



Casa abierta al tiempo

**Universidad Autónoma Metropolitana**

*Unidad Iztapalapa*

---

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

Inducción de Apoptosis en linfocitos por medios condicionados de Fibroblastos activados con Factor de Crecimiento Transformante Beta y derivados de pulmón con Fibrosis Pulmonar Idiopática

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de**

Maestro en Biología Experimental

P R E S E N T A

**Saúl**

**Soberanes**

**Arias**

**Co-Dirección**

**Dr Moisés Selman Lama**

**Dra Concepción Gutiérrez Ruiz**

**Asesores**

**Dra Annie Pardo Semo**

**Dra Julia Pérez Ramos**

## Indice

<b>Agradecimientos</b>	<b>4</b>
<b>Abreviaciones</b>	<b>5</b>
<b>Introducción</b>	<b>6</b>
Fibrosis Pulmonar intersticial difusa	7
Factor de Crecimiento Transformante Beta	8
Interferon Gamma	11
Apoptosis	12
Bases de la hipótesis de este estudio	13
<b>Hipótesis</b>	<b>15</b>
<b>Objetivos</b>	<b>15</b>
<b>Diseño Experimental</b>	<b>16</b>
1. Obtención y cultivo de Fibroblastos	16
2. Estimulación de fibroblastos con TGF- $\beta$ e IFN- $\gamma$	
3. Obtención de linfocitos de sangre periférica por el método de Ficoll	16
<i>Criopreservación</i>	17
<i>Células en fresco</i>	17
4. Estimulación de linfocitos por medios de cultivo condicionados.	17
5. Ensayo de proliferación	18
6. Ensayo de Activación de linfocitos	18
7. Ensayo de Apoptosis	19
<i>Determinación de apoptosis con el estuche comercial APO-BrDU.</i>	19
<i>Determinación de apoptosis por Anexina V.</i>	21
8. Análisis Estadístico.	21

<b>Resultados</b>	<b>22</b>
1. Proliferación	22
2. Activación	24
3. Apoptosis	25
<i>ApoBrDU</i>	27
<i>Anexina</i>	28
<b>Discusión</b>	<b>30</b>
Factor de crecimiento transformante Beta	33
Factor de necrosis tumoral Alfa	34
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	34
Factor de crecimiento similar a insulina 1	35
Interleucina 4	35
Endotelina 1	35
Factor de crecimiento de tejido conectivo	36
FAS	36
Interferon Gamma	37
<b>Conclusiones</b>	<b>38</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>39</b>

## **AGRADECIMIENTOS.**

Esta Tesis está dedicada a todas las personas que de un modo directo o indirecto me ayudaron en su realización, comenzando por mis tutores: Moisés Selman, Annie Pardo, Concepción Gutiérrez, Julia Pérez y Felipe Mendoza. A ellos les expreso mi completa gratitud y admiración. Agradezco a mis compañeros de laboratorio: Ignacio Páramo, Victor Ruiz, Carmen Navarro, Marco Checa y Rafael Reynoso; a Gicel y a todos mis familiares, compañeros de maestría, compañeros de seminario y amigos.

Agradezco también a la doctora Rocío Ortiz, por enseñarme la técnica de anexina V y prestarme los reactivos con lo cual me evitó tres meses de inactividad.

También quiero expresar un agradecimiento muy especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme incluido en el programa de financiamiento educativo con la beca-crédito número 162526

La Maestría en Biología Experimental con el número de registro 309-0 de la Universidad Autónoma Metropolitana se encuentra dentro del padrón de Excelencia Académica

Y por último, agradezco al Dr David Dias Pontones por su dedicación y apoyo como coordinador de la maestría.

*Saúl Soberanes*

**ABREVIACIONES**

<b>ANOVA</b>	Análisis de Varianza
<b>CTGF</b>	Factor de crecimiento de tejido conectivo
<b>CTLA-4</b>	Antígeno de linfocito T citotóxico
<b>ET-1</b>	Endotelina-1
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FPI</b>	Fibrosis pulmonary idiopática
<b>GAS</b>	sitios palindromes gamma activados
<b>IFN-g</b>	Interferón Gamma
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento similar a insulina-1
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>JAKs</b>	Proteinatirosin cinasa de la familia Janus
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MMPs</b>	Metaloproteinasas de matriz
<b>PDGF</b>	factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>PI</b>	Yoduro de propidio
<b>PMN</b>	Leucocito polimorfonuclear
<b>TCR</b>	Receptor de la célula T
<b>TGF -b</b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>TIMPs</b>	Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TNFR</b>	Receptor del factor de necrosis tumoral

### **Introducción.**

El pulmón es un órgano que se encuentra en contacto directo y permanente con el ambiente externo y está expuesto a organismos infecciosos así como a múltiples partículas dañinas y gases; sin embargo cuenta con mecanismos de defensa capaces de neutralizar o remover el daño ocasionado por estos factores.

Después de un daño al pulmón, se encienden los mecanismos de reparación y se activa la inflamación para eliminar al agente agresor (Frank *et al* 1996, McGrath, Barnes 1982); concomitantemente se inician eventos reparativos con el fin de restaurar las unidades alveolo-capilares cruciales para el intercambio gaseoso y la oxigenación tisular. El resultado de la activación de las defensas es usualmente el regreso del pulmón a sus funciones normales; sin embargo, en daños crónicos al tejido o cuando se presentan episodios repetidos de inflamación, algunos de los mecanismos de defensa/reparación se descontrolan, lo que puede dar como resultado la proliferación de fibroblastos, el depósito anormal de matriz extracelular (fibrosis), y la alteración de la estructura normal del pulmón lo que compromete el intercambio gaseoso (Gauldie *et al* 2002, Hagimoto *et al* 2002).

La composición de la matriz extracelular (MEC) en los pulmones es crítica para el mantenimiento de sus funciones normales. Los fibroblastos son los principales productores de las moléculas de MEC: elastina, colágenas intersticiales, fibronectina y proteoglicanos. La matriz extracelular tiene un recambio normal del 10% diario y el balance se mantiene por un fino control entre síntesis y degradación, que se da en tres niveles (Pardo y Selman, 1999):

- Síntesis de novo y depósito de componentes de matriz extracelular.
- Degradación proteolítica de los componentes mediante un grupo de enzimas especializadas denominadas metaloproteinasas de matriz (MMPs).
- Inhibición de las MMPs por inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) (Eickelberg *et al* 1999).

### ***Fibrosis pulmonar intersticial difusa***

La fibrosis pulmonar intersticial difusa es la secuela final de un grupo muy heterogéneo de patologías que pueden involucrar un proceso inflamatorio o una lesión epitelial (Selman *et al*, 2001); ejemplos de agentes conocidos son la inhalación de partículas inorgánicas (asbestos, sílice), la inhalación de partículas orgánicas (hongos, bacterias termofílicas, proteínas aviarias), la exposición a radiaciones, el uso de ciertos medicamentos (bleomicina, amiodarona). La fibrosis pulmonar puede también ser secundaria a enfermedades sistémicas como la esclerosis sistémica progresiva o la artritis reumatoide. Sin embargo, en muchos casos el agente etiológico se desconoce y a esta fibrosis se le denomina: fibrosis pulmonar idiopática (FPI). (Pardo, Selman, 2002; Coker, Laurent, 1998, Gauldie *et al* 2002)

La respuesta fibrosante presenta una serie de mecanismos comunes independientemente de la enfermedad que le dio origen (Selman 1996, McGrath, Barnes 1982, Kunkel, Strietel 1997).

En este contexto, se pueden mencionar por lo menos cuatro eventos que participan en la fibrogénesis, sin tener límites definidos entre ellos y sobreponiéndose unos con otros:

- Daño extensivo de células endoteliales y epiteliales sin una adecuada reepitelización (este último muy importante en FPI).
- Inflamación heterogénea, inicialmente mediada por leucocitos polimorfonucleares (PMN) y posteriormente por células mononucleares, pero con la presencia constante de granulocitos.
- Proliferación de fibroblastos e incremento de células cebadas intersticiales.
- Alteraciones en el metabolismo de las moléculas de la matriz extracelular, en especial de las colágenas fibrilares caracterizada por un incremento en su síntesis y disminución en la degradación (Selman *et al*. 1989).

El efecto principal del daño es la inducción de cambios genéticos y estructurales en los tipos de colágenas específicas que forman la matriz extracelular. Esto se observa

## **Introducción**

principalmente con las colágenas intersticiales, donde existe un incremento de las colágenas del tipo III y VI en fases tempranas, y de las tipo I y V en las etapas avanzadas, cuando el proceso se torna irreversible. En general, el depósito excesivo de colágenas se debe a que la síntesis de éstas moléculas, provocada por la proliferación y transformación de fibroblastos en las etapas iniciales del daño, excede su degradación (Selman 1996).

### ***Factor de crecimiento transformante beta***

Una característica fundamental en la fibrosis pulmonar es la proliferación de fibroblastos y la aparición de fenotipos alterados de los mismos (miofibroblastos). Los miofibroblastos muestran un potencial incrementado para producir matriz extracelular, así como una disminución en la secreción de factores de crecimiento para células epiteliales alveolares del tipo II (encargadas de repoblar los neumocitos tipo I). Además, producen factores pro-apoptóticos para células epiteliales (Uhal *et al*, 1995), uno de ellos identificado como angiotensinógeno (Wang *et al*. 1999).

Un modulador muy importante en el cambio de fenotipo de fibroblastos a miofibroblastos es el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) el cual se encuentra en grandes cantidades en plaquetas y es sintetizado por células inflamatorias y residentes como por ejemplo, macrófagos, neutrófilos, keratinocitos, y fibroblastos (Frank *et al* 1996).

Existen diversas evidencias que sugieren que este factor desempeña un papel relevante en el desarrollo de fibrosis. Entre estos destacan: a) el daño al epitelio incrementa la producción de TGF- $\beta$  el cual precede al aumento en el depósito de MEC; b) los niveles de TGF- $\beta$  y de RNAm de TGF- $\beta$  se encuentran elevados en diferentes órganos fibróticos; c) la aplicación exógena de TGF- $\beta$  induce fibrosis independientemente de daño tisular; d) inhibidores de unión de TGF- $\beta$  al receptor reducen o abaten la fibrosis.

Como se mencionó previamente, algunos estudios han demostrado que el TGF- $\beta$  puede alterar el fenotipo y función de fibroblastos normales y mediar su cambio

## **Introducción**

fenotípico hacia miofibroblastos, los cuales son células que expresan  $\alpha$ -actina característica de músculo liso. Este cambio, se ha relacionado con el desarrollo de fibrosis renal tubulointersticial o secundaria a glomerulonefritis, con la fibrosis pulmonar y la hepática. (Goumenos *et al* 2002)

El TGF- $\beta$  es un miembro de una familia de factores de crecimiento polipeptídicos diméricos que incluye proteínas morfogénicas de hueso y activinas. Prácticamente todas las células del organismo lo producen y tienen receptores para TGF- $\beta$  el cual tiene numerosos efectos. Así por ejemplo, regula la proliferación y diferenciación celular, desarrollo embrionario, reparación de heridas, y angiogénesis entre otros. Asimismo, los incrementos o decrementos en su producción están ligados a numerosas enfermedades, incluyendo arteriosclerosis y fibrosis de riñón, hígado y pulmón. (Blobe *et al* 2000)

Se ha demostrado que el contenido total de TGF- $\beta$ 1 en pulmón de ratas con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, es varias veces mas alto que en ratas normales. La producción incrementada de TGF- $\beta$ 1 precede la síntesis de colágenas, proteoglicanos, y fibronectina. Asimismo, en humanos con FPI el TGF- $\beta$  se incrementa y se localiza en el epitelio alveolar y en las paredes alveolares en los sitios donde se acumula MEC (Khalil N *et al*, 1991). En el lavado bronquioalveolar se encuentra 10 veces mas RNAm de TGF- $\beta$ 1 en pacientes con enfermedades autoinmunes y fibrosis que en individuos sanos o pacientes con asma. (Border *et al* 1994) Además de contribuir al cambio de fenotipo de los fibroblastos a miofibroblastos, el TGF- $\beta$  contribuye en los procesos fibrosantes porque estimula la síntesis y depósito de colágenas intersticiales y altera el balance entre las metaloproteinasas de matriz y sus inhibidores. (Eickelberg *et al*, 1999)

Existen 3 isoformas de TGF- $\beta$  codificados por diferentes genes y con patrones de expresión distintos: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 (Khalil, 2001). La homología entre las tres isoformas es de 64 a 85% (Frank *et al* 1996). La primera se expresa en células endoteliales, hematopoyéticas y de tejido conectivo. La segunda en células neurales y epiteliales y el subtipo 3 en células del mesénquima. Todas las variedades se

## **Introducción**

sintetizan como precursor que contiene una región propéptido adicional al TGF- $\beta$ . En pulmones normales la isoforma mas abundante es la de TGF- $\beta$ 1 y se encuentra expresada en los fibroblastos intersticiales y macrófagos alveolares, pero en los pulmones que desarrollan fibrosis el TGF- $\beta$ 1 se sobreexpresa en nuevos tipos celulares incluyendo a células epiteliales y endoteliales. El TGF- $\beta$  es liberado del propéptido antes de ser secretado por la célula pero se mantiene unido a él por fuerzas no covalentes. Una vez secretado se almacena en la matriz extracelular como un complejo de TGF- $\beta$ , propéptido y una proteína que mantiene su latencia llamada proteína de unión a TGF- $\beta$ -latente. La unión de la citocina a esta proteína mediante enlaces disulfuro impide su unión al receptor. El TGF- $\beta$  se activa al ser liberado por la glucoproteína multifuncional de matriz trombospondina-1 y por plasminas. La excepción en los mecanismos de liberación son las plaquetas que almacenan al TGF- $\beta$  activo en gránulos intracelulares que se secretan con la activación plaquetaria.

Se han encontrado 3 receptores para TGF- $\beta$  (Lutz M *et al*, 2002). El mas abundante es el tipo III que se une a la citocina y la transfiere a los receptores transductores tipo I y II. Estos últimos contienen en el dominio intracelular una cinasa que fosforila residuos de serina y treonina de factores de transcripción de la familia de los Smads. Después de la unión al ligando, el complejo receptor activado con TGF- $\beta$  interactúa transitoriamente con Smad2 y Smad3 iniciando los mecanismos de señalización intracelular. Smad2 y Smad3 fosforilados interactúan con Smad4 formando complejos que se traslocan al núcleo donde funcionan como factores de transcripción al unirse a la secuencia consenso CAGA en el promotor COL1A2 para colágena, y de los genes PAI-1 y junB entre otros.

El TGF- $\beta$  es un potente regulador de producción y depósito de matriz extracelular. Estimula a los fibroblastos y otras células para producir MEC y proteínas de adhesión celular, incluyendo colágenas intersticiales, fibronectina e integrinas y es quimiotáctica para neutrófilos y fibroblastos. También inhibe la producción de moléculas que degradan la MEC como colagenasa, heparinasa y estromielisina e incrementa la producción de enzimas que inhiben a las proteínas que degradan la MEC

## **Introducción**

incluyendo inhibidor tipo 1 del activador de plasminógeno y las TIMP's (Blobe *et al* 2000). Adicionalmente, puede producir apoptosis en distintos tipos celulares mediante activación de caspasas, sobreexpresión de p21 y represión de Bcl-xL (Hagimoto *et al* 2002)

En modelos de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y glomerulonefritis proliferativa de ratas se ha demostrado que la administración de anticuerpos contra TGF- $\beta$ , receptores solubles, el inhibidor decorina y la sobreexpresión de Smad7 restringe la fibrosis, por lo que se ha especulado que la terapia más efectiva será la que logre disminuir los niveles de expresión de TGF- $\beta$  como por ejemplo la administración de interleucina-7 la cual parece disminuir la producción de TGF- $\beta$  solo en pacientes fibróticos y aumenta la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en homogenados de pulmón murino con fibrosis inducida por bleomicina (Ghosh *et al* 2001, Blobe *et al* 2000).

### ***Interferón gamma***

Los interferones se describieron originalmente como moléculas capaces de proteger a las células de infecciones virales. Se han agrupado en dos categorías de acuerdo a su origen celular, estructura genética y propiedades biológicas. Los interferones de tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) se inducen como resultado de infecciones virales principalmente en fibroblastos y leucocitos (Nguyen *et al*, 2002).

El interferón de tipo II, está representado por el IFN- $\gamma$ , el cual es un homodímero no covalente que consiste de dos cadenas de 17 kDa, asociados de modo antiparalelo. La principal función del IFN- $\gamma$  es la regulación del sistema inmune. El IFN- $\gamma$  es producido por linfocitos T y células asesinas naturales en respuesta a estímulos antigénicos. (Bach *et al* 2000)

Se han caracterizado dos familias de proteínas involucradas en la señalización de IFN- $\gamma$ : las proteínas STAT y proteín-tirosín cinasas de la familia Janus (JAKs). Una vez estimulado el receptor, el dominio citoplásmico fosforilado en una tirosina de Stat1 $\alpha$  forma complejos homodiméricos que se pueden traslocar al núcleo y unirse

## **Introducción**

directamente con sitios palíndromes  $\gamma$ -activados (GAS) de los promotores para genes inducidos por IFN- $\gamma$  (Peilot *et al*, 2000).

El IFN- $\gamma$  se considera una molécula antifibrosante ya que, entre otros efectos, es un potente inhibidor de la transcripción de colágenas intersticiales e incluso inhibe la síntesis de colágenas inducida por TGF- $\beta$  (Ziesche *et al*, 2000). En este contexto, se considera que estas dos citocinas presentan efectos antagónicos en relación a la fibrogénesis. Estas dos citocinas se secretan en el sitio de inflamación, y sus interacciones antagonistas son determinantes en el mantenimiento de la homeostasis del tejido conjuntivo. Aparentemente la regulación antagonista de la transcripción de COL1A2 se integra en el núcleo en donde Stat1 $\alpha$  y Smad3 compiten por una cantidad limitada de p300/CBP (Ghosh *et al* 2001).

### ***Apoptosis***

La apoptosis, o muerte celular programada es un proceso fisiológico fundamental en organismos multicelulares para mantener el número apropiado de diferentes tipos celulares en un órgano, modelar la anatomía y destruir células malignas o infectadas. Este proceso sin embargo, cuando no es apropiadamente regulado puede provocar alteraciones patológicas. En términos generales, la apoptosis participa en enfermedades humanas de 2 modos diferentes:

- La enfermedad puede aparecer por disminución de los mecanismos apoptóticos. La reparación de tejidos después de un daño requiere de la eliminación de células inflamatorias y mesenquimatosas que han participado en el proceso para evitar la autoperpetuación de la inflamación o la persistencia de los eventos fibrosantes.
- La apoptosis excesiva causa daño. Por ejemplo, la inyección intraperitoneal de anticuerpo anti-Fas es hepatotóxica y produce la muerte en ratones adultos, y la inhalación repetida del anticuerpo induce la apoptosis de células epiteliales alveolares que resulta en inflamación y fibrosis en ratones. (Kuwano *et al* 1999). Asimismo, se considera que la apoptosis descontrolada de células epiteliales

## **Introducción**

alveolares participa en la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática (Uhal *et al*, 1995, 1998).

El mecanismo de transducción de la apoptosis comienza con la recepción de una señal de muerte, principalmente la unión del ligando al receptor Fas (FasL) o al TNF. La unión del ligando con su receptor provoca la aglutinación de varios receptores, permitiendo la asociación de algunas proteínas adaptadoras que se unen en la cara citoplásmica con el receptor y con las proteínas procaspasas.

Las procaspasas unidas a las proteínas adaptadoras son procesadas por proteasas que cortan en sitios específicos transformándolas en caspasas, las cuales tienen propiedades proteolíticas y nucleolíticas. La activación de estas enzimas provoca la destrucción de la célula en pequeños cuerpos denominados cuerpos apoptóticos que son fagocitados por las células vecinas sin inducir una respuesta inflamatoria. (Aravind *et al* 1999)

### ***Bases de la hipótesis de este estudio***

Una característica morfológica de la fibrosis pulmonar idiopática es la presencia de focos de fibroblastos/miofibroblastos los cuales son los principales responsables de la destrucción del parénquima pulmonar. En general, estos focos están constituidos por fibroblastos, miofibroblastos, y matriz extracelular laxa, y prácticamente no se encuentran células inflamatorias. Linfocitos y algunas otras células inflamatorias se pueden apreciar en la periferia de estos focos, pero no en su interior (figura 1). Como estas células son las principales productoras de IFN- $\gamma$  se puede especular que su ausencia dentro del foco de fibroblastos/miofibroblastos representa una alteración en la regulación del comportamiento de las células mesenquimatosas en el sitio de lesión. En un trabajo previo realizado en colaboración entre el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, y la Universidad de Illinois, Chicago, se demostró tanto *in vitro* (Uhal *Et al*, 1995; Wang *Et al*, 1999) como *in situ* (Uhal *Et al*, 1998), que los fibroblastos aislados de pulmones fibróticos (FPI) secretan factores que inducen la muerte celular programada en células del epitelio alveolar pulmonar (figura 2). A la fecha se desconoce si los fibroblastos/miofibroblastos de estos focos producen

## Introducción

factores inductores de apoptosis para linfocitos, y si este podría ser uno de los mecanismos por el cual se mantienen estos focos.

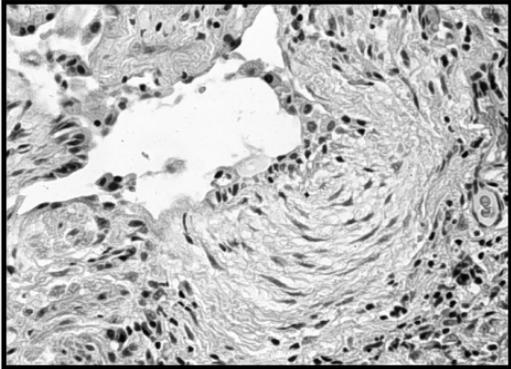


Fig. 1. Foco de fibroblastos / miofibroblastos. Nótese la ausencia de células inmunocompetentes en el interior de este foco fibrótico, y la localización de las mismas en la periferia.

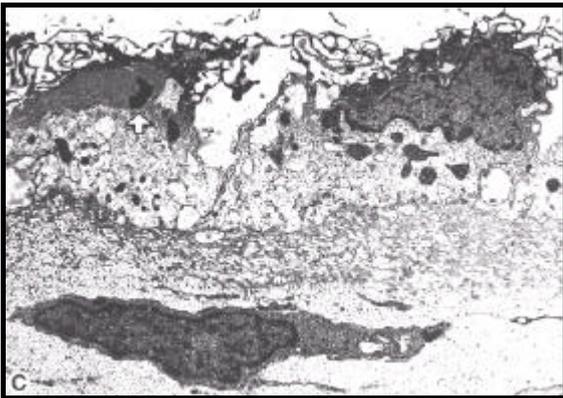


Fig 2. Célula epitelial alveolar en apoptosis (flecha) adyacente a un miofibroblasto en un paciente con FPI. El fibroblasto (F) subepitelial no se encuentra en zonas del mismo tejido que no presenten daño epitelial (Uhal *et al*, 1998).

## **Hipótesis**

1. Medios de cultivo condicionados por fibroblastos de pulmones normales no estimulados no inducen apoptosis de linfocitos.
2. Fibroblastos de pulmones normales activados con el factor de crecimiento transformante beta secretan factor(es) en el medio de cultivo que inducen la apoptosis de linfocitos.
3. Fibroblastos derivados de pulmones fibróticos secretan factor(es) en el medio de cultivo que inducen la apoptosis de linfocitos.

## **Objetivos**

Determinar si los fibroblastos activados con factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) secretan moléculas de apoptosis para linfocitos T y comparar la inducción de apoptosis con medios condicionados por fibroblastos normales sin estímulo y estimulados con interferón gamma (IFN- $\gamma$ )

Determinar si medios de cultivo condicionados por fibroblastos obtenidos de pulmones con fibrosis pulmonar idiopática inducen la apoptosis de linfocitos.

### **Diseño Experimental.**

#### **1. Obtención y cultivo de fibroblastos.**

Los fibroblastos fueron obtenidos de biopsias pulmonares de pacientes con enfermedades no fibrosantes o con fibrosis pulmonar idiopática en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Se recuperó de 1 a 3 gramos de tejido en PBS frío y se fragmentó en pedazos menores a  $1 \text{ mm}^3$  que se incubaron con 20  $\mu\text{l}$  de tripsina porcina y EDTA durante 20 minutos. Se centrifugó la solución que contenía las células a 100 g durante 2 minutos y se colectó el sobrenadante. Las células fueron centrifugadas a 400 g durante 4 minutos y se resuspendió el paquete celular en medio F12 de Ham suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina (200 U/ml) y estreptomycin (200 mg/ml). Los fibroblastos se sembraron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en el mismo medio de cultivo.

#### **2. Estimulación de los fibroblastos con TGF- $\beta$ y con IFN- $\gamma$**

Antes de que los fibroblastos llegaran a confluencia, se adicionaron 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 ó 1000 U/ml de IFN- $\gamma$  humano disueltos en medio de cultivo fresco libre de suero. En los primeros experimentos el medio condicionado se colectó a las 24 horas para el ensayo de apoptosis de linfocitos; en experimentos posteriores se cambió el medio de cultivo a las 24 horas y se colectó el nuevo medio libre de citocinas pasadas 24 ó 48 horas. Los medios condicionados fueron preservados a  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  o se utilizaron en fresco.

#### **3. Obtención de linfocitos de sangre periférica por el método de Ficoll.**

Se obtuvieron 20 ml de sangre de individuos sanos por la vena mediana del codo en una jeringa estéril humedecida con heparina. Se diluyó 1:3 en PBS y se colocaron lentamente 6 ml de la suspensión en tubos cónicos de 15 ml que contenían 3 ml de Ficoll libre de endotoxina.

## **Diseño Experimental**

Se centrifugaron a 300 g por 30 minutos a temperatura ambiente. Se colectó la interfase rica en linfocitos y monocitos utilizando una pipeta Pasteur, tomando lo menos posible de Ficoll o plasma.

Se lavó la muestra colectada en 50 ml de PBS y se centrifugó 10 min a 200 g. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y resuspendió el paquete celular en 1 ml de PBS, de donde se tomaron 10  $\mu$ l para conteo celular y para determinar la viabilidad por azul tripano. Después se siguió alguno de los siguientes pasos:

1. *Criopreservación:* Se resuspendieron las células mononucleares en suero fetal de bovino a una concentración entre 1 y 5 x 10<sup>6</sup> células/ml y se 1:10 de DMSO. Se fraccionó la mezcla en crioviales y se congeló a -70 °C durante 24h para posteriormente ser almacenadas en nitrógeno líquido entre una semana hasta varios meses.

2. *Células en fresco:* Las células mononucleares se diluyeron en medio de cultivo RPMI a una concentración entre 1 y 2 x 10<sup>6</sup> células/ml y se sembraron en cajas de Petri durante 2 horas para permitir la adherencia de los monocitos al vidrio. Se recuperaron las células en suspensión (los linfocitos) en un tubo de 50 ml y se centrifugaron a 300 x g durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 ml de medio AIM-V libre de suero. Se repitió el conteo celular y se ajustó la concentración a 2 millones de células por mililitro.

### **4. Estimulación de linfocitos por medios de cultivo condicionados.**

En el caso de las células congeladas, éstas se descongelaron a 37 °C agregando medio de cultivo RPMI y se sembraron en cajas de Petri durante 2 horas a una concentración de 1 a 2 millones de células/ml. Se recuperaron las células en suspensión y se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos. Se resuspendió el botón celular en 1 ml de medio de cultivo AIM-V con o sin albúmina y se ajustó la concentración celular a 2 x10<sup>6</sup> células/ml.

## **Diseño Experimental**

En otros experimentos, se utilizaron células en fresco según se describió en la sección anterior.

Se adicionó el medio condicionado de los fibroblastos derivados de pulmones fibróticos ó normales, estos últimos expuestos a TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  (experimental) o no expuestos (testigo) al cultivo de linfocitos en concentraciones de 1:2, 1:5 y 1:10. Las células se incubaron a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% durante 6, 12, 16 y 20 horas para el ensayo de apoptosis, y durante 48 y 72 horas para determinar la proliferación y activación celular.

### **5. Ensayo de proliferación**

Para determinar si los medios condicionados estimulan la proliferación de linfocitos, se suspendieron  $2 \times 10^5$  células en una mezcla 1:1 de medio de cultivo AIM-V y medio condicionado por fibroblastos normales sin estímulo o estimulados con TGF- $\beta$ , e IFN- $\gamma$ . En experimentos independientes se cultivaron las células durante 24 y 48 horas, después de las cuales se agregaron 20  $\mu$ l una dilución 1:10 de trinucleótido de timidina marcado radioactivamente con tritio cuya actividad era de 5  $\mu$ Ci en medio de cultivo RPMI, y se cosechó a las 24 horas de haber sido marcadas ( 48 y 72 horas de cultivo). Se cuantificó la incorporación de timidina tritiada al DNA en un contador de centelleo líquido. Como controles se utilizaron medio AIM-V sin suero (indicador de la proliferación basal) y el mismo con 5 y 10 ng/ml TGF- $\beta$  ó 1000 U IFN $\gamma$  para simular la citocina que pudiera encontrarse residual en el medio condicionado.

### **6. Ensayo de Activación de linfocitos**

Se determinó si los medios condicionados inducían la activación de linfocitos mediante el análisis de la presencia de moléculas de superficie CD25 (receptor de IL-2), CD69 (marcador de activación temprana) y CD152 (CTLA-4, marcador de activación que se une a CD80) en las poblaciones de linfocitos T CD4+ (linfocitos T facilitadores) y CD8+ (linfocitos T supresores/citotóxicos) estimulados con los diferentes medios condicionados por fibroblastos normales, sin estímulo o estimulados con TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  de acuerdo a la siguiente metodología:

## **Diseño Experimental**

- a) Se lavaron las células obtenidas de los cultivos con los medios condicionados en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con BSA al 1%, se centrifugaron a 650 g durante 10 minutos y se resuspendieron en 50  $\mu$ l de la misma solución.
- b) Se incubaron 30 minutos con 5  $\mu$ l de solución de anticuerpos anti-CD3, CD4, CD8, CD25, CD69 y CD152 marcados con diferentes combinaciones de fluorocromos.
- c) Se lavaron en el buffer PBS-BSA dos veces centrifugando a 650 g durante 10 minutos cada vez.
- d) Se resuspendieron en 500 ml de amortiguador PBS con paraformaldehído al 1%.
- e) Se analizaron en el citómetro de flujo FACScan con el programa CellQuest (Becton Dickinson)

### **7. Ensayo de Apoptosis**

Los linfocitos cultivados con los distintos medios condicionados se colectaron para determinar el número de células apoptóticas mediante citofluorometría, por las técnicas de Anexina V y por el estuche comercial APO-BrDU.

#### **Determinación de apoptosis con el estuche comercial APO-BrDU.**

Se fijaron las células con paraformaldehído al 1% en PBS de acuerdo al siguiente procedimiento:

- a) Se suspendieron de 0.5 a 2 x 10<sup>6</sup> células en 0.5 ml de PBS.
- b) Se añadió 0.5 ml de paraformaldehído al 1% en PBS y se mantuvo un mínimo de 15 min en hielo.
- c) Se centrifugó a 300 g durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante.
- d) Se lavó en 5 ml de PBS.
- e) Se resuspendieron las células fijadas en 0.5 ml de PBS.
- f) Se añadió 5.0 ml de etanol al 70% frío. Se dejó reposar por lo menos 30 min a 4°C.\*

Posteriormente:

---

\* El los primeros experimentos se utilizó la técnica completa para fijar los linfocitos, pero debido a la pérdida excesiva de células se decidió fijar las células directamente en etanol como se describe en f).

## **Diseño Experimental**

- a) Se resuspendieron  $1 \times 10^6$  células control positivas y negativas incluidas en el estuche de detección, junto con las experimentales en tubos de centrifuga para citometría de flujo. Se centrifugaron a 300 g durante 5 min y se retiró el etanol por aspiración, sin remover el botón celular.
- b) Se resuspendió el botón celular de cada tubo en 1 ml de buffer de lavado. Se recentrifugó y lavó en la misma solución una vez.
- c) Se resuspendieron las células en 50  $\mu$ l de la solución de tinción para DNA que se describe a continuación, y se incubaron durante 60 minutos a 37°C con agitación constante.

<b>Solución de tinción para DNA</b>	<b>ml para un ensayo</b>
Amortiguador de reacción	10.0
Enzima TdT	0.75
Br-dUTP	8.0
Agua desionizada	32.25
Volumen total	51.0

- d) Se añadió 1.0 ml de la solución amortiguadora a cada tubo, y se centrifugó a 300 g por 10 minutos. Se removió el sobrenadante por aspiración.
- e) Se resuspendió el botón celular en 0.1 ml de la solución de anticuerpos (5  $\mu$ l de anti Br-dUTP conjugado con FITC en 95  $\mu$ l de solución amortiguadora por cada tubo), y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad.
- f) Se añadieron 0.5 ml de la solución PI/RNAsa A a cada tubo y se incubó durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente.
- g) Se analizaron las células por citometría de flujo.

## **Diseño Experimental**

### Determinación de apoptosis por Anexina V.

Para determinar el número de células en apoptosis por unión de Anexina V a fosfatidilserina en la cara externa de la membrana lipídica se llevó a cabo la siguiente metodología:

- a) Se colectaron entre  $5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  linfocitos estimulados con los medios de cultivo condicionados en tubos para citometría de 5 ml. Se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos.
- b) Se lavó el botón celular con amortiguador de Hepes.
- c) Se volvió a centrifugar y se desechó el sobrenadante.
- d) Se resuspendieron las células en la siguiente solución:

Buffer Hepes	100 $\mu$ l
Anexina V unida a FITC (Roche)	20 $\mu$ l
Yoduro de Propidio	20 $\mu$ g.

Se incubaron durante 15 minutos a 4°C y se analizaron 10,000 eventos por tubo en un citómetro de flujo FACScan utilizando el programa CellQuest. Se determinaron las células apoptóticas mediante el análisis de histograma de la intensidad neta para FITC (unida a anexina).

### **8. Análisis Estadístico.**

Los datos se expresan en promedio  $\pm$  desviación estándar de por lo menos tres experimentos independientes. Los datos se analizaron con la prueba de ANOVA y la significancia estadística se determinó mediante comparaciones múltiples de Fisher. Una P menor de 0.05 se consideró significativa.

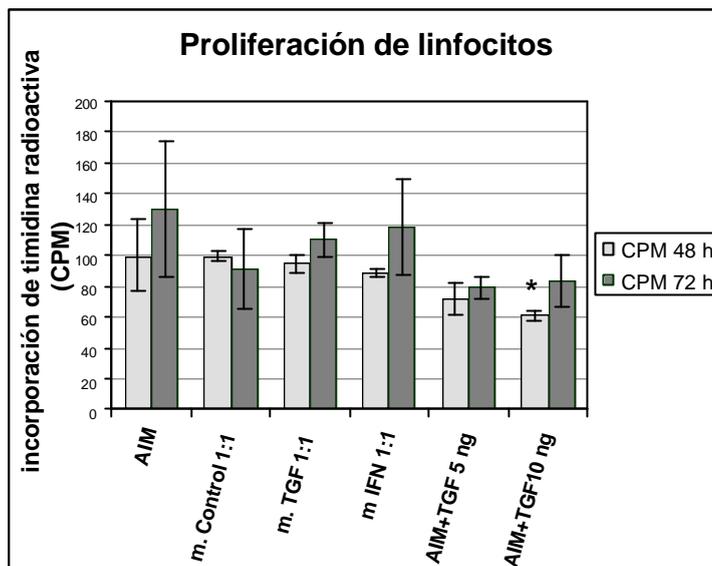
## Resultados.

### 1. Proliferación.

La capacidad de los medios condicionados para activar la proliferación de linfocitos a 48 y 72 horas de cultivo, expresada como actividad radioactiva (CPM) debida a timidina tritiada incorporada al DNA se muestra en la tabla 1 y figura 1. Se añadió un marcador de proliferación basal (medio de cultivo AIM-V) y un mitógeno como control positivo (fitohemaglutinina o PHA, mostrada en la tabla mas no en la gráfica 1 ya que supera la escala por varias ordenes de magnitud).

<i>Medio de cultivo</i>	<i>CPM 48 h</i>	<i>CPM 72 h</i>
AIM (proliferación basal)	99.7±23.1	130.0±43.9
medio condicionado Control 1:1	99.5±3.5	91.0±25.7
medio condicionado TGF 1:1	94.7±6.1	110.0±11.3
medio condicionado IFN 1:1	89.0±2.6	118.0 ±31.4
AIM +TGF 5 ng	71.3±10.6	79.0±7.1
AIM +TGF10 ng	60.7±3.1*	83.0±13.8
medio condicionado control + PHA (control positivo)	6399.7±1205	30109.3±2943

**Tabla1.** Radioactividad producida por la incorporación de timidina tritiada al DNA genómico a 48 y 72 horas de cultivo.



**Figura 1.** Gráfico de incorporación de timidina tritiada al DNA genómico de linfocitos estimulados con distintos medios de cultivo 48 y 72 horas.

A las 48 horas de cultivo se observó una disminución en la proliferación de linfocitos cultivados con medio AIM-V que contenía 10 ng/ml de TGF-β1 con respecto al medio definido AIM-V y al medio condicionado por fibroblastos normales sin estímulos (medio control) :p=0.004. Sin embargo, esta inhibición de la proliferación no se mantuvo a las 72 horas. Al comparar los grupos de estudio con un control positivo fitohemaglutinina sobre medio condicionado control (no graficado) observamos que las diferencias entre los grupos experimentales se tornan insignificantes: p=3.9x10<sup>-10</sup> para la prueba de F en cuyo caso todos los demás grupos son estadísticamente iguales en comparaciones de Tukey-Kramer.

### 2. Activación.

Para determinar si los medios condicionados inducen la activación de linfocitos normales, se analizó la expresión de tres marcadores de activación (CD25, CD69 y CD152) sobre cultivos de linfocitos expuestos a los medios condicionados por fibroblastos normales sin estimular (medio control), y estimulados con TGF- $\beta$  (medio condicionado TGF- $\beta$ ) e IFN- $\gamma$  (medio condicionado IFN- $\gamma$ ) en diluciones 1:5 por 72 horas. Los porcentajes de células que son CD3 positivas que contienen los marcadores de activación se muestran en la figura 2.

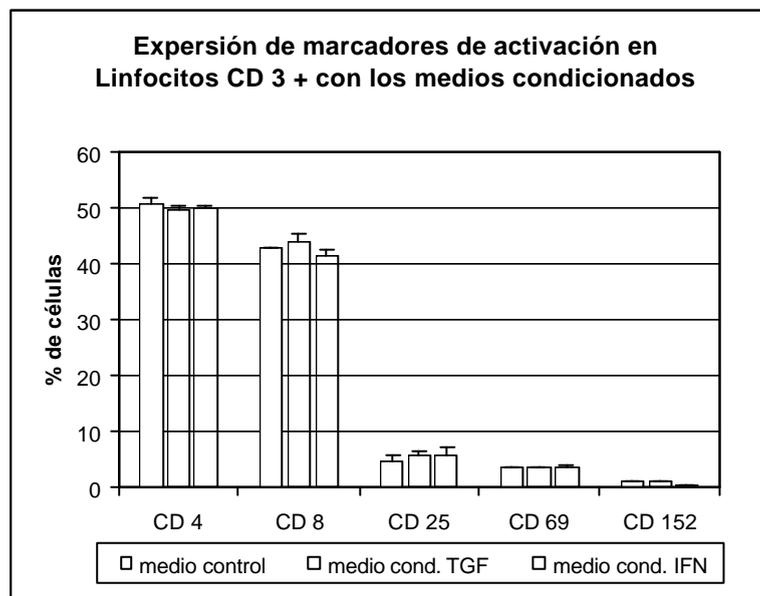


Fig 2. Expresión de las moléculas de superficie CD25, CD69 y CD152 en linfocitos CD3+

En los linfocitos estimulados con los medios condicionados no se observó un aumento significativo de ninguno de los marcadores de activación

Los resultados indican que los medios condicionados no estimulan a los linfocitos T.

### **3. APOPTOSIS**

Para llevar a cabo la determinación de apoptosis de linfocitos sometidos a diversos estímulos se tuvieron que hacer varias pruebas preliminares hasta que se obtuvo un ensayo reproducible. El primer problema que se enfrentó fue la pérdida excesiva de células que ocurría durante la fijación una vez que había concluido el tiempo de estimulación para aplicar el ensayo de tinción de DNA fragmentado mediante incorporación de un análogo de nucleótido que posteriormente era detectado por unión de un anticuerpo fluorescente. Las primeras adquisiciones se realizaron partiendo de  $7.5 \times 10^5$  células pero debido probablemente a las repetidas centrifugaciones se llegaba al paso final con un número inferior a las 5 mil células por ensayo.

Con un número tan reducido de células se observó que los resultados eran poco consistentes, además de que la muestra adquirida era poco significativa para evaluar el comportamiento global de los linfocitos estimulados.

Para mantener un buen número de células desde el momento de cosecharlas hasta el momento de adquirirlas en el citómetro de flujo, se varió el método de fijar las células. Inicialmente, se siguieron las instrucciones del manual del estuche comercial que consistía en una fijación en paraformaldehído seguida de dos lavados en PBS para almacenarlas finalmente en etanol al 70%. Posteriormente, se decidió fijar las células directamente en etanol frío con agitación constante, lo que dio muy buenos resultados por lo que fue el método finalmente adoptado.

Otro cambio que ayudó a mantener la concentración celular sin pérdidas importantes fue el de recoger los sobrenadantes de cada centrifugación por aspirado en lugar de decantación, procurando dejar siempre un pequeño volumen de solución para no resuspender accidentalmente el botón celular.

El segundo problema que se enfrentó fue definir correctamente el rango de células íntegras y células apoptóticas en el histograma de fluorescencia para anti-BrDU-FITC (unido a cadena rota de DNA), ya que no se contaba con los controles positivo y negativo. Se intentó hacer un control positivo con dexametasona pero nunca se

## **Resultados**

encontró la concentración adecuada para inducir apoptosis de linfocitos. Finalmente, se ensayó el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y se encontró que una dilución al 5% de peróxido induce la apoptosis de la mayoría de linfocitos en cultivo y es un excelente control positivo.

El mejor control negativo fueron las células en fresco, donde se encontró menos del 1% de células en apoptosis al tiempo cero.

Los resultados de las pruebas de Apo-BrDU y Anexina que se muestran a continuación se obtuvieron con las condiciones de cultivo más adecuadas después de probar diferentes condiciones de optimización dosis-respuesta y tiempo-respuesta. Así, la inducción de apoptosis se analizó utilizando medios de cultivo condicionados de fibroblastos en fresco (sin congelación previa) a una dilución de 1:5. Los linfocitos utilizados en el ensayo también eran frescos y se incubaron en medio de cultivo definido para linfocitos AIM-V suplementado con BSA y libre de suero; finalmente, el análisis citofluorométrico se realizó a las 20 horas de cultivo en presencia del medio condicionado de fibroblastos. En el caso de fibroblastos normales se utilizaron 3 líneas diferentes. En el caso de los fibroblastos provenientes de pulmones fibróticos se analizaron cultivos primarios de 3-4 diferentes pulmones.

## Resultados

### ApoBrDU.

El porcentaje de células en apoptosis inducida en los linfocitos estimulados con diferentes medios de cultivo se muestran en la tabla y gráfico y tabla 3.

Estímulo	Numero de experimentos	% de células en apoptosis a 20 horas
Medio de cultivo solo	3	12.5 ± 1.3
Medio control	3	10.4 ± 2.7
Medio TGF-β	3	10.2 ± 1.8
Medio IFN-γ	3	9.2 ± 1.7
Medio de fibroblastos fibróticos	3	26.7 ± 5.9

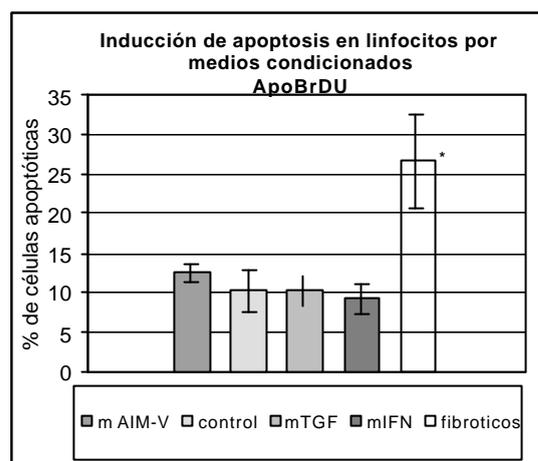


Tabla y gráfico 3. Inducción de apoptosis en linfocitos a 20 horas de cultivo con medios condicionados y basal (AIM-V).

El análisis de varianza demostró que los medios condicionados de fibroblastos obtenidos de pulmones fibróticos inducían un incremento significativo de apoptosis en linfocitos ( $p < 0.01$ ). Entre los demás grupos no se observaron diferencias.

## Resultados

### Anexina

Los resultados en la inducción de apoptosis por los distintos medios condicionados por fibroblastos obtenidos de pulmones normales sin estímulo, estimulados con TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  y sobrenadantes de medios de cultivo condicionados por fibroblastos de pulmones fibróticos se muestran en la tabla y gráfico 4. Se definió el tiempo de cultivo de linfocitos en 20 horas por ser el tiempo máximo hasta el cual la apoptosis basal se sostiene en límites similares. A tiempos mayores, se observa un incremento en la apoptosis basal lo que tiende a enmascarar la apoptosis inducida. La dilución de medio condicionado con medio definido para linfocitos fue 1:5, como en el experimento anterior.

Estímulo	Número de experimentos	% de apoptosis a 20 horas
medio de cultivo solo	4	8.5 $\pm$ 1.8
medio control	4	8.2 $\pm$ 1.2
medio TGF- $\beta$	4	9.2 $\pm$ 1.8
medio IFN- $\gamma$	4	8.3 $\pm$ 3.1
medio de fibroblastos fibróticos	9	25.0 $\pm$ 4.6
TGF- $\beta$ en medio de cultivo AIM-V (5ng/ml)	1	8.4
IFN- $\gamma$ en medio AIM-V	1	16.3

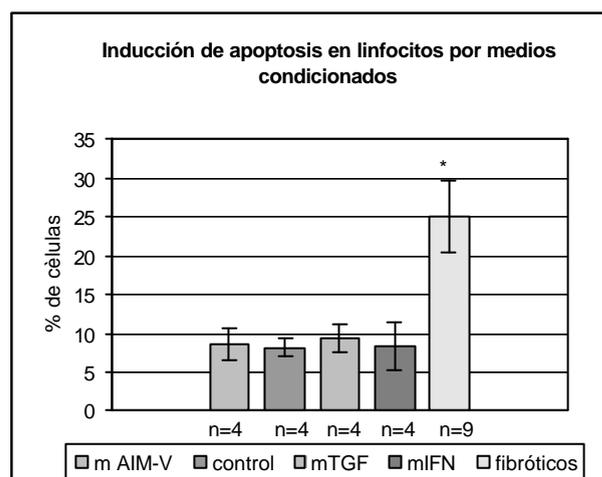


Tabla y gráfico 4. Porcentaje de linfocitos en apoptosis medidos por el método de Anexina V después de 20 horas de estímulo con medios condicionados.

La apoptosis aumentó significativamente en los linfocitos estimulados con sobrenadante de fibroblastos derivados de pulmones con fibrosis pulmonar idiopática (F=34.98, p<0.01). No se observaron diferencias entre los otros grupos en estudio,

## Resultados

donde el porcentaje de células en apoptosis resultó similar al basal. Un ejemplo de las diferencias densitométricas observadas entre líneas de fibroblastos normales y de pulmón fibrótico se ilustra en la figura 5.

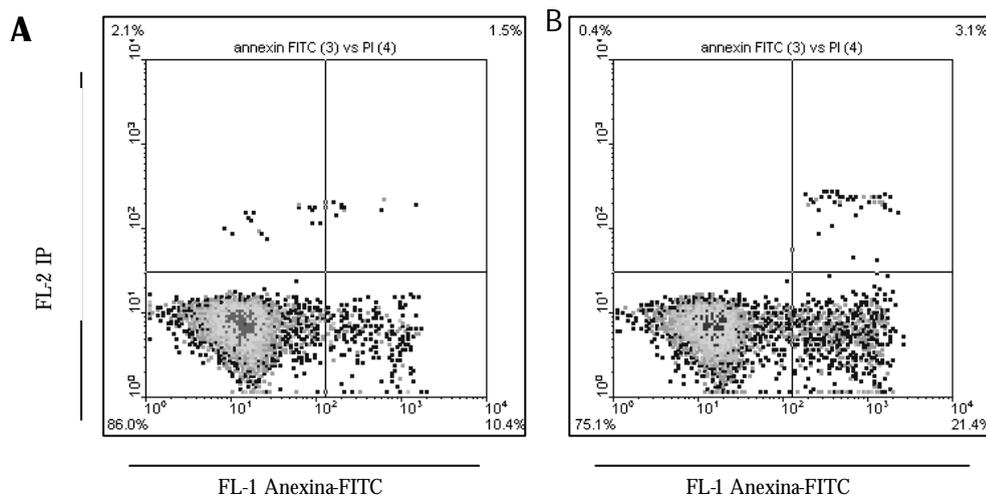


Fig.5. Gráfica densitométrica de Anexina-FITC contra yoduro de propidio (IP) correspondientes a linfocitos estimulados con A: sobrenadantes de fibroblastos normales y B: sobrenadantes de fibroblastos de pulmones fibróticos. Los cuadrantes en la gráfica muestran el estado de las células a las 20 horas de cultivo:

Inferior izquierdo -células integra.

Inferior derecho - células en apoptosis

Superior izquierdo- DNA desnudo

Superior derecho - Células necróticas o en las últimas etapas de apoptosis.

Los cuadrantes fueron reasignados de acuerdo a los controles positivo y negativo del experimento para determinar el porcentaje de células en cada etapa reportada en la tabla 4.

### Discusión

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad pulmonar incapacitante y progresiva cuyos mecanismos patogénicos no se conocen con precisión. En particular, los eventos responsables del desarrollo y permanencia de los focos de fibroblastos/miofibroblastos no han podido ser esclarecidos. En este estudio decidimos explorar si fibroblastos obtenidos de pulmones normales estimulados con TGF- $\beta$  (mimetizando *in vitro* lo que podría ocurrir *in vivo*), u obtenidos de pulmones fibróticos inducía apoptosis de linfocitos, lo que podría explicar al menos parcialmente la ausencia de células inmunocompetentes en los focos de fibroblastos/miofibroblastos.

Lo primero que se analizó fue la inducción de proliferación y/o activación de linfocitos por los diferentes medios de cultivo condicionados. Nuestros resultados demostraron que los medios condicionados de fibroblastos normales sin estímulo o estimulados con TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  no activan la proliferación celular de linfocitos. Se estudió la proliferación celular ya que algunas moléculas que inducen apoptosis también pueden activar el ciclo celular. Ejemplos de factores que tienen ambos efectos son TNF- $\alpha$  y Fas cuando se co-estimula con el receptor CD3 (Budd 2002).

Asimismo, ninguno de los marcadores de activación de linfocitos como CD25 (que es el receptor de interleucina 2 y funciona como marcador de activación tardía), CD69 (marcador de activación temprana) y CD152 (CTLA-4, un marcador de activación de las células anérgicas) se modificaron con la exposición a los diferentes medios condicionados.

Nuestro hallazgo más importante fue que los linfocitos estimulados con sobrenadantes de fibroblastos derivados de pulmones fibróticos mostraban altos índices de apoptosis, lo que no se observó en los linfocitos estimulados con sobrenadantes de fibroblastos normales activados con TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , o sin estímulo. Para esto se utilizaron dos métodos diferentes de detección de apoptosis. El primero, con el estuche comercial ApoBrDU mide la muerte celular programada por degradación de DNA genómico mediante la unión de un análogo de nucleótido (la bromo-

## **Discusión**

desoxiuridina) a cadena sencilla de DNA mediante una enzima al cual se le une un anticuerpo fluorescente. El segundo método, mide la unión de Anexina V fluorescente a fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática. La fosfatidilserina (PS) pertenece a una clase de fosfolípidos ácidos que se localiza normalmente en la cara interna de la membrana plasmática. La distribución asimétrica de este fosfolípido junto con la fosfatidiletanolamina se debe a la traslocación de estas dos moléculas por una enzima traslocasa. La PS se expone a la cara externa de la membrana lipídica en algunas condiciones fisiológicas como el envejecimiento de los eritrocitos y la activación de las plaquetas, y en las células que están llevando a cabo un proceso apoptótico (Naito ). Ambos métodos están bien documentados de ser representativos de la apoptosis celular y son complementarios al involucrar uno la presencia de proteínas caspasas activas (por el ApoBrDU) y el otro que muestra la pérdida de la integridad de la membrana plasmática (anexina).

Es importante señalar que se ha descrito que el tratamiento de linfocitos con IFN- $\gamma$  aumenta de modo significativo el nivel de muerte celular inducida por algunos estímulos proapoptóticos (Budd 2002). El activador de transcripción IRF-1 es responsable de mediar la transcripción de genes inducidos por IFN- $\gamma$  y se requiere para la apoptosis inducida en linfocitos T activados por mitógenos. De todas las moléculas de la familia de Bcl2, IFN- $\gamma$  solo induce la expresión de un miembro catalogado como proapoptótico: Bax, que podría ser responsable de este efecto. (Ossina *et al* 1997) Este fenómeno amplificador de apoptosis no se observó en los linfocitos cultivados en medios condicionados de fibroblastos previamente estimulados con IFN- $\gamma$ . Esto probablemente se debió a que para este experimento se cambió el medio de cultivo con el cual se estimularon los fibroblastos normales con IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  para evitar que estuviera la citocina presente. Por otro lado, cuando se agregó directamente el IFN- $\gamma$  en el medio de cultivo de linfocitos, éste provocó un aumento en la apoptosis (tabla 4).

La resolución normal de una respuesta inflamatoria/fibrosante después de una agresión pulmonar necesita, entre otros mecanismos, de la desaparición controlada mediante apoptosis de células no necesarias lo cual debe ocurrir sin liberación de

## **Discusión**

histotoxinas dañinas. En este contexto, actualmente se reconoce que la muerte celular programada desempeña un papel importante en la remodelación de tejido pulmonar después de un daño agudo o crónico tanto para eliminar el exceso de células inflamatorias como para remover el exceso de células mesenquimatosas una vez superada la lesión (Fine *Et al* 2000)

En el pulmón la apoptosis se considera un mecanismo de defensa que regula la proliferación de células del mesénquima y permite remover las células inflamatorias cuando se ha producido una lesión. La regulación de la apoptosis en la remodelación tisular podría ser muy importante para prevenir la cicatrización patológica, que es una característica clásica de la fibrosis pulmonar, el daño alveolar agudo y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Ortiz *et al* 1998, Goumenos *et al* 2002).

La apoptosis de los linfocitos T puede ocurrir por la expresión de algunos factores o citocinas, como por ejemplo Fas y TNF- $\alpha$ . En las células quiescentes, la estimulación del TCR (receptor de células T) induce ligeramente los genes para FasL y TNF, pero la estimulación con IL-2 incrementa significativamente esta inducción (Leonard *Et al* 1999). Asimismo, Fas se expresa en la superficie luminal de un gran número de células epiteliales alveolares tipo II, y de manera constitutiva en células de Clara en espacios aéreos de ratón (Fine *et al* 2000).

La FPI representa un modelo de cicatrización anormal resultante de múltiples sitios microscópicos de daño en células epiteliales alveolares. Los epitelios dañados y activados que se encuentran en proximidad de fibroblastos intersticiales producen un gran número de factores de crecimiento, que participan en el control parácrino de la proliferación, quimiotaxis y patrón de secreción de proteínas de matriz extracelular en fibroblastos/miofibroblastos (Selman *Et al* 2001; Allen, Spiteri 2002). A su vez, durante el desarrollo de la fibrosis, los fibroblastos/miofibroblastos inducen la apoptosis de las células epiteliales mediante la liberación de angiotensina II (Wang *et al.* 1999) y, de acuerdo a los resultados de nuestro estudio, producen la apoptosis de linfocitos por algún factor desconocido.

Los posibles candidatos a molécula proapoptótica de linfocitos producida por fibroblastos derivados de pulmones fibróticos se describen a continuación.

### **TGF- $\beta$**

El TGF- $\beta$  es una citocina multifuncional producida por todos los leucocitos. Promueve su diferenciación e inhibe su activación y proliferación. Provee de estímulos quimiotácticos para su migración y regula moléculas de adhesión (Blobe *et al* 2000). Ratones deficientes en TGF- $\beta$ 1 mueren de inflamación cardiaca, pulmonar y gástrica. Animales tratados con glucocorticoides presentan alteraciones en la curación de las heridas que se puede revertir con la aplicación de TGF- $\beta$  exógeno. (Frank *et al* 1996)

El TGF- $\beta$  es crucial en la interacción entre fibroblastos y epitelios y desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática. La activación de TGF- $\beta$  por integrinas  $\alpha$ v $\beta$ 6 favorece la fibrogenesis lo cual ocurre en presencia o ausencia de una respuesta inflamatoria y puede progresar hacia la fibrosis de un modo independiente. Así, se ha demostrado en modelos animales que la remodelación fibrótica puede ocurrir como consecuencia de una inflamación aguda (como se observa cuando se sobreexpresa IL-1) o independiente de inflamación (como cuando se inyecta el TGF- $\beta$ 1 activo acoplado a adenovirus) (Allen, Spiteri 2002; Sime *et al*, 1997).

Los miofibroblastos, fibroblastos diferenciados con características morfológicas de músculo liso son comunes en lesiones fibróticas y comprenden el tipo celular principal en los focos de fibroblastos. Esta diferenciación está al menos parcialmente mediada por el TGF- $\beta$ . Los miofibroblastos tienen un fuerte fenotipo profibrosante y favorecen la acumulación de proteínas de matriz extracelular produciendo colágenas fibrilares, TGF- $\beta$ 1, MMP-9, y TIMP's.

En relación a la apoptosis, el TGF- $\beta$ 1 induce muerte celular programada de células epiteliales bronquiolares de modo dependiente de caspasas, al tiempo que disminuye la síntesis de p21. La exposición conjunta de TGF- $\beta$ 1 y FasL soluble potencia el efecto proapoptótico de FasL. (Hagimoto *et al* 2002).

Sin embargo, la aplicación directa de TGF- $\beta$  a linfocitos en cultivo (5ng/ml) en nuestro estudio, no aumentó la apoptosis por encima de los resultados basales (tabla en la fig. 4 de resultados/anexina).

### **TNF- $\alpha$ .**

Esta molécula puede inducir apoptosis y desempeña un papel importante en los procesos fibrosantes (Gharaee-Kermani *et al*, 2001). La sobre-expresión de TNF- $\alpha$  mediante la incorporación de un plásmido en ratones provoca fibrosis pulmonar difusa mientras que los ratones deficientes de TNF- $\alpha$  o del receptor son resistentes a la fibrosis provocada por bleomicina (Ortiz *et al*, 2001). El TNF- $\alpha$  se produce por células epiteliales alveolares de tipo II y sus efectos son el incremento indirecto en la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena mediante la inducción de TGF- $\beta$  o PDGF (Allen, Spiteri 2002). También induce la expresión de gelatinasas que pueden aumentar la degradación de membranas basales facilitando la migración de fibroblastos.

Es importante señalar, que el TNF- $\alpha$ , el cual se encuentra aumentado en FPI incrementa la expresión de cofactores pro-apoptóticos como p53, p21 y Bax, requeridos para la vía de señalización de Fas. (Allen, Spiteri 2002)

### **Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)**

El PDGF es un potente mitógeno y quimioatrayente de fibroblastos. Evidencias *in vivo* sugieren que varios mediadores fibrogénicos como IL-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , factor de crecimiento de fibroblastos básico y trombina actúan de manera dependiente de PDGF.

PDGF se expresa en niveles muy bajos en pulmones normales, habitualmente en macrófagos alveolares. Su producción se incrementa en FPI, donde participan fundamentalmente las células del epitelio alveolar (Antoniades *et al*, 1990). La transfección de PDGF con un vector viral que produce la sobreexpresión de esta citocina provoca características histopatológicas de FPI, y su inhibición confiere resistencia a la fibrosis inducida por bleomicina.

Aunque este factor se relaciona fundamentalmente con quimiotaxis y proliferación, algunos hallazgos recientes sugieren que puede desempeñar un papel pro-apoptótico, al menos en células cancerosas (de Jong JS, *et al*, 2001).

### **IGF-1**

El factor de crecimiento similar a insulina-1 estimula la proliferación de varias células del mesénquima y se encuentra aumentado en macrófagos y células epiteliales en las primeras etapas de la fibrosis. Su función es mitogénica para fibroblastos, y podría ser un importante activador de transcripción de otros genes involucrados en la regulación del crecimiento y apoptosis. Sin embargo, se ha demostrado que IGF-I, es una molécula que aumenta la sobrevivencia de algunos tipos celulares y más bien parece inhibir la apoptosis, bloqueando la activación de la caspasa-3 (Linseman DA *et al*, 2002, Reinmuth N *et al*, 2002).

### **IL-4**

Los fibroblastos humanos exhiben un aumento en su proliferación y síntesis de colágena asociada a inhibición en la transcripción de IFN- $\gamma$  en respuesta a IL-4. La pérdida de actividad antifibrótica de IFN-g puede promover un ambiente profibrosante y favorecer la selección de una respuesta inmune del tipo 2. Los pacientes que desarrollan fibrosis tienen predominantemente células T tipo Th2 y fallan en producir IFN, mientras que pacientes con enfermedades no fibrosantes (alveolitis, sarcoidosis) expresan tanto IFN- $\gamma$  como IL-4.

La IL-4 media la apoptosis de algunas células como por ejemplo, de los queratinocitos foliculares, de una manera independiente de bcl-2 y bax (Mandt N *et al*, 2002). Asimismo, induce muerte celular programada en mastocitos (Sherman MA *et al*, 2002).

### **Endotelina-1**

ET-1 promueve la proliferación tanto de fibroblastos como de células epiteliales, la diferenciación a miofibroblastos, quimiotaxis, contracción y síntesis de colágena al tiempo que inhibe la degradación de la matriz extracelular. Puede inducir la producción parácrina de factores de crecimiento incluyendo TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , fibronectina y VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial). En FPI se colocaliza la enzima activadora de ET-1 con ET-1 en células epiteliales tipo I y II.

## **Discusión**

Las endotelinas inducen proliferación en muchos tipos celulares normales o cancerosas. Se ha sugerido que puede promover o inhibir la apoptosis, aunque la mayoría de las evidencias sugieren que desempeña un papel anti-apoptótico (Filippatos *et al*, 2001).

### **Factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF)**

El CTGF es un mediador que se ha involucrado en angiogénesis, adhesión celular y fibrosis. Este factor se encuentra aumentado en enfermedades fibrosantes incluyendo FPI, y la adición de IFN- $\gamma$  inhibe su producción. El hecho de que los ratones deficientes de Smad3 no producen CTGF sugiere que se encuentra en la vía de señalización de TGF- $\beta$ .

En relación con la apoptosis, se ha demostrado recientemente que el CTGF es capaz de inducir muerte celular programada de células de músculo liso, a través de la activación de la caspasa-3 (Hishikawa K *et al*, 2000).

### **FAS**

El antígeno Fas (Fas) es un receptor proteico de superficie celular tipo 1 de la familia de receptores para TNF (TNFR) e induce apoptosis cuando se une al ligando de Fas (FasL) (Hildeman DA *et al*, 2002). La sobre-expresión de Fas en tejido pulmonar provoca apoptosis epitelial y una respuesta fibrosante en ratones (Kuwano *et al* 1999).

Un aspecto muy importante de esta molécula, es que es la única de las mencionadas que se ha asociado directamente con la apoptosis de linfocitos. La homeostasis de los linfocitos depende de un balance entre proliferación y apoptosis. En este sentido, un control riguroso de los mecanismos de muerte programada de estas células es esencial para una respuesta inmune adecuada y su alteración puede resultar en cáncer y autoinmunidad.

La unión de Fas con el receptor TNF-R1 activa la cascada de las caspasas lo que desencadena la apoptosis de linfocitos (Thome M *et al*, 2001). Este es uno de los

## **Discusión**

fuertes candidatos a ser el responsable (s) de la apoptosis inducida en linfocitos por los medios condicionados provenientes de pulmones fibróticos.

### **IFN- $\gamma$**

El IFN- $\gamma$  aumenta la sensibilidad de líneas tumorales a TNF y FasL. Es importante señalar que los linfocitos T estimulados con IFN- $\gamma$  son más susceptibles a apoptosis inducida por daño al DNA. En la realización de esta tesis se comprobó que el IFN- $\gamma$  en una concentración de 1000 U/ml induce la apoptosis de linfocitos, por lo que es un buen candidato a ser uno de los responsables de nuestro hallazgo. (Hagimoto *et al* 2002).

### Conclusiones

En este estudio se demostró que los sobrenadantes de fibroblastos derivados de pulmones con fibrosis pulmonar idiopática inducen la muerte celular programada de linfocitos. Este fenómeno no se observó cuando los linfocitos se expusieron a medios condicionados de fibroblastos provenientes de pulmones normales aún cuando fueron previamente estimulados con TGF- $\beta$ . La diferente inducción de apoptosis sugiere que los cambios fenotípicos inducidos por el TGF- $\beta$  *in vitro* (expresión de  $\alpha$ -actina, aumento en la producción de colágena etc.) no mimetizan, al menos en este proceso de apoptosis, a lo que ocurre *in vivo* en el microambiente pulmonar fibrótico.

### **Bibliografia**

Allen, J.T. Spiteri, M.A. 2002. Review. Growth factors in idiopathic pulmonary fibrosis: relative roles. *Respir Res* 3-1:13-21

Antoniades, N.H. Bravo, M. Avila, R. Galanopoulos, T. Neville, J. Selman, M. 1990. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 86:1055-1064.

Aravind, L. Dixit, V. M. Koonin, E. 1999. The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *TIBS* 24: 47-53

Bach, E.A. Aguet, M. Schreiber, R.. 1997. The IFN- $\gamma$  receptor: A paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15-1:563-591

Blobe, G.C. Schiemann, W.P. Lodish, H.F. 2000. Role of Transforming Growth Factor  $\beta$  in human disease. *N Engl J Med* 342-18:1350-1358

Border, W.A. Noble N.A.1994. Transforming Growth Factor  $\beta$  in Tissue Fibrosis. *N Eng J Med* 331-19:1286-1292

Budd, R.C. 2002 Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest* 109:437-442

Coker, R.K. Laurent, G.J. 1998. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. *Eur. Resp. J.* 11: 1218-1221

De Jong, J.S. van Diest, P.J. van der Valk, P. Baak, J.P. 2001. Expression of growth factors, growth factor receptors and apoptosis related proteins in invasive breast cancer: relation to apoptotic rate. *Breast Cancer Res Treat* 66:201-208.

## **Bibliografia**

Eickelberg, O. Köhler, E. Reichenberger, F. Bertschin, S. Woodtli, T. Erne P, Perruchoud, P.P Roth, M. 1999. Extracellular Matrix deposition by primary human lung fibroblast in response to TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3. *Am J Physiol* 276: 814-824

Filippatos, G.S. Gangopadhyay, N. Lalude, O. Parameswaran, N. Said, S.I. Spielman, W. Uhal, B.D. 2001. Regulation of apoptosis by vasoactive peptides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:L749-L761.

Fine, A. Janssen-Heininger, Y. Soultanakis, R.P. Swishwe, S. Uhal, B.D. 2000. Apoptosis in lung pathophysiology. *Am Jm Physiol* 279: L423-L427

Frank, S. Madlener, M. Werner, S. 1996. Transforming Growth Factors  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 and  $\beta$ 3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J. Biol Chem* 271-17:10188-10193

Gauldie, J. Kolb, M. Sime, P.J. 2002. Commentary: A new direction in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis? *Respir Res*, 3:1:1

Gharaee-Kermani, M. Phan, SH. 2001. Role of cytokines and cytokine therapy in wound healing and fibrotic diseases. *Curr Pharm Des* 7:1083-1103.

Ghosh, A. Yuan, W. Mori, Y. Chen, S. Varga, J. 2001. Antagonistic regulation of type I collagen gene expression by Interferon- $\gamma$  and Transforming Growth Factor- $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 276-14: 11041-11048

Goumenos, D.S. Tsamandas, A.C. Nahas, A.M. Thomas, G. *et al.* 2002. Apoptosis and myofibroblast expression in human glomerular disease: a possible link with Transforming Growth Factor-Beta-1. *Nephron* 92:287-296

## **Bibliografia**

Hagimoto, N. Kuwano, K. Inoshima, I. Yoshimi, M. Nakamura, N. Fujita, M. Maeyama, T. Hara, N. 2002. TGF-beta as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J Immunol* 168-12:6470-6478

Hildeman, D.A. Zhu, Y. Mitchell, T.C. Kappler, J. Marrack, P. 2002. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr Opin Immunol* 14:354-359.

Hishikawa, K. Nakaki, T. Fujii, T. 2000. Connective tissue growth factor induces apoptosis via caspase 3 in cultured human aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 392:19-22.

Huang, M. Sharma, S. Zhu, L.X. Keane, M.P. et al. 2002. IL-7 inhibits fibroblast TGF- $\beta$  production and signaling in pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 109-7: 931-937

Kerr, J.F.R. Winterford, C.M. Harmond, B.V. 1994 Morphological criteria for identifying apoptosis, in Celis, J.E. (ed) "Cell Biology, a laboratory handbook" Academic Press, N.Y. USA. pp 319-329

Khalil N, R.N. O'Connor, H.W. Unruh, P.W. Warren, K.C. Flanders, A. Kemp, O.H. Berezney & A.H. Greenberg. 1991. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 155-162.

Khalil N. 2001. Post translational activation of latent transforming growth factor beta (L-TGF-beta): clinical implications. *Histol Histopathol* 16:541-551.

Kunkel, S.L. Strieter, R.M. 1997. Cytokines and chemokines in lung inflammation and injury, in: Fishman, M.D (ed). "Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders" 3th edition McGraw-Hill N.Y. USA

## **Bibliografia**

Kuwano, K. Hagimoto, N. Kawasaki, M. Yotomi, T. Nakamura, N. *et al.* 1999(1). Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 104-1:13-19

Leonard, M. Chan, F.K.M. Hornung F. McFarland, H. Siegel R. Wang J. Zheng L. 1999. Mature T lymphocyte apoptosis: Immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu. Rev. Immunol* 17: 221-253

Linseman, D.A. Phelps, R.A. Bouchard, R.J. Le, S.S. Laessig, T.A. McClure, M.L. Heidenreich, K.A. 2002. Insulin-like growth factor-I blocks Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim) induction and intrinsic death signaling in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 22:9287-9297.

Lutz, M. Knaus, P. 2002. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal* 14:977-987.

Mandt, N. Geilen, C.C. Wrobel, A. Gelber, A. Kamp, H. Orfanos, C.E. Blume-Peytavi, U. 2002. Interleukin-4 induces apoptosis in cultured human follicular keratinocytes, but not in dermal papilla cells. *Eur J Dermatol* 12:432-438.

McGrath, J. Barnes, C. 1982. Air pollution Physiological Effects. Academic Press. N.Y pp. 225-230 U.S.A.

Nguyen, K.B. Watford, W.T. Salomon, R. Hofmann, S.R. Pien, G.C. Morinobu, A. Gadina, M. O'Shea, J.J. Biron, C.A. 2002. Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* 297:2063-2066.

Ortiz, L. Moroz, K. Liu, J. Y. Hoyle, G. W. Hammond, T. Hamilton, R. F. Holian , A. Banks, W. Brody, A.R. Friedman M. 1998. Alveolar macrophage apoptosis and TNF- $\alpha$ ,

## **Bibliografía**

but not p53 expression correlate with murine response to bleomycin. . *Lung Cel Mol Physiol* 19: L1208-1218.

Ortiz, L.A. Lasky, J. Gozal, E. Ruiz, V. Lungarella, G. Cavarra, E. Brody, A.R. Friedman, M. Pardo, A. Selman, M. 2001. Tumor necrosis factor receptor deficiency alters matrix metalloproteinase 13/tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression in murine silicosis. *Am J Respir Crit Care Med*; 163:244-252.

Ossina, N. K. Cannas A. Pow4ers V.C. Fitzpatrick P.A et al. 1997. Interferon- $\gamma$  modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression. *J. Biol Chem* 272-27: 16351-57

Pardo, A. Selman, M. 1999. Matrix metalloproteinases in the pathogenesis of lung injury. In: Collagenases. Hoeffler W, ed. R.G. Landes Co., Georgetown TX EUA, pp. 221-239

Peilot, H. Rosengren, B. Bondjers, G. Hurt-Camejo, E. 2000. Interferon-gamma induces secretory group IIA phospholipase A2 in human arterial smooth muscle cells. Involvement of cell differentiation, STAT-3 activation, and modulation by other cytokines. *J Biol Chem* 275:22895-22904.

Piguet, F. P., Collart, M. A., Grau, G. E., Sappino, A. Vessalli, P. 1990. Requirement of tumor necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature* 344: 245-247

Ramos, C. Montaña, M. García-Alvarez, J. Ruiz, V. Uhal, B.D. Selman, M. Pardo, A. 2001. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Resp Cell Mol Biol* 24:591-598

## **Bibliografía**

Reinmuth, N. Fan, F. Liu, W. Parikh, A.A. Stoeltzing, O. Jung, Y.D. Bucana, C.D. Radinsky, R. Gallick, G.E. Ellis, L.M. 2002. Impact of insulin-like growth factor receptor-I function on angiogenesis, growth, and metastasis of colon cancer. *Lab Invest* 82:1377-1389.

Selman, M. King, T.E. Pardo, A. 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevaling and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 134:136-151.

Pardo, A. Selman, M. 2002. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Frontiers in Bioscience* 7, d1743-1761

Selman, M. 1996. Neumopatías intersticiales difusas. Ed. Panamericana Mexico D.F. pp 312.

Selman, M. Montaña, M, Ramos, C. Barrios, R. Pérez-Tamayo, R. 1989. Experimental pulmonary fibrosis induced by Paraquat plus oxygen in rats: a morphologic and biochemical sequential study. *Exp. Mol. Patol.* 50: 147-166

Sherman, M.A. Powell, D.R. Brown, M.A. 2002. IL-4 induces the proteolytic processing of mast cell STAT6. *J Immunol* 169:3811-3818.

Sime, P.J. Xing, Z. Graham, F.L. Csaky, K.G. Gauldie, J. 1997. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest* 100:768-776.

Thome, M. Tschopp, J. 2001. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol* 1:50-58.

## **Bibliografia**

Uhal, B.D. Joshi, I. True, A.L. Mundle, S. Raza, A. Pardo, A. Selman, M. 1995. Fibroblast isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. *Lung Cel Mol Physiol* 13: L819-L828.

Uhal, B.D. Joshi , I. Hughes,W.F. Ramos, C. Pardo, A. Selman, M. 1998. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Lung Cel Mol Physiol* 16: L1192-L1199.

Wang, R. Ramos, C. Joshi, I. Zagariya, A. Pardo, A. Selman, M. Uhal, B.D. 1999. Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *Lung Cel Mol Physiol* 21: L1158-L1164.

Ziesche, R. Block, L.H. 2000. Mechanisms of antifibrotic action of interferon gamma-1b in pulmonary fibrosis. *Wien Klin Wochenschr* 112:785-790.