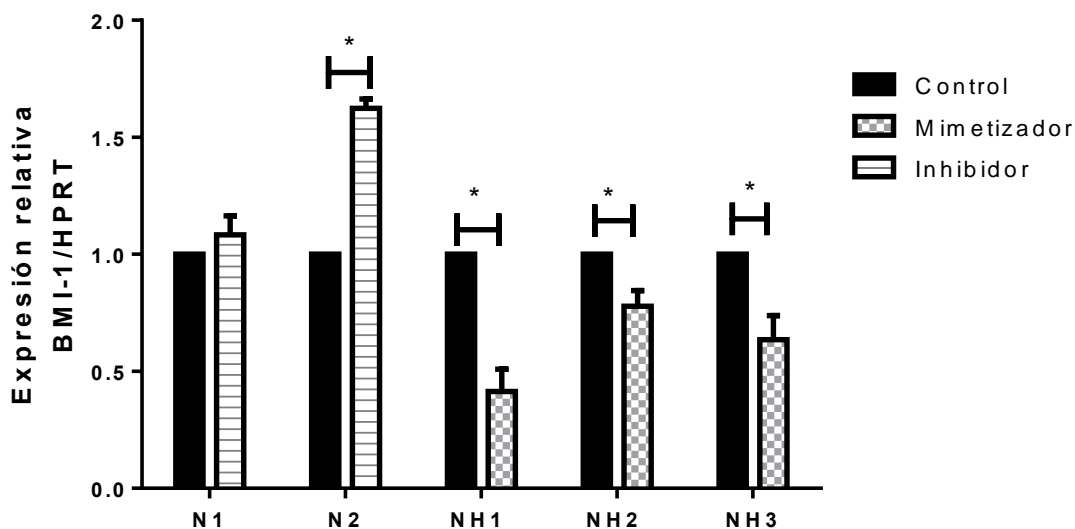


Figura 13. Análisis de expresión de BMI-1 por qPCR después de transfectar con el mimetizador o el inhibidor de miR-487b en fibroblastos normales y con NH. Los resultados se expresan con la media \pm desviación estándar. Los resultados graficados son de dos experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0.05$ por U de Mann-Whitney.

Papel del miR-487b sobre la migración de fibroblastos

El efecto de la pérdida o ganancia del miR-487b sobre la migración de fibroblastos se analizó mediante un ensayo de cierre de herida a 48 horas y/o migración de células en cámaras tipo Boyden a 8 horas.

En primer lugar, se analizó la migración basal de 2 líneas de fibroblastos de NH y una línea normal mediante el ensayo de reparación de herida. Como se puede observar en la figura 14, los fibroblastos de NH tienen una mayor capacidad de migración ya que a las 48 horas

presentan una menor extensión de la herida en comparación con fibroblastos normales ($25.8\% \pm 9.5\%$ en NH vs $58.5\% \pm 13.1\%$ en Normales, $p < 0.01$). Después se procedió a analizar el efecto de la transfección en 2 líneas normales y 2 de NH (Figura 15).

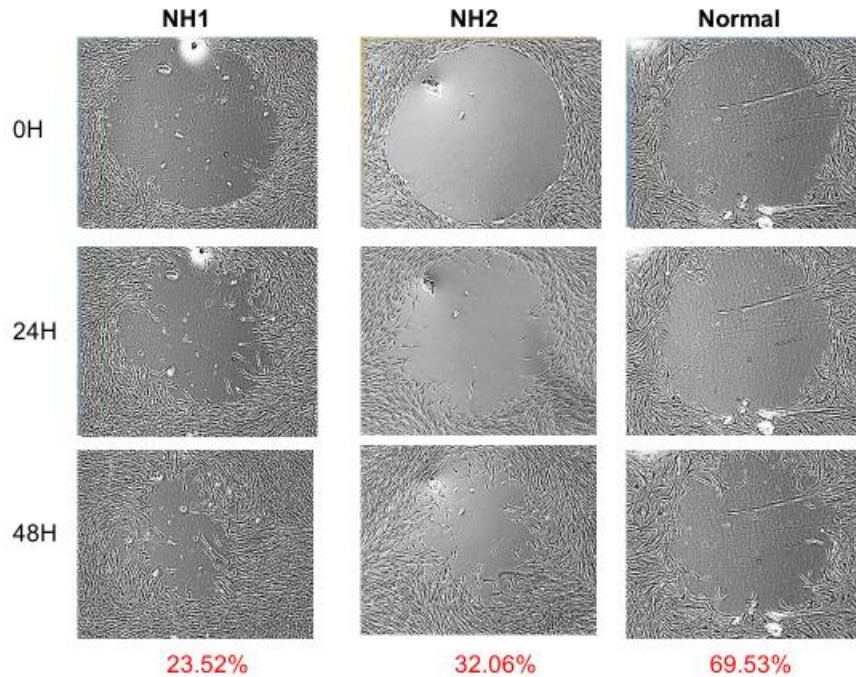


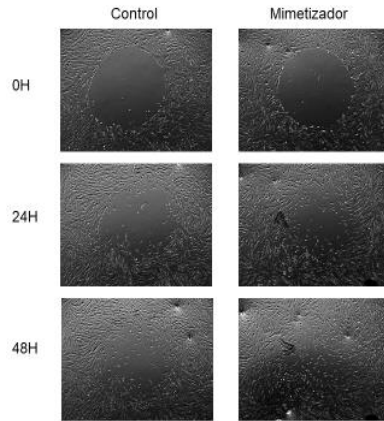
Figura 14. Migración basal de fibroblastos pulmonares primarios. En rojo se muestran los porcentajes de extensión de herida calculados mediante el software Image J.

El ensayo de cierre de herida mostró que la sobre-expresión del miR-487b en fibroblastos de NH induce un aumento en la migración celular y se puede observar que a las 48 horas la extensión de la herida es menor en las células con el mimetizador en comparación con su control (Figura 15A). El análisis de los datos de tres experimentos independientes muestra que el porcentaje de herida con el mimetizador es significativamente menor en comparación con su control ($12.6\% \pm 3\%$ vs $48\% \pm 5\%$, respectivamente ; $p < 0,01$; figura 15C).

Por otra parte, en este mismo ensayo, se observó que la inhibición del miR-487b en fibroblastos normales disminuye la migración celular (figura 15B) y el análisis muestra que las células a las que se les inhibe el miRNA tienen una mayor extensión de la herida ($60\% \pm 2\%$ con el inhibidor vs $48 \pm 5\%$ en el control, $p < 0,05$; figura 15D).

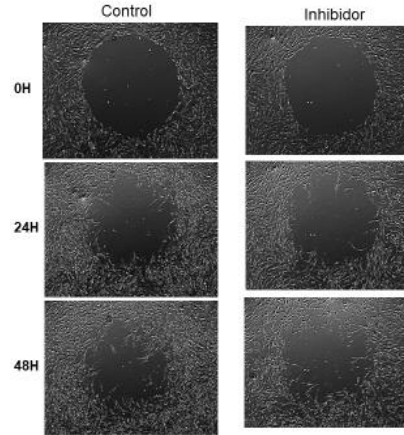
15A)

Línea alveolítica



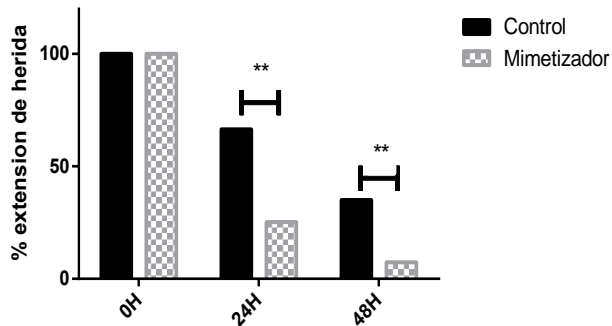
15B)

Línea normal



15C)

Línea alveolítica



15D)

Línea normal

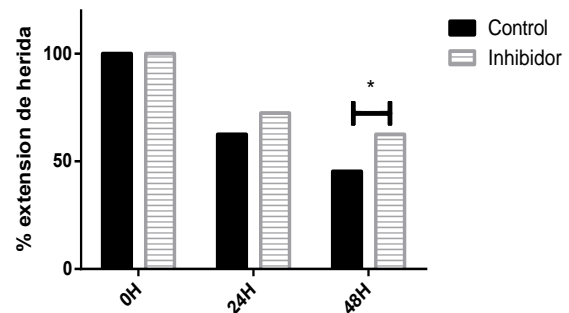


Figura 15. Efecto de miR-487b sobre la migración celular de una línea de **A)** fibroblastos de NH y **B)** una línea de fibroblastos control después de 48 horas post-ransfección con el mimetizador o inhibidor de miR-487b. Se muestran las gráficas representativas de la migración de la **C)** línea de NH y **D)** una línea control. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ por U de Mann-Whitney.

Además del ensayo de reparación de herida, se realizó un ensayo de migración en pozos Transwell (Cámara de Boyden) analizando el efecto de la sobre-expresión del miR-487b sobre fibroblastos de NH y la inhibición de miR-487b en fibroblastos normales. Tal y como ocurrió en el ensayo de herida, la sobreexpresión del miR-487b en fibroblastos de NH promueve un incremento en la migración (148 ± 7.5 ; $p < 0.05$) a través de los Transwells. Sin embargo, en el caso de los fibroblastos normales, no se observaron diferencias significativas en la migración cuando se inhibió a miR-487b (113 ± 5.65 vs control 100 ± 16.26) (Figura 16).

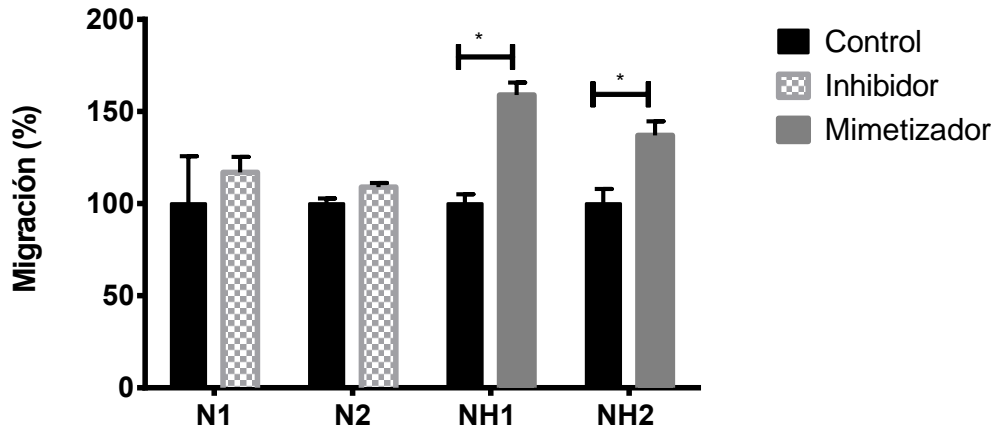


Figura 16. Efecto de miR-487b y su silenciamiento sobre la migración de fibroblastos primarios en cámara de Boyden. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar. Los resultados graficados son de un experimento realizado por triplicado. * $p < 0.05$ por U de Mann-Whitney.

Papel del miR-487b sobre la proliferación de fibroblastos

Previo a evaluar el papel de miR-487b sobre la proliferación de fibroblastos, se analizó si existían diferencias en la proliferación basal entre fibroblastos normales y de NH a 48 y 72 horas. Se encontró que las dos líneas de fibroblastos de NH proliferan más que las dos líneas de normales (Figura 17). Este incremento es más evidente a las 72 horas en donde las diferencias alcanzaron significancia estadística (3.62 ± 0.8 en NH vs 2.14 ± 0.15 en normales; $p < 0.05$).

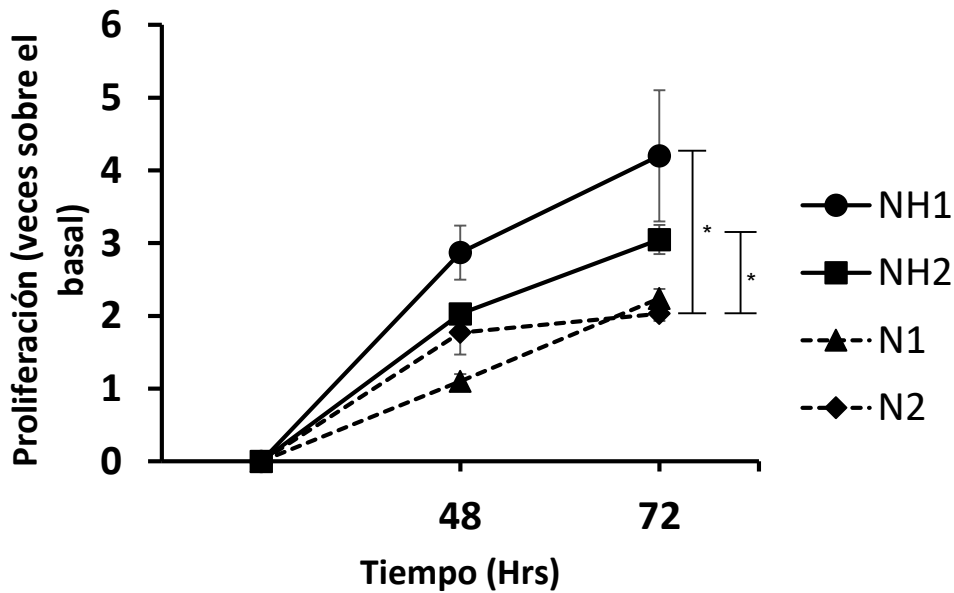


Figura 17. Proliferación basal de 2 líneas primarias de fibroblastos normales (líneas continuas) y dos líneas de fibroblastos de NH (líneas punteadas). * $p < 0.05$ (Normales vs NH) por ANOVA de dos vías con el test de Holm-Sidak.

El efecto del miR-487b sobre la proliferación de fibroblastos se analizó mediante el uso de los reactivos WST-1 y CyQuant en 2 líneas de fibroblastos normales y 2 de NH. El análisis del ensayo con WST mostró que la inhibición de miR-487b en los fibroblastos normales (Gráfica 18A) tiene efectos diferentes en cada una de las líneas. En una de ellas se encontró un incremento en la tasa de crecimiento a las 48 y 72 horas (2.3708 ± 0.1635 ; figura 18A derecha), mientras que en la otra línea no se observaron cambios respecto al control (1.911 ± 0.1528 ; figura 18A izquierda). Interesantemente, en este ensayo encontramos que la sobreexpresión del miR-487b en fibroblastos de NH (Figura 18B) disminuye significativamente la tasa de crecimiento de las dos líneas analizadas (3.6965 ± 0.1169) y este efecto se observó en todos los tiempos analizados respecto al control (6.4320 ± 0.0752).

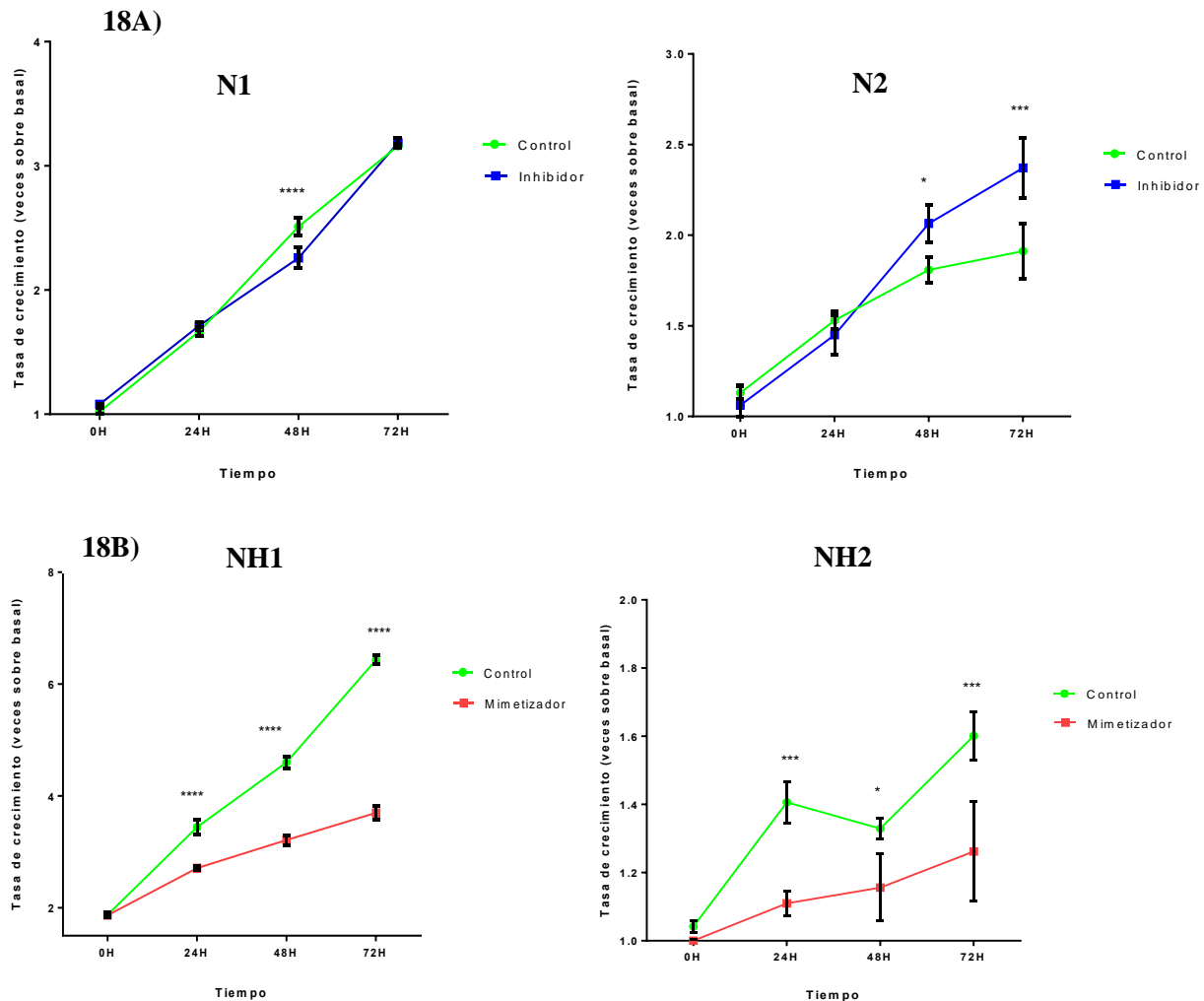
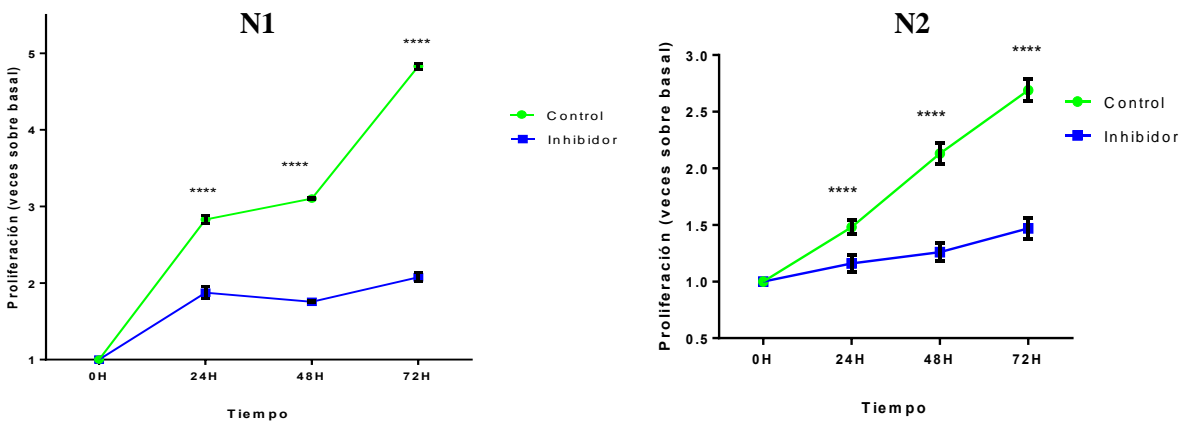


Figura 18. Ensayo de tasa de crecimiento con el reactivo WST-1 en 2 líneas de fibroblastos normales (18A) y dos fibroblastos de NH (18B). Cada punto representa la media \pm la desviación estándar de 2 experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ por ANOVA de dos vías con el test de Holm-Sidak.

La figura 19 muestra los resultados del ensayo de proliferación con CyQuant. Se encontró que la inhibición de miR-487b en los fibroblastos normales disminuye significativamente la proliferación (1.47 ± 0.093) en comparación con la condición control (2.69 ± 0.098) que tiene una secuencia de *C. elegans* (Figura 19A). En el caso de los fibroblastos de NH, la sobreexpresión de miR-487b disminuye la proliferación (1.536 ± 0.203) de sólo una de las líneas analizadas mientras que la otra permanece sin cambios respecto al control (2.7 ± 0.269 ; figura 19B).

19A)



19B)

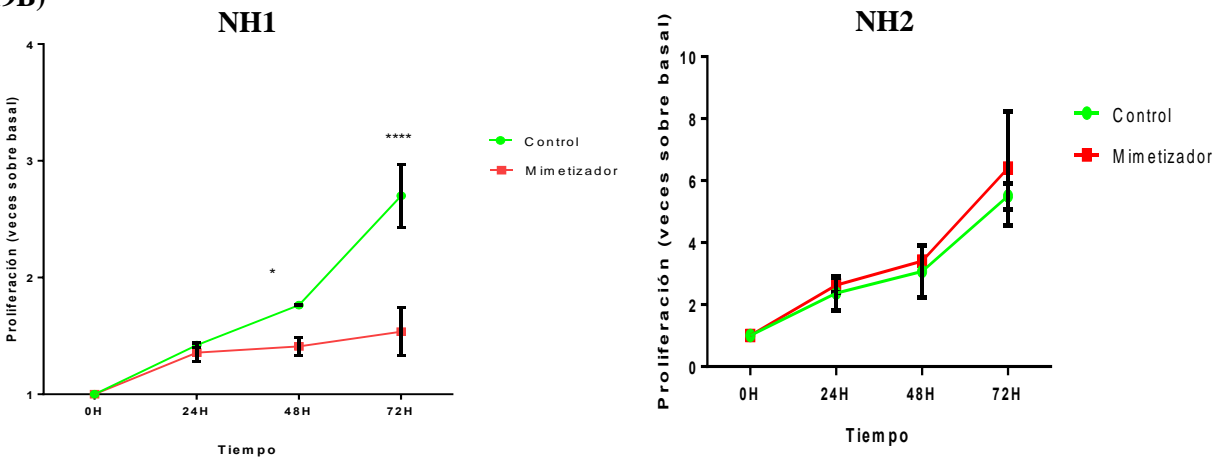


Figura 19. Efecto de miR-487b sobre la proliferación celular de dos líneas de A) fibroblastos normales y de dos líneas de B) fibroblastos derivados de NH. Cada punto representa la media \pm la desviación estándar de al menos 2 experimentos realizados por triplicado. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ por ANOVA de dos vías con el test de Holm-Sidak.

Efectos del miR487 en la apoptosis de fibroblastos

Fibroblastos normales y fibroblastos de NH fueron transfectados con el inhibidor o el mimetizador del miR-487b, respectivamente. El porcentaje de células en apoptosis temprana se evaluó después de 24 horas de transfección por citometría de flujo cuantificando células

positivas para Anexina V-PE y negativas para 7-ADD. Los resultados indican que la transfección del inhibidor de miR-487b en fibroblastos normales incrementa a 1.82 veces (Desviación Estandar 0.480) el número de células en apoptosis temprana en comparación con la condición control ($p < 0.05$), mientras que en fibroblastos de NH el mimetizador del miR-487b sólo tiende a aumentar el número de células en apoptosis temprana (Figura 20),

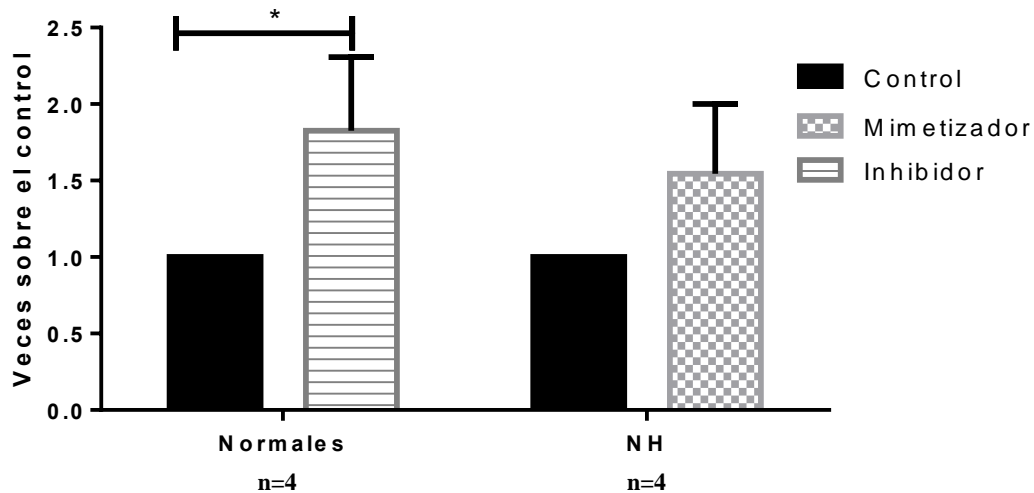


Figura 20. Gráfica representativa de al menos dos experimentos independientes por duplicado de la razón de cambio de fibroblastos en apoptosis temprana respecto a la condición control. * $p < 0.05$ por U de Mann-Whitney.

Para confirmar los resultados de citometría, también se analizó la expresión de caspasa 3 por WB. Los resultados muestran que los niveles de la pro-caspasa-3 y su forma activa se incrementan significativamente en los fibroblastos normales transfectados con el inhibidor del miR-487b (2.43 ± 0.639) en comparación con la condición control. En fibroblastos de NH no se observaron diferencias entre las células tratadas con el mimetizador cuando se compara contra su control (1.288 ± 0.330) (Figura 21).

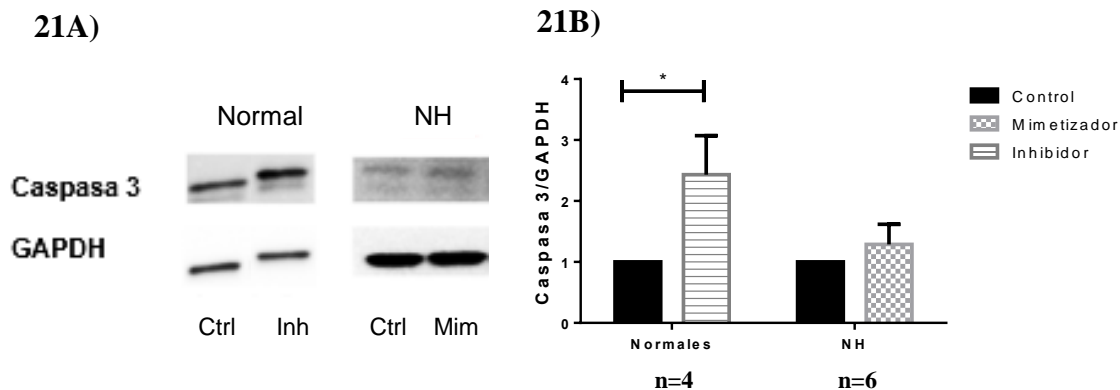


Figura 21. A) Expresión de caspasa 3 por Wb en una línea normales de fibroblastos y una línea de NH y una línea de fibroblastos transfectados con el mimetizador e inhibidor de miR-487b. B) Análisis densitométrico de la expresión relativa de caspasa 3 de al menos tres experimentos independientes. Los resultados se expresan con la media \pm desviación estándar. * $p < 0.05$ por U de Mann-Whitney.

DISCUSIÓN

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) es una patología pulmonar que ocurre por la exposición recurrente a diversos agentes ambientales de origen orgánico o inorgánico en sujetos susceptibles y en etapas crónicas cursan con un proceso fibrótico caracterizado por la proliferación excesiva de fibroblastos [2]. En nuestro país, esta enfermedad es comúnmente asociada a sujetos que conviven con aves y a pesar de ser más frecuente que otras EPID, es una enfermedad olvidada desde el ámbito de la investigación ya que la mayoría de los trabajos encaminados a estudiar los mecanismos celulares y moleculares que ocurren en la fibrosis pulmonar se relacionan a otras EPID, como por ejemplo a la FPI. En la última década, el estudio de los procesos epigenéticos implicados en el desarrollo y progresión de la fibrosis pulmonar se han incrementado de manera importante; sin embargo, la mayoría aborda entidades como la FPI. En este contexto, el presente trabajo se planteó con el objeto de estudiar el papel del miR-487b en fibroblastos de pulmón de pacientes con NH y compararlos con fibroblastos de sujetos donadores sin antecedentes de enfermedad pulmonar (normales).

En un estudio piloto y debido a la limitación de las células, analizamos la expresión de miRNAs en 3 líneas de fibroblastos normales y 4 de NH, y encontramos que, en NH la expresión del miR-487b se encontraba disminuida. Como primer objetivo y con el fin de establecer si la diferencia observada era consistente, en este trabajo se decidió evaluar la expresión del miR-487b en un mayor número de líneas de fibroblastos de NH y normales y aquí también se decidió incluir fibroblastos de FPI (otro padecimiento intersticial ampliamente estudiado).

Los resultados de este primer experimento confirmaron que, en comparación con fibroblastos normales, miR-487b está disminuido significativamente en fibroblastos de NH y de manera interesante se encontró que este miRNA también se encuentra disminuido en FPI; sin embargo, no se observaron diferencias entre fibroblastos de NH y FPI, lo cual sugiere que la disminución de este miRNA podría estar asociada al proceso de fibrosis, independientemente de la naturaleza patogénica de la enfermedad. En este sentido, la expresión disminuida del miR-487b también ha sido reportada en diferentes tipos de cáncer, como en carcinoma de hígado [69], carcinoma de colon [70] y en células pulmonares tumorales [72] donde se ha propuesto que miR487 tiene un papel como supresor de tumores. La fibrosis pulmonar es una entidad patológica que representa el resultado final de diferentes patologías y sin importar la naturaleza de su origen, una característica distintiva es la excesiva proliferación de fibroblastos. Quizás, miR-487b puede ser un marcador distintivo de procesos fibrosantes del pulmón, independientemente del origen patogénico; sin embargo, habría que analizar la expresión de esta molécula en fibroblastos de diferentes EPID para corroborar esta hipótesis.

Recientemente se publicó que en tejido pulmonar de pacientes con FPI, miRNAs del locus genómico 14q32, incluido miR-487b, se encuentran incrementados [56] y en este mismo trabajo, se utilizaron cultivos de fibroblastos normales de una línea comercial (NHLF) que al ser estimulados con TGF- β también incrementan la expresión de este locus de miRNAs. Sin embargo, nosotros trabajamos con fibroblastos de cultivos primarios de sujetos donadores pareados por edad lo cual representa una gran diferencia con los cultivos de líneas comerciales y en este tipo de trabajos esto es de suma importancia ya que ahora se empieza a reconocer que la FPI es una enfermedad relacionada al envejecimiento.

Como segundo objetivo, se procedió a evaluar la presencia o ausencia de BMI-1, SUZ12, WNT5A que son blancos validados del miR-487b que regulan procesos de proliferación [72] y SMAC/DIABLO, un blanco predicho por tres herramientas bioinformáticas (Qiagen, Exiqon V3.0 y MiRanda). El análisis por WB de algunas proteínas blanco del miR-487b reveló que BMI-1, SUZ12 que es un componente esencial del complejo 2 represor de Polycomb y SMAC/DIABLO se encuentran aumentadas en fibroblastos de NH en comparación con fibroblastos normales en donde los niveles de estas proteínas son bajos. Estos resultados concuerdan con los bajos niveles de expresión de miR-487b en fibroblastos de NH en comparación con controles, lo cual podría sugerir que estas proteínas son moduladas por miR-487b por mecanismos post-transcripcionales en fibroblastos de pulmón, aunque habría que hacer más estudios para corroborarlo.

Aunque WNT5A, ligando de la vía canónica y no canónica de Wnt, ha sido reportado como un regulador clave en la proliferación y resistencia a la apoptosis en fibroblastos de Neumonía Intersticial Usual (UIP, por sus siglas en inglés) [73] no se encontró diferencia significativa en su expresión basal entre fibroblastos de NH y fibroblastos normales. Resultados similares se han reportado en otros trabajos, como en glioma, donde se ha observado que miR-487 no tiene una función regulatoria sobre WNT5A [74].

Durante el desarrollo de nuestro trabajo observamos que BMI-1 fue el blanco de miR-487b que siempre presentó una expresión más robusta consistente en todos los ensayos de WB y por ello decidimos analizar la expresión del mRNA de esta proteína bajo las mismas condiciones. Nuestros resultados indican que, al igual a lo encontrado a nivel de proteína, el mRNA de BMI-1 también se encuentra disminuido en NH. Interesantemente, cuando se indujo la ganancia del miR-487b en fibroblastos de NH con un mimetizador, encontramos que la expresión de BMI-1 disminuye significativamente a nivel de proteína y del mensajero, lo cual sugiere que esta proteína podría efectivamente ser regulada directamente por el miR-487b en estas células.

Así mismo, la sobreexpresión de miR-487b en fibroblastos de NH promueve una disminución de las proteínas BMI-1 y SMAC/DIABLO, mientras que la inhibición del miRNA produce el efecto contrario en fibroblastos normales en donde se pudo observar un aumento de las mismas dos proteínas.

BMI-1, SUZ12 y SMAC/DIABLO son proteínas íntimamente ligadas a procesos de proliferación, migración celular y apoptosis. Nosotros decidimos evaluar si miR-487b puede modificar estos procesos en fibroblastos de pulmón. Nuestros resultados muestran que en condiciones basales los fibroblastos de NH migran y proliferan más que los normales. Cuando se sobre-expresó a miR-847b en fibroblastos de NH, la migración celular aumentó, pero el ensayo con WST-1 indica que la proliferación disminuye significativamente; aunque en el ensayo con CyQuant, un reactivo que se une a DNA, este efecto se observó solo en una de las dos líneas estudiadas. Por otro parte, la inhibición del miRNA en fibroblastos normales tiene un efecto contrario en migración y produce una disminución significativa, mientras que en proliferación se obtuvieron resultados mixtos ya que con CyQuant los resultados indican que la inhibición del miR-487b disminuye la proliferación, pero con WST-1 se observó un aumento en una de las líneas analizadas mientras que la otra no mostró cambios.

BMI-1 (homólogo 1 de la región de inserción del virus murino Moloney de leucemia específica de linfocitos B) es una proteína represora del complejo 1 de Polycomb, que está sobre-expresada en muchos tipos de cáncer, por lo que es considerada como un oncogen porque promueve la proliferación celular debido a que reprime a p16 (Ink4a) y p14 (Arf), que son inhibidores del ciclo celular [75]. Sin embargo, en carcinoma pulmonar de células no pequeñas parece funcionar como supresor de tumores porque regula negativamente la invasión celular y metastasis [76], por lo que su función aun es debatida.

SUZ12 (Proteína homóloga del supresor de Zeste 12), es un componente clave del complejo 2 de Polycomb que media el silenciamiento de genes mediante la marca represora H3K27me_{2/3} por medio de la metilasa EZH2 (Enhancer de Zeste Homolog 2). Esta proteína está sobre-expresada en varios tipos de cáncer y promueve la invasión, proliferación, migración e invasión celular por lo que tiene una fuerte correlación con la malignidad de los tumores [77]. En el ámbito pulmonar, SUZ12 promueve la proliferación, migración e invasión celular mediante regulación positiva con el factor 1 de elongación 2 (E2F1, por sus siglas en inglés) y ROCK1 [78].

SMAC/DIABLO es una proteína mitocondrial con características pro-apoptóticas que se une a las proteínas IAP, por lo que generalmente se le encuentra disminuida en enfermedades con alta tasa proliferativa respecto a tejidos sanos, como en el cáncer pulmonar [79]. Sin embargo,

en el caso de fibroblastos de NH se encontró aumentada en comparación con fibroblastos normales, lo que pudiera sugerir una función distinta de esta proteína a las reportadas con frecuencia.

Estudios recientes han mostrado que miR-487b puede disminuir la migración celular [67] o promoverla [64] [72], dependiendo del contexto biológico en que se estudie.

En nuestra hipótesis, nosotros esperábamos que la sobreexpresión del miR-487b en fibroblastos de NH disminuyera la migración, sin embargo, en NH la migración aumentó cuando se sobre-expresó miR-487b y bajaron los niveles de BMI-1. Al respecto podríamos suponer que miR-487b regula positivamente el proceso de migración celular por mecanismos independientes de la expresión BMI-1 en NH y dichos mecanismos inexplorados pueden ser tema central de estudios posteriores. Por otro lado, la sobre-expresión del miR-487b en fibroblastos de NH disminuyó su tasa de crecimiento, lo cual puede ser dependiente de BMI-1 como ya se demostró en carcinoma de laringe [80] y en carcinoma colorectal mediante la supresión de KRAS [69]. La inhibición del miR-487b no tuvo efecto sobre la tasa de crecimiento, salvo en una de las dos líneas normales donde la tasa de crecimiento aumentó, lo cual confirma de alguna manera la gran heterogeneidad que existe en las líneas primarias de fibroblastos pulmonares.

Como ya es sabido, la sal de tetrazolio WST-1 es utilizada ampliamente en ensayos indirectos de proliferación celular, debido a que su bioreducción es catalizada por complejos del sistema de la cadena respiratoria de la mitocondria, por lo que la cantidad de formazán formado es proporcional al número de células mitocondrialmente intactas y viables, sin embargo, es sabido que esta reducción llega a ocurrir de manera extracelular [81], por lo que los datos obtenidos por este ensayo deben ser tomados con cautela.

En el caso particular de fibroblastos normales, se observó que la inhibición del miR-487b induce un descenso considerable de la proliferación celular, lo cual podría estar sugiriendo un probable papel del miR-487b sobre la apoptosis celular o susceptibilidad al proceso de transfección en estos fibroblastos.

De acuerdo a la literatura, miR-487b parece no mediar el proceso apoptótico en carcinoma pulmonar [72], sin embargo, recientemente se reportó que en miocarditis disminuye la apoptosis y la fibrosis mediante la regulación negativa de IL-33 y ST2 [82].

Nuestro análisis de Anexina-V y expresión de caspasa-3 mostraron que la inhibición del miR-487b provoca un aumento significativo de la apoptosis en fibroblastos normales mientras que la sobre-expresión de este miRNA en fibroblastos de NH no mostró diferencias significativas.

La resistencia a la apoptosis es un fenómeno importante en padecimientos fibrosantes, como en la FPI donde se ha reportado que fibroblastos de FPI son resistentes a la apoptosis, lo cual favorece la progresión y perpetuación de la cicatrización pulmonar [83].

SMAC/DIABLO es una proteína pro-apoptótica que se encuentra usualmente disminuida en muchas patologías como el cáncer; en fibrosis de piel se ha detectado que SMAC/DIABLO disminuye la proliferación celular y aumenta la activación de caspasa 3 y 9, lo que conlleva a un aumento de la apoptosis [84], sin embargo, en fibroblastos de NH se encuentra elevada respecto a fibroblastos normales bajo condiciones basales. En pulmón se ha descrito un mecanismo que indica que proteínas XIAPs promueven la degradación de la forma madura de SMAC/DIABLO mediante ubiquitinación, lo que culmina en una baja tasa de apoptosis [85], inhibiendo de esta manera la apoptosis inducida por altos niveles de SMAC/DIABLO, lo que pudiera estar explicando la resistencia a la apoptosis en fibroblastos de NH aunque éstos tengan niveles altos de SMAC/DIABLO.

Aunque, por otro lado, la regulación positiva del miR-487b sobre la apoptosis en fibroblastos de NH puede ser independiente del inductor de apoptosis: SMAC/DIABLO, aunque sería importante validar si SMAC/DIABLO efectivamente es blanco directo del miR-487b por ensayos directos como los de actividad de luciferasa en estudios posteriores.

Finalmente, este es el primer estudio donde se indaga el papel de un miRNA en fibroblastos de NH, y a pesar de la gran heterogeneidad que existe cuando se hacen estudios con células primarias, nuestros resultados podrían indicar que en estas células, miR-487b desempeña un papel importante en la patogénesis de la enfermedad con efectos duales de oncogen y supresor de tumores, debido a que aumenta la migración pero disminuye la proliferación y dichas funciones podrían estar mediadas a través de las proteínas blanco.

CONCLUSIONES

- miR-487b se encuentra disminuido en fibroblastos de pacientes con NH y algunas de sus proteínas blanco como BMI-1, SUZ12 y SMAC/DIABLO están incrementadas en comparación con fibroblastos normales.
- La sobre-expresión de miR-487 disminuye los niveles de las proteínas BMI-1 y SMAC/DIABLO, mientras que su silenciamiento tiene el efecto contrario.
- BMI-1 también se encuentra incrementada a nivel de mRNA en fibroblastos de NH y la sobreexpresión de miR-487b la disminuye.
- Fibroblastos de NH tienen aumentada la migración y la proliferación celular en comparación con fibroblastos normales bajo condiciones basales.
- La sobreexpresión del miR-487b aumenta la migración y disminuye la tasa de crecimiento, así como la proliferación en fibroblastos de NH.
- En fibroblastos normales, la inhibición del miR-487b disminuye la migración y la proliferación celular.
- Los ensayos de apoptosis sugieren que los fibroblastos normales son más susceptibles a la muerte celular en comparación con fibroblastos de NH.

LITERATURA CITADA

1. Walsh, S. L. F., & Hansell, D. M. (2010). Diffuse interstitial lung disease: Overlaps and uncertainties. *European Radiology*.
2. Selman, M. (2004). Hypersensitivity pneumonitis: A multifaceted deceiving disorder. *Clinics in Chest Medicine*.
3. Mejía, M. E., Suárez, T. D. J., Arreola, A., Alonso, D. & Estrada, A. (2007). Neumonitis por hipersensibilidad. *Neumol. Cir. Torax* 66, 115–123.
4. Selman, M., & Buendía-Roldán, I. (2012). Immunopathology, diagnosis, and management of hypersensitivity pneumonitis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 33(5), 543-554.
5. Selman, M., Pardo, A., & King, T. E. (2012). Hypersensitivity pneumonitis: Insights in diagnosis and pathobiology. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(4), 314-324.
6. Camarena, A., Juárez, A., Mejía, M., Estrada, A., Carrillo, G., Falfán, R., Zuñiga, J., et al. (2001). Major histocompatibility complex and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in pigeon breeder's disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 163(7), 1528-1533.
7. Aquino-Galvez, A., Camarena, A., Montañó, M., Juárez, A., Zamora, A. C., González-Avila, G., Checa, M., et al. (2008). Transporter associated with antigen processing (TAP) 1 gene polymorphisms in patients with hypersensitivity pneumonitis. *Experimental and molecular pathology*, 84(2), 173-7.
8. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*.
9. Pagdin, T., & Lavender, P. (2014). MicroRNAs in lung disease. *Chest clinic*.
10. Molina-Molina, M. (2008). Clasificación de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas: interpretación clínico-terapéutica y actualización. *Medicina respiratoria*. 1:39-47
11. Bois, R. M. (1994). Fortnightly Review Diffuse lung disease: an approach to management. *Educación & debate*. 309, 175–179
12. Zacharisen, M. C., & Fink, J. N. (2011). Hypersensitivity Pneumonitis and Related Conditions in the Work Environment. *Immunology and Allergy Clinics of North America*.
13. Thomeer MJ, Costabe U, Rizzato G, Poletti V, Demedts M. (2001) Comparison of registries of interstitial lung diseases in three European countries. *Eur Respir J Suppl.*;32:114s-118s.
14. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE, (1994). The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*; 150:967-72.
15. Adkinson NF. Hypersensitivity Pneumonitis. *Middleton's Allergy: Principles and Practice*. 8th Ed. Saunders; 2013.
16. Hanak V, Golbin JM, Ryu JH. (2007). Causes and presenting features in 85 consecutive patients with hypersensitivity pneumonitis. *Clin Proc*. Jul. 82(7):812-6.
17. Selman M. (2003). Hypersensitivity pneumonitis, *En: Interstitial lung disease. 4th ed King, TE Jr, Schwarz MI (eds), B.C. Decker, Hamilton ON, Canada 2003: 452.*
18. Carrillo-Rodríguez, J. G., Sansores, R. H., Castrejón, A., Pérez-Padilla, R., Ramírez-Venegas, A., & Selman, M. (2000). Neumonitis por hipersensibilidad en la ciudad de México. *Salud Publica de Mexico*, 42(3), 201-207.
19. Takemura, T., Akashi, T., Ohtani, Y., Inase, N., & Yoshizawa, Y. (2008). Pathology of hypersensitivity pneumonitis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 14(5), 440–54.
20. Pardo, A., Barrios, R., Gaxiola, M., Segura-Valdez, L., Carrillo, G., Estrada, A., Selman, M. (2000). Increase of lung neutrophils in hypersensitivity pneumonitis is associated with lung fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(5), 1698–1704.
21. Cebollero P, Echechipía S, Echevoyen A, Lorente, M & Fanlo P. (2005). Hypersensitivity Pneumonitis (extrinsic allergic alveolitis). *An. Sist. Sanit. Navar*. 28 (Supl. 1): 91-99.
22. Joshi AD, Fong DJ, Oak SR, Trujillo G, Flaherty KR, Martinez FJ, Hogaboam CM. (2009). Interleukin-17-mediated immunopathogenesis in experimental hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 179:705–716.
23. Ishizuka, M., Miyazaki, Y., Masuo, M., Suhara, K., Tateishi, T., Yasui, M., & Inase, N. (2015). Interleukin-17A and neutrophils in a murine model of bird-related hypersensitivity pneumonitis. *PLoS ONE*, 10(9).
24. Hwang, S. J., Kim, S., Park, W. S., & Chung, D. H. (2006). IL-4-secreting NKT cells prevent hypersensitivity pneumonitis by suppressing IFN-gamma-producing neutrophils. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md: 1950), 177(8), 5258–5268.

25. Barrera, L., Mendoza, F., Zuñiga, J., Estrada, A., Zamora, A. C., Melendro, E. I., Selman, M. (2008). Functional diversity of T-cell subpopulations in subacute and chronic hypersensitivity pneumonitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177(1), 44–55.
26. Park, Y., Oh, S. J., & Chung, D. H. (2009). CD4(+)CD25(+) regulatory T cells attenuate Hypersensitivity Pneumonitis by suppressing IFN-gamma production by CD4(+) and CD8(+) T cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(6), 1427–37.
27. Butler, N. S., Monick, M. M., Yarovinsky, T. O., Powers, L. S., & Hunninghake, G. W. (2002). Altered IL-4 mRNA stability correlates with Th1 and Th2 bias and susceptibility to hypersensitivity pneumonitis in two inbred strains of mice. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md: 1950), 169(7), 3700–3709.
28. Israël-Assayag, E., Dakhama, A., Lavigne, S., Laviolette, M., & Cormier, Y. (1999). Expression of costimulatory molecules on alveolar macrophages in hypersensitivity pneumonitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 159(6), 1830–1834.
29. Moszczyński, P., Zabiński, Z., Moszczyński, P., Rutowski, J., Słowiński, S., & Tabarowski, Z. (2001). Immunological findings in cigarette smokers. *Toxicology Letters*, 118(3), 121–127.
30. Hill MR, Briggs L, Montañó M, Estrada A, Laurent GJ, Selman M, Pardo A. (2004). Promoter variants in tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) protect against susceptibility in pigeon breeders' disease. *Thorax* 59:586–590.
31. Tzouveleakis, A., & Kaminski, N. (2015). Epigenetics in idiopathic pulmonary fibrosis. *Biochemistry and Cell Biology*. *Biochimie et Biologie Cellulaire*, 93(2), 159–70.
32. Phan SH. (2003). Fibroblast phenotypes in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 29 (3 Suppl):87-92.
33. Abraham C.R.; Berrocal, C., Cisneros, J. & Montañó, M. (2004). El miofibroblasto, una célula multifuncional en La Patología Pulmonar. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex, México*, v.17, n3, p 473-479.
34. Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, et al. (1994). Evidence of fibroblast heterogeneity and role of subpopulations in fibrosis. *Clinical Immunol Immunopathol*; 72:283-292.
35. Selman, M., & Pardo, A. (2006). Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(4), 364–372.
36. Yasui, M., Miyazaki, Y., Mitaka, K., Ishizuka, M., Unoura, K., Tamaoka, M. Inase, N. (2012). Epithelial-mesenchymal transition in chronic hypersensitivity pneumonitis. *Journal of Medical and Dental Sciences*, 59(1), 29–41.
37. Ramírez, G., Hagood, J. S., Sanders, Y., Ramírez, R., Becerril, C., Segura, L., Pardo, A. (2011). Absence of Thy-1 results in TGF-β induced MMP-9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts. *Lab. Invest.*, 91(8), 1206–18.
38. Dogini, D. B., Pascoal, V. D. A. B., Avansini, S. H., Vieira, A. S., Pereira, T. C., & Lopes-Cendes, I. (2014). The new world of RNAs. *Genetics and Molecular Biology*. *Brazilian Journal of Genetics*.
39. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* (New York, N.Y.), 294(5543), 853–858.
40. Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* 11, 597–610. doi: 10.1038/nrg2843.
41. Hou J, Meng F, Chan LWC, Cho WCS and Wong SCC (2016) Circulating Plasma MicroRNAs As Diagnostic Markers for NSCLC. *Front. Genet.* 7:193. doi: 10.3389/fgene.2016.00193.
42. Borchert, G. M., Lanier, W. & Davidson, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Struct. Mol. Biol.* 13, 1097–1101 (2006).
43. Bartel, D. P. (2009). MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), 215–233.
44. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11(3), 228–234.
45. Bartel, D. P. (2004, January 23). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*.
46. Place, R. F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E. J., & Dahiya, R. (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5), 1608–13.
47. Graves, P., & Zeng, Y. (2012, October). Biogenesis of Mammalian MicroRNAs: A Global View. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*.
48. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA. (2006). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9:435–443

49. Katoh T, Sakaguchi Y, Miyauchi K, Suzuki T, Kashiwabara SI, Baba T, Suzuki T (2009) Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly (A) polymerase GLD-2. *Genes Develop* 23: 433–438.
50. Kawahara Y, Zinshteyn B, Sethupathy P, Iizasa H, Hatzigeorgiou AG, Nishikura K (2007) Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science* 315: 1137–1140.
51. Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S.D., Gregersen, L.H., Munschauer, M., Loewer, A., Ziebold, U., Landthaler, M., Kocks, C., Le Noble, F., Rajewsky, N., 2013. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* 495, 333–338.
52. Guz, M., Rivero-Müller, A., Okoń, E., Stenzel-Bembenek, A., Polberg, K., Słomka, M., & Stepulak, A. (2014). MicroRNAs-role in lung cancer. *Disease Markers*. IOS Press.
53. Lu, T. X., Munitz, A., & Rothenberg, M. E. (2009). MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 182(8), 4994–5002.
54. Graff, J. W., Powers, L. S., Dickson, A. M., Kim, J., Reisetter, A. C., Hassan, I. H., ... Monick, M. M. (2012). Cigarette Smoking Decreases Global MicroRNA Expression in Human Alveolar Macrophages. *PLoS ONE*, 7(8).
55. Liu, G., Friggeri, A., Yang, Y., Milosevic, J., Ding, Q., Thannickal, V. J., Abraham, E. (2010). miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(8), 1589–1597.
56. Milosevic, J., Pandit, K., Magister, M., Rabinovich, E., Ellwanger, D. C., Yu, G., Kaminski, N. (2012). Profibrotic role of miR-154 in pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 47(6), 879–887.
57. Pandit, K. V., Corcoran, D., Yousef, H., Yarlagadda, M., Tzouveleki, A., Gibson, K. F., Kaminski, N. (2010). Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(2), 220–229.
58. Cui, H., Ge, J., Xie, N., Banerjee, S., Zhou, Y., Antony, V. B. Liu, G. (2017). MIR-34a inhibits lung fibrosis by inducing lung fibroblast senescence. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 56(2), 168–178.
59. Xiao, J. ., Meng, X. M., Huang, X. R., Chung, A. C. K., Feng, Y. L., Hui, D. S. C., ... Lan, H. Y. (2012). miR-29 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Molecular Therapy, online Mar*
- Cushing, L., Kuang, P., & Lu, J. (2015). The role of miR-29 in pulmonary fibrosis. *Biochemistry and Cell Biology*, 93(2), 109–118.
60. Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Zhang, C.-Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, 18(10), 997–1006.
61. Lavon I, Zrihan D, Granit A, Einstein O, Fainstein N, Cohen MA, Zelikovitch B, Shoshan Y, Spektor S, Reubinoff BE, Felig Y, Gerlitz O, Ben-Hur T, Smith Y, Siegal T. (2010). Gliomas display a microRNA expression profile reminiscent of neural precursor cells. *Neurooncol* 12:422–433. doi:10.1093/neuonc/nop061.
62. Gardiner E, Beveridge NJ, Wu JQ, Carr V, Scott RJ, Tooney PA, Cairns MJ. (2012). Imprinted DLK1-DIO3 region of 14q32 defines a schizophrenia-associated miRNA signature in peripheral blood mononuclear cells. *Mol Psychiatry* 17:827–840. doi:10.1038/mp.2011.78.
63. Glazov EA, McWilliam S, Barris WC, Dalrymple BP (2008) Origin, evolution, and biological role of miRNA cluster in DLKDIO3 genomic region in placental mammals. *Mol Biol Evol.* 25:939–948. doi:10.1093/molbev/msn045.
64. Feng, N., Wang, Z., Zhang, Z., He, X., Wang, C., & Zhang, L. (2015). MiR-487b promotes human umbilical vein endothelial cell proliferation, migration, invasion and tube formation through regulating THBS1. *Neuroscience Letters*, 591, 1–7.
65. Katase, N., Terada, K., Suzuki, T., Nishimatsu, S., & Nohno, T. (2015). miR-487b, miR-3963 and miR-6412 delay myogenic differentiation in mouse myoblast-derived C2C12 cells. *BMC Cell Biology*, 16, 13.
66. Kitamura, K., Seike, M., Okano, T., Matsuda, K., Miyanaga, A., Mizutani, H., Gemma, A. (2014). MiR-134/487b/655 cluster regulates TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition and drug resistance to gefitinib by targeting MAGI2 in lung adenocarcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(2), 444–53.

67. Bao Liang, Lv Lei, Feng Jinping, Chen Yuyu, Wang Xinhua, Han Shuguang, and Zhao Hongqing. August (2016). miR-487b-5p Regulates Temozolomide Resistance of Lung Cancer Cells Through LAMP2-Medicated Autophagy. *DNA and Cell Biology*, 35(8): 385-392. doi:10.1089/dna.2016.3259.
68. Formosa, a, Markert, E. K., Lena, a M., Italiano, D., Finazzi-Agro', E., Levine, a J., Candi, E. (2014). MicroRNAs, miR-154, miR-299-5p, miR-376a, miR-376c, miR-377, miR-381, miR-487b, miR-485-3p, miR-495 and miR-654-3p, mapped to the 14q32.31 locus, regulate proliferation, apoptosis, migration and invasion in metastatic prostate cancer cells. *Oncogene*, 33(44), 5173–82.
69. Hata, T., Mokutani, Y., Takahashi, H., Inoue, A., Munakata, K., Nagata, K., Yamamoto, H. (2017). Identification of microRNA-487b as a negative regulator of liver metastasis by regulation of KRAS in colorectal cancer. *International Journal of Oncology*, 50, 487-496.
70. Yi, H., Geng, L., Black, A., Talmon, G., Berim, L & Wanji, J. (2017). The miR-487b-3p/GRM3/TGFβ signaling axis is an important regulator of colon cancer tumorigenesis. *Oncogene*. Nature, doi:10.1038/onc.2016.499.
71. Ames, H. M., Yuan, M., Vizcaíno, M. A., Yu, W., & Rodriguez, F. J. (2016). MicroRNA profiling of low-grade glial and glioneuronal tumors shows an independent role for cluster 14q32.31 member miR-487b. *Modern Pathology*, 1–13.
72. Xi, S., Xu, H., Shan, J., Tao, Y., Hong, J. A., Inchauste, S., Zhang, M., et al. (2013). Cigarette smoke mediates epigenetic repression of miR-487b during pulmonary carcinogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 1241-1261.
73. Vuga, L. J., Ben-Yehudah, A., Kovkarova-Naumovski, E., Oriss, T., Gibson, K. F., Feghali-Bostwick, C., & Kaminski, N. (2009). WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 41(5), 583–589.
74. Ames, H. M., Yuan, M., Vizcaíno, M. A., Yu, W., & Rodriguez, F. J. (2016). MicroRNA profiling of low-grade glial and glioneuronal tumors shows an independent role for cluster 14q32.31 member miR-487b. *Modern Pathology*, 1–13.
75. Cao, L., Bombard, J., Cintron, K., Sheedy, J., Weetall, M. L., & Davis, T. W. (2011). BMI1 as a novel target for drug discovery in cancer. *J Cell Biochem*, 112(10), 2729–2741.
76. Xiong, D., Ye, Y., Fu, Y., Wang, J., Kuang, B., Wang, H. Wang, J. (2015). Bmi-1 expression modulates non-small cell lung cancer progression. *Cancer Biology & Therapy*, 16(5), 756–763.
77. Jie Zhang, Weining Wu, Shuo Xu, Jian Zhang, Jiale Zhang, Qun Yu, Yuanyuan Jiao, Yingyi Wang, Ailin Lu, Yongping You, Junxia Zhang, Xiaoming Lu. (2017). MicroRNA-105 inhibits human glioma cell malignancy by directly targeting SUZ12. *Tumor Biology*. Vol 39, Issue 6.
78. Liu, C., Shi, X., Wang, L., Wu, Y., Jin, F., Bai, C., & Song, Y. (2014). SUZ12 is involved in progression of non-small cell lung cancer by promoting cell proliferation and metastasis. *Tumor Biology*, 35(6), 6073–6082.
79. Sekimura A, Konishi A, Mizuno K, et al. (2004). Expression of Smac/DIABLO is a novel prognostic marker in lung cancer. *Oncol Rep* 11: 797-802.
80. Yao, X.-B., Wang, X.-X., Liu, H., Zhang, S.-Q., & Zhu, H.-L. (2013). Silencing Bmi-1 expression by RNA interference suppresses the growth of laryngeal carcinoma cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(5), 1262–72.
81. Berridge, M., Tan, A., McCoy, K., & Wang, R. (1996). The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, (4), 4–9.
82. En-Wei Wang, Xu-Sheng Jia, Chang-Wu Ruan2 and Zhi-Ru Ge. (2017). miR-487b mitigates chronic heart failure through inhibition of the IL-33/ST2 signaling pathway. *Oncotarget*. Vol. 8, (No. 31), pp: 51688-51702.
83. Alvarez, D. Cardenes, N. Sellares, J. Bueno, M. Corey, J. Sagar Hanumanthu, V. Peng, Y. D'Cuhna, H. Sembrat, J. Nouraie, M. Shanker, S. Caufield, Ch. Shiva, S. Armanios, M. Mora, A. & Rojas, M. (2017). IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype. *American Journal of Physiology* Vol. no. , DOI: 10.1152/ajplung.00220.2017
84. Liu, B. H., Chen, L., Li, S. R., Wang, Z. X., & Cheng, W. G. (2013). Smac/DIABLO regulates the apoptosis of hypertrophic scar fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, 32(3), 615–622.
85. Qin, S., Yang, C., Zhang, B., Li, X., Sun, X., Li, G. Ren, H. (2016). XIAP inhibits mature Smac-induced apoptosis by degrading it through ubiquitination in NSCLC. *International Journal of Oncology*, 49, 1289-1296.