



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

PARTICIPACIÓN DE SIRT7 EN EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS
PULMONAR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. GARCÍA VICENTE MARÍA DE LOS ÁNGELES

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

COMITÉ TUTOR: DRA. PATRICIA SOFÍA GOROCICA ROSETE
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

... CD. MX., ENERO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

PARTICIPACIÓN DE SIRT7 EN EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS
PULMONAR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. GARCÍA VICENTE MARÍA DE LOS ÁNGELES

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

COMITÉ TUTOR: DRA. PATRICIA SOFÍA GOROCICA ROSETE
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2019



OFICIO CPCB/1086/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. 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 agosto de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GARCÍA VICENTE MARÍA DE LOS ÁNGELES** con número de cuenta **307231048**, con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DE SIRT7 EN EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS PULMONAR"**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA**:

Presidente: DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS
Vocal: DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ
Secretario: DRA. PATRICIA SOFÍA GOROCICA ROSETE
Suplente: DRA. ANA LILIA TORRES MACHORRO
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 15 de noviembre de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por todas las facilidades para llevar a cabo los estudios de posgrado.

A CONACYT por la beca Nacional-CONACYT que me soportó económicamente en la realización de mis estudios.

A mi Tutor el Dr. José G. Cisneros Lira, por la oportunidad que me dio para realizar el posgrado bajo su tutoría, por su guía académica y por todo el apoyo que me brindó para la culminación de este proyecto.

A los miembros del Comité Tutor: Dra. Patricia Sofía Gorocica Rosete y Dra. María de Lourdes Segura Valdez por todas las observaciones y aportaciones que permitieron un mejor desarrollo y avance del proyecto así como de mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Laboratorio Nacional de Soluciones para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT) de la Facultad de Ciencias de la UNAM por las facilidades brindadas en el uso de sus instalaciones y equipos, para concluir el trabajo experimental de este proyecto.

Al Instituto Nacional de Enfermedades respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, por el material biológico y las facilidades para llevar a cabo el uso de sus instalaciones y equipos.

A los miembros del jurado: Dr. Ernesto Soto Reyes Solís, Dra. María Sandra Cabrera Benítez, Dra. Patricia Sofía Gorocica Rosete, Dra. María De Lourdes Segura Valdez y Dra. Ana Lilia Torres Machorro por sus comentarios y observaciones para mejorar este trabajo.

Al grupo de Fibrosis Pulmonar del INER-Facultad de ciencias gracias por brindarme su apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, Fernanda, Marco y Sol, por su amistad y los valiosos momentos que hemos compartido juntos.

A mis amigas Sandra y Zayra, por siempre escucharme y estar presentes.

A mi familia Irma, Mario, Ramón y José, gracias por soñar conmigo, siempre impulsarme, reconfortarme y por darme su apoyo incondicional.

ÍNDICE

ÍNDICE	
AGRADECIMIENTOS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
ÍNDICE DE FIGURAS.....	
ÍNDICE DE TABLAS.....	
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCION	3
1.1 Fibrosis pulmonar.....	3
1.1.1 Fibroblastos y miofibroblastos	4
1.2 Senescencia y envejecimiento celular en la fibrosis pulmonar.....	5
1.3 Procesos epigenéticos en la fibrosis.....	6
1.4 Desacetilasas de histonas.....	6
1.4.1 Sirtuinas.....	8
1.4.1.1 Sirtuina 7.....	8
II. ANTECEDENTES	11
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
IV. HIPÓTESIS.....	13
V. OBJETIVOS.....	14
5.1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos particulares	14
VI. METODOLOGÍA	15
6.1 Obtención y cultivo de fibroblastos.....	15
6.2 Aislamiento y purificación de RNA.....	15
6.3 Reacción de PCR.....	16
6.4 Extracción de proteínas.....	16
6.5 Western Blot.....	17
6.6 Inducción de senescencia.....	18
6.7 Ensayo de actividad para β -galactosidasa.....	18
6.8 Inmunofluorescencia.....	18

6.9	Análisis estadístico	19
VII.	RESULTADOS.....	20
7.1	Características demográficas y clínicas de los pacientes.....	20
7.2	Análisis de integridad del RNA.....	21
7.3	Expresión de SIRT7.....	21
7.4	Expresión de SIRT7 a nivel de proteína.....	24
7.5	Localización subcelular de SIRT7.....	27
7.6	Ensayo para evaluar senescencia celular en fibroblastos.....	30
7.7	Identificación de marcadores de senescencia.....	31
VIII.	DISCUSIÓN.....	37
IX.	CONCLUSIONES	41
X.	LITERATURA CITADA.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTA2: Gen de alfa actina de musculo liso.
- EPID: enfermedad pulmonar intersticial difusa
- FPI: Fibrosis pulmonar idiopática
- IPF: Idiopathic pulmonary fibrosis
- HAT: Histonas acetiltransferasas
- HDACs: Desacetilasas de histonas
- MEC: Matriz extracelular.
- NHLF 70: Línea comercial de fibroblastos de pulmón de un donador de 70 años de edad.
- SIRTs: Sirtuinas
- SIRT7: Gen de sirtuina 7.
- SIRT7: Proteína desacetilasa dependiente de NAD Sirtuin-7.
- TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante beta 1.
- α -SMA: alfa actina de musculo liso
- β -gal: Beta-galactosidasa

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de fibrosis pulmonar idiopática.....	4
Figura 2. Regulación de la expresión génica por parte de las HDACs.	7
Figura 3. Clasificación de las HDAC	7
Figura 4. Reacción de desacetilación llevada a cabo por las SIRTs.	8
Figura 5. Síntesis de SIRT7.....	9
Figura 6. Sustratos de SIRT7.....	10
Figura 7. Expresión génica de SIRT7.....	22
Figura 8. Efecto del TGF- β 1 sobre la expresión de SIRT7.....	23
Figura 9. Efecto del tabaquismo sobre la expresión de SIRT7.....	24
Figura 10. Expresión total de SIRT7 a nivel de proteína.	25
Figura 11. Expresión de SIRT7 evaluada por inmunofluorescencia.	27
Figura 12. Estandarización de la extracción de proteína de núcleo y citoplasma.....	28
Figura 13. Expresión de SIRT7 en extractos de citoplasma y núcleo.....	28
Figura 14. Inmunofluorescencia para detectar la localización subcelular de SIRT7.	29
Figura 15. . Evaluación de senescencia en fibroblastos.....	31
Figura 16. Inmunofluorescencia de SIRT7 en fibroblastos senescentes.	32
Figura 17. Expresión de SIRT7 y p21.	33
Figura 18. Inmunofluorescencia de SIRT7 y p21..	34
Figura 19. Inmunofluorescencia de SIRT7 y pH2Ax.....	35
Figura 20. Inmunofluorescencia de SIRT7 y H3K18ac en células senescentes.	35
Figura 21. Inmunofluorescencia de SIRT7 y H3K18ac.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características demográficas y clínicas.	20
Tabla 2. Valores del análisis de integridad de los RNAs.	21

RESUMEN

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad asociada al envejecimiento y trabajos recientes sugieren que en los fibroblastos de pulmón de estos pacientes hay un fenotipo senescente aberrante que tiene una gran influencia en el desarrollo de la enfermedad. En la actualidad existe poca información acerca del papel que desempeñan las sirtuinas en los fibroblastos de esta patología y en particular, SIRT7 es la menos estudiada.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la expresión de sirtuina 7 en fibroblastos de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.

Se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos pareados por edad, derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y de sujetos control cultivados en medio completo y en presencia de TGF- β 1. La expresión sirtuina 7 se cuantificó mediante ensayos de qPCR y western blot. En ambos grupos de fibroblastos se indujo senescencia replicativa y se evaluó la expresión de SIRT7, H3K18ac y de marcadores de senescencia mediante ensayos de inmunofluorescencia.

Se encontró una mayor expresión del gen y la proteína de sirtuina 7 en los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática en comparación con los sujetos control. De manera interesante a nivel de mRNA, en 4 de los 7 cultivos de los pacientes que tenían reporte de tabaquismo se observó una tendencia al incremento en la expresión de SIRT7 cuando se compararon con los cultivos de los pacientes sin antecedentes de tabaquismo. Adicionalmente, el tratamiento con TGF- β 1 disminuye el mRNA de la sirtuina7. A nivel subcelular no se encontraron diferencias en la distribución de esta proteína en núcleo y citoplasma, sin embargo, hay una tendencia a la distribución nuclear en específico a nivel de nucleolo para ambos grupos y en algunos casos también se observó la expresión en nucleoplasma. Los cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de pacientes y controles a los que se les indujo senescencia expresaban sirtuina 7 y los marcadores de senescencia p21 y p2AX. A su vez en las células estimuladas con TGF- β 1 se reportó una tendencia al incremento en la expresión de p21. En estos cultivos la acetilación de la H3K18ac que es uno de los principales blancos a nivel de cromatina de sirtuina 7, tiende a estar disminuida en ambos grupos cuando se induce senescencia replicativa y con el estímulo de TGF- β 1. Estos datos sugieren que en cultivos de fibroblastos de FPI la sirtuina 7 podría tener un efecto profibrótico y que el estímulo con TGF- β 1 podría tener implicaciones en el fenotipo senescente de las células.

ABSTRACT

Participation of SIRT7 in the development of pulmonary fibrosis.

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a disease associated to ageing and current works suggest that fibroblast in this pathology has an aberrant senescent phenotype which is involved in the progression of IPF. Although there is a little information about the alterations that occur in the epigenetic regulation during development of IPF, recently, the implication of some sirtuins has started to be studied.

In this work, we focused on the evaluation of sirtuin 7 in lung fibroblasts from IPF patients. Fibroblasts from IPF patients and healthy subject controls were grown in complete medium and medium with TGF- β 1. Sirtuin 7 was analyzed by qPCR and western blot assays. Replicative senescence was induced in both groups; sirtuin7, H3K18ac, and senescence markers were evaluated by immunofluorescence assay.

Replicative senescence was induced in fibroblasts from both groups and sirtuin7, H3K18ac, and senescence markers were evaluated by immunofluorescence assay.

In fibroblasts from IPF, we find a higher expression of sirtuin 7 at gene and protein level, as well as a decrease in this sirtuin after TGF- β 1 treatment. Particularly there was a tendency to the increase in sirtuin7 in patients with smoking history vs non-smoking history patients. At the subcellular level, there was no difference in sirtuin 7 distribution of lung fibroblast from patients and healthy donors between nucleus and cytoplasm; however, we find a tendency to the nucleus distribution specifically in the nucleolus in both groups, in some cases, nucleoplasm distribution was also observed.

In senescence fibroblasts from IPF and controls we noticed the presence of senescence markers p21 and p53; furthermore, in cells that were stimulated with TGF- β 1, there were a tendency to an increase in p21. The histone modification H3K18ac showed a decrease in senescence fibroblasts and similarly to sirtuin 7 there was a decrease in this histone modification after TGF- β 1 stimulation in both groups.

These results suggest that in IPF fibroblasts sirtuin 7 could have a pro-fibrotic effect and data obtained with the TGF- β 1 stimulus is implicated in the senescence phenotype.

-

I. INTRODUCCION

1.1 Fibrosis pulmonar.

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) son un grupo heterogéneo de padecimientos que afectan el parénquima pulmonar y pueden progresar hasta desarrollar fibrosis [1].

La fibrosis es un proceso asociado con la cicatrización, caracterizado por la síntesis y deposición tejido conjuntivo fibroso de manera excesiva con lo cual se promueve la remodelación de la arquitectura de los tejidos y órganos en los que tiene lugar [2].

El desarrollo de estas enfermedades puede estar asociado a diversos factores químicos, biológicos, genéticos o puede ser de naturaleza desconocida como el caso de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) [3].

En EUA dentro del grupo de las EPID la FPI es la patología que se presenta con mayor frecuencia [4], en este mismo país la tasa de prevalencia para 2008 era de 67.2 casos por cada 100,000 habitantes y la tasa de incidencia era de 16.3 por cada 100,000 habitantes y en un rango de edad de mayores de 75 años la tasa de incidencia se incrementaba a 76.4 por cada 100,000 habitantes [5]. En el caso de México no existen datos epidemiológicos, sin embargo, en un trabajo publicado en 2015 se dio a conocer que cada neumólogo en el país diagnostica en promedio a 8 pacientes con FPI al año [6].

La FPI es una enfermedad crónica, progresiva y letal, en la cual excepción del trasplante de pulmón no se cuenta con una cura efectiva [7]. Es una enfermedad que se caracteriza por la activación, proliferación y migración de fibroblastos [8] que promueven el incremento en la acumulación de los componentes de la MEC (matriz extracelular) que invaden los espacios alveolares con lo que se disminuye el intercambio gaseoso [7].

En la actualidad se cree que la FPI es el resultado de la interacción compleja de, factores de riesgo genético y ambiental, procesos asociados al envejecimiento y reprogramación epigenética, que promueven la aparición de modificaciones tanto en las células epiteliales alveolares como en los fibroblastos de pulmón [9].

En la FPI ocurre el incremento en la producción de moléculas pro-fibrosantes, dentro de estas la más importante es el TGF- β . Se han identificado tres isoformas del TGF- β , sin embargo, TGF- β 1 es la isoformas con mayor influencia en el desarrollo de la FPI. En el pulmón el TGF- β 1 es producido por una extensa variedad de tipos celulares (macrófagos, neutrófilos, células epiteliales alveolares activadas, células endoteliales, y

fibroblastos). Una vez activado el TGF- β 1 induce el reclutamiento de fibroblastos así como su proliferación [10].

La FPI se origina en las regiones alveolares del pulmón en las que la asociación entre el epitelio alveolar y las células mesenquimales se encuentra alterada, en esta patología la re-epitelización alveolar es lenta e inadecuada; ocurre la pérdida de las células del epitelio alveolar tipo I, la hiperplasia de las células de epitelio alveolar tipo II, así como la expresión alterada de moléculas de adhesión [11]

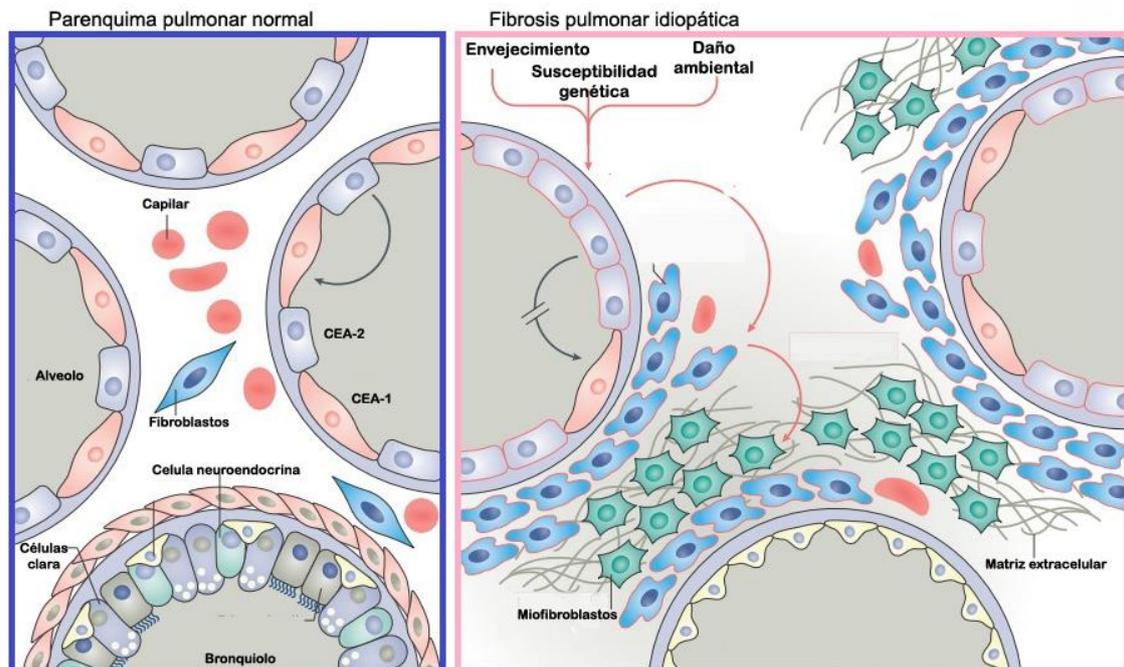


Figura 1. Esquema representativo de fibrosis pulmonar idiopática. A la izquierda se esquematiza la arquitectura de un pulmón normal a la derecha un pulmón con fibrosis pulmonar idiopática, en el pulmón fibrótico se observan focos de fibroblastos y miofibroblastos. Modificado de Mora, Rojas, Pardo, & Selman, 2017, Nature Reviews Drug Discovery [9].

Uno de los principales marcadores de la enfermedad es la aparición de focos de fibroblastos y miofibroblastos donde se lleva a cabo la síntesis excesiva de colágeno con lo que se favorece la pérdida de la arquitectura pulmonar [12].

1.1.1 Fibroblastos y miofibroblastos

Se sugiere que el aumento de fibroblastos o miofibroblastos está implicado en la naturaleza destructiva de la enfermedad dado que ambos tipos celulares participan en la cicatrización fibrótica [9].

Los fibroblastos son células del tejido conjuntivo y pueden ser activadas por una gran variedad de señales químicas como el TGF- β 1, que promueven su diferenciación a miofibroblastos [13]. La activación de fibroblastos tiene un papel importante en la

cicatrización de heridas en respuesta al daño tisular donde participan en la reconstrucción de la matriz extracelular generando un andamio para la reparación tisular, una vez que los es proliferar y migrar a los sitios donde son requeridos [14], sin embargo en algunos casos la activación de los fibroblastos se descontrola con lo que se produce una respuesta fibrótica patológica.

Dos de las principales características de los miofibroblastos son la contractilidad y la expresión de alfa actina de musculo liso [15]. En la FPI los miofibroblastos son las células responsables de la acumulación exagerada de la matriz extracelular, sintetizan colágena y otros componentes de la MEC, y por lo tanto también son las células principales que participan en la destrucción de la membrana basal. Se han descrito que existen tres mecanismos mediante los cuales puede ocurrir la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, altos índices de estrés mecánico, incremento en los niveles de TGF- β 1 a nivel local y la presencia de proteínas de matriz especializadas [1].

1.2 Senescencia y envejecimiento celular en la fibrosis pulmonar.

El envejecimiento es un proceso natural caracterizado por la acumulación de daño a nivel celular dependiente de tiempo. Durante el envejecimiento las células comienzan a reducir su funcionalidad debido a alteraciones que modifican el metabolismo y a organelos como las mitocondrias y el núcleo, se han descrito nueve marcadores de envejecimiento tanto a nivel molecular como celular que participan en el proceso de envejecimiento y ayudan a definir un fenotipo de envejecimiento, los cuales son, la inestabilidad genómica, el acortamiento de telómeros, alteraciones a nivel epigenético, la pérdida de proteostasis, desregulación en la detección de nutrientes, disfunción en la mitocondria, senescencia celular, agotamiento de células madres y alteraciones en la comunicación intracelular [16].

El envejecimiento es un factor de riesgo para muchas enfermedades crónicas, se sabe que la incidencia y prevalencia de la fibrosis pulmonar idiopática incrementan con la edad, un gran porcentaje de los pacientes son mayores a los 60 años [17] y se ha planteado la propuesta de que uno de los factores de riesgo para el desarrollo de la FPI es el envejecimiento acelerado en el pulmón, esto se debe a que muchos de los principales marcadores de envejecimiento como son; inestabilidad en el DNA, acotamiento de telómeros y acumulación de células senescentes en el pulmón se presentan en los pacientes con FPI [18].

Por otra parte *in vitro* la senescencia celular se ha definido como capacidad proliferativa finita y en cultivo celular es acompañada por cambios morfológicos aunque estos cambios no se detectan *in vivo*, a su vez las células senescentes presentan marcadores

que las diferencian, dentro de estos se encuentra la actividad de la enzima betagalactosidasa, la expresión de p16, p21 y p27 entre otros. En principio este mecanismo ha sido visto como una secuencia de procesos que participan en la eliminación de células dañadas con lo que se promueve regeneración tisular, sin embargo, en tejidos envejecidos este proceso se ve alterado lo que resulta en la acumulación de células senescentes [19] que como ya se menciono es uno de los marcadores del fenotipo envejecido.

1.3 Procesos epigenéticos en la fibrosis.

La epigenética estudia los mecanismos que modifican y regulan la expresión diferencial de genes y que no afectan la secuencia de nucleótidos. Los mecanismos epigenéticos más estudiados son la metilación del DNA, las modificaciones de histonas y la regulación a través de RNAs no codificantes [20].

Por otra parte algunas de las alteraciones que ocurren en el envejecimiento son debidas a la acumulación de modificaciones epigenéticas [17], por ejemplo, disminución en la acetilación de histonas en las regiones promotoras de genes relacionados con la apoptosis [21] también se ha demostrado que la metilación del DNA tiene un efecto sobre los fibroblastos ya que promueve el desarrollo de un fenotipo más agresivo que presenta una mayor capacidad para diferenciarse a miofibroblasto [22].

1.4 Desacetilasas de histonas.

Las desacetilasas de histonas (HDACs por sus siglas en inglés) son las enzimas que catalizan la remoción del grupo acetilo en los residuos de lisina de diversas proteínas. La remoción de estos grupos acetilo en las histonas promueven la compactación de la cromatina por lo cual son consideradas como represores transcripcionales, pero también muestran un efecto sobre otras proteínas [23].

Existen un grupo de enzimas denominadas acetiltransferasas de lisina (KAT) que se encargan de añadir grupos acetilos a los residuos de lisina de proteínas específicas, como parte del proceso de maduración post-traducciona que estas experimentan hasta llegar a ser activas. Debido a la importancia que tiene este proceso de adición de grupos acetilo en las histonas, las KAT suelen llamarse de modo genérico como acetiltransferasas de histonas (HAT); sin embargo, su acción no se restringe de modo exclusivo a esas proteínas (figura 2) [24].

En mamíferos existen 18 diferentes HDAC y se han clasificado en cuatro grupos (I-IV) de acuerdo a su homología con las levaduras y de ellas, las de Clase III, también

llamadas sirtuinas (SIRT), están representadas por 7 miembros, SIRT 1 a 7 (figura 3) [25].

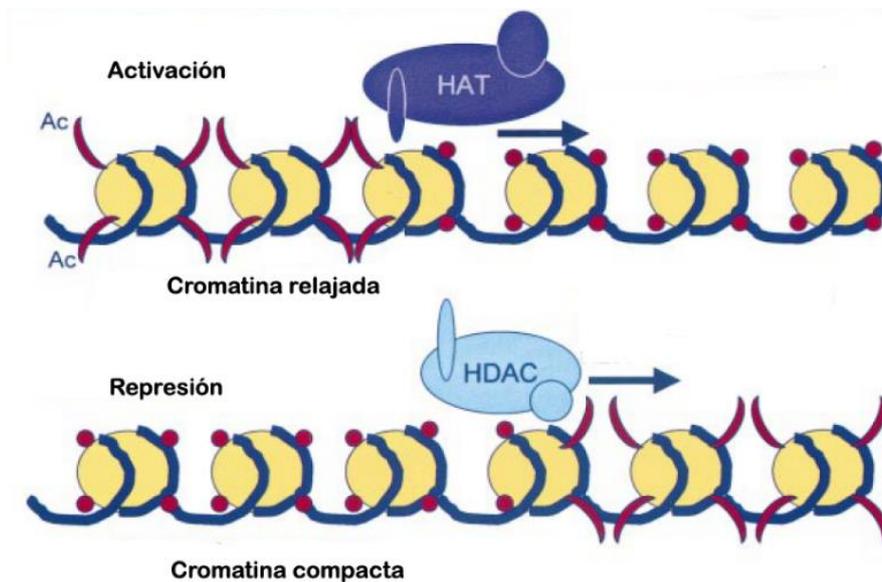


Figura 2. Regulación de la expresión génica por parte de las HDACs. Represión y activación transcripcional en la cromatina. Modificado de Ruijter et al, 2003, Biochemical Journal [26].

A diferencia de las HDACs clase I y II, las SIRTs requieren NAD⁺ como cofactor para llevar a cabo las reacciones de desacetilación [23].

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

Figura 3. Clasificación de las HDAC. Modificado de Shirakawa, et al., 2013, Trends in Microbiology [27].

1.4.1 Sirtuinas.

Los miembros de esta familia que van de la SIRT1 a la SIRT7 y se localizan en diferentes organelos pero particularmente en el núcleo. A diferencia del resto de las HDAC que usan al Zinc como cofactor, una característica fundamental de estas proteínas es la presencia de un dominio de unión a NAD⁺ con una histidina (His 188) y un dominio catalítico bien conservado [28]. Las SIRTs son enzimas que catalizan la desacetilación y la ADP-ribosilación. Además de la desacetilación de lisina dependiente de NAD⁺ se ha demostrado que las SIRTs también participan en la remoción de otros grupos acilo como los grupos succinilo, malonilo y glutarilo [29].

Su función de desacetilación ocurre mediante la transferencia del grupo acetilo a la porción ADP-ribosa del NAD⁺ que da como resultado una proteína desacetilada, nicotidamida y metabolitos del acetilester 2'-O- y 3'-O-acetil-ADP ribosa (AADPR) (figura 4) [30].

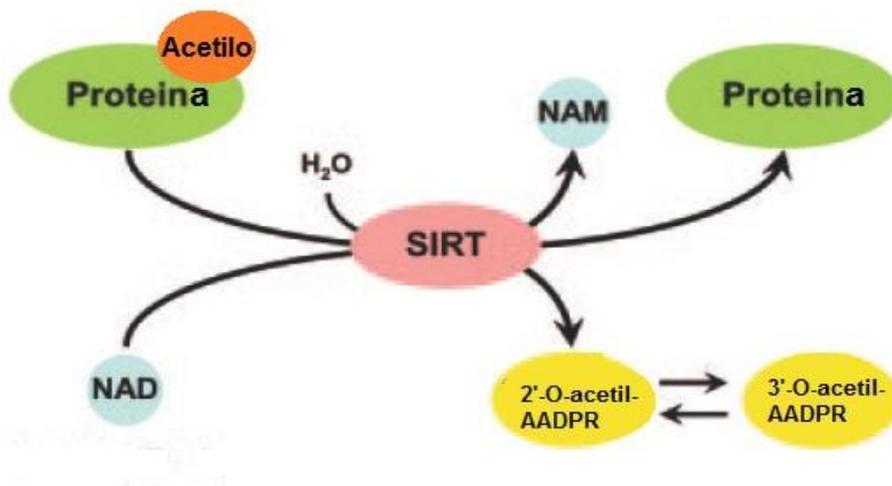


Figura 4. Reacción de desacetilación llevada a cabo por las SIRTs. Modificado de Yamamoto et al, 2007, Mol. Endocrinol [30].

De esta familia de HDACs, SIRT7 es la proteína menos estudiada y se conoce poco sobre su función celular.

1.4.1.1 Sirtuina 7.

El gen de la SIRT7 se localiza en la región subtelomérica en el cromosoma 17, este se transcribe a un mRNA de 10 exones y 9 intrones [31], una vez madurado el mRNA sale del núcleo hacia el citoplasma en donde es traducido a una proteína de 400aa (figura 4) [32]. Esta proteína se localiza principalmente en el nucleolo ya que cerca de la región N

terminal presenta una señal de localización nuclear y cerca de la región C terminal tiene una señal de localización nucleolar. Sin embargo, se ha observado que la eliminación de las señales de localización nuclear y nucleolar conducen a la retención de la proteína en el citoplasma[33].

En lo que respecta al papel de SIRT7 como desacetilasa de histonas el principal sustrato de SIRT7 a nivel de cromatina es H3K18 [30], esta modificación se ha observado principalmente en regiones promotoras de genes supresores de tumores [31]. Al igual que el resto de las HDAC, SIRT7 presenta otros blancos proteicos diferentes a las histonas, se ha observado que SIRT7 participa en la desacetilación de la K382 en p53 (figura 6), con lo que se promueve la supervivencia celular, sin embargo, el papel de SIRT7 en la desacetilación de p53 aún es controversial debido a que existen estudios que sostienen que dicha sirtuina no participa en la desacetilación de p53 [32].

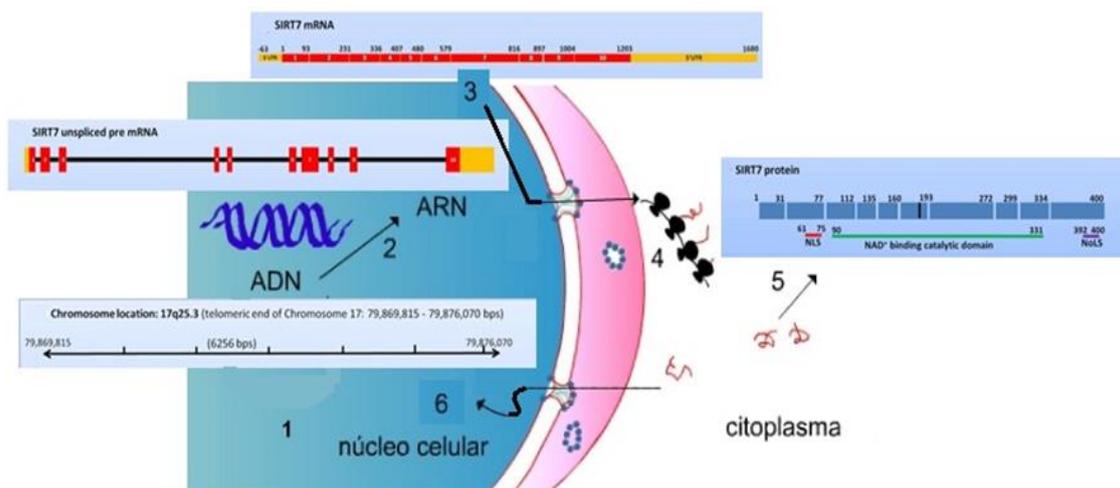


Figura 5. Síntesis de SIRT7. Modificado de Kiran et al. 2015, Cellular Signalling [34].

SIRT7 participa en la transcripción del rDNA, en algunos estudios se ha observado que la sobreexpresión de esta proteína incrementa la actividad de la RNA-polimerasa I. A su vez la SIRT7 desempeña un papel importante en la biosíntesis del ribosoma debido a que desacetila a PAF53 que es una proteína que media la expresión de precursores del rRNA (figura 6) [35].

Por otro lado se ha demostrado que SIRT7 promueve la estabilidad genética ya que juega un papel importante en la protección contra el daño al DNA lo que a su vez la ha llevado a ser vista como una proteína que previene la senescencia celular [36], además de que el silenciamiento de esta sirtuina en una línea celular de fibroblastos fetales promueve senescencia [37].

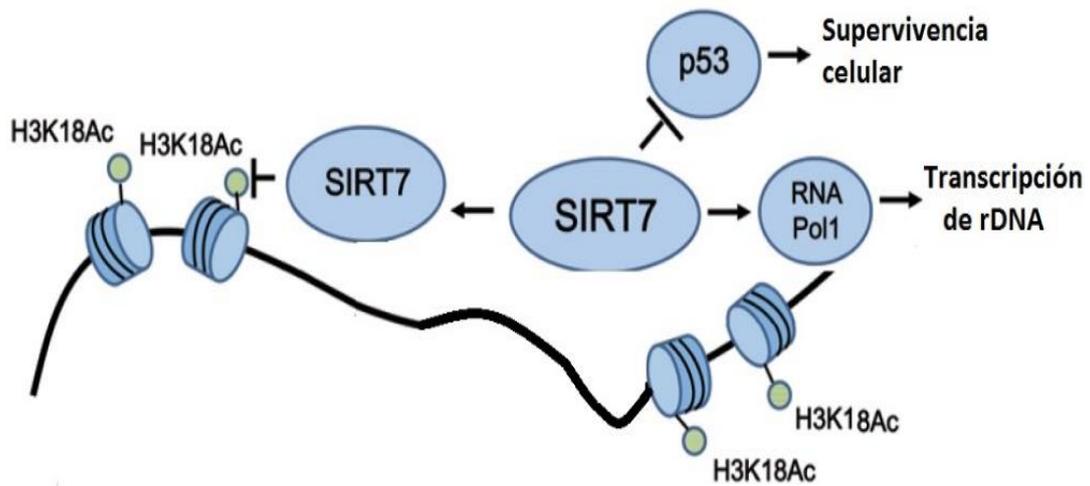


Figura 6. Sustratos de SIRT7. Modificado de Paredes et al. 2014, Clin. Cancer Res [38].

En diversos tipos de cáncer SIRT7 se ha encontrado sobreexpresado por lo que se sugiere como oncogen y se ha descrito que promueve un incremento en las tasas de migración y metástasis [39] [38].

En el caso de la fibrosis se observó que ratones knockout para SIRT7 desarrollaban fibrosis en corazón [40].

II. ANTECEDENTES

La FPI es una enfermedad crónica, progresiva y letal [1]. Se caracteriza por el aumento de fibroblastos y miofibroblastos, se sugiere que estos dos tipos celulares están implicados en la naturaleza destructiva de la enfermedad dado que ambos participan en la cicatrización fibrótica [8]

Actualmente se sustenta la teoría de que la FPI es el resultado de la interacción compleja de, factores de riesgo genético y ambiental, procesos asociados al envejecimiento y reprogramación epigenética, que promueven la aparición de modificaciones tanto en las células epiteliales alveolares como en los fibroblastos de pulmón [9].

Trabajos recientes soportan la idea de que ciertas variaciones epigenéticas determinan la susceptibilidad de los individuos a desarrollar fibrosis pulmonar idiopática [13]. Particularmente se ha observado que pueden llegar a ocurrir modificaciones las HDACs [41]. En mamíferos existen 4 grupos diferentes de HDACs y de ellas, la Clase III, también llamadas sirtuinas están representadas por 7 miembros, SIRT 1 a 7 [23]. Existen estudios que sugieren que las SIRTs están involucradas en procesos de senescencia celular y en procesos fibróticos por ejemplo, SIRT7 es una proteína que media la protección ante la senescencia celular [36] [37]. Aunque en el caso de la fibrosis la mayoría de los trabajos se han enfocado al estudio de SIRT 1, 3 y 6.

Se ha sugerido que SIRT1 desempeña un papel importante en la fibrosis pulmonar, ya que en el modelo de fibrosis inducida por bleomicina la sobre expresión de esta proteína inhibe la señalización de TGF- β 1 con lo que disminuye la activación y diferenciación de fibroblastos [42].

Por otro lado SIRT3 también tiene un papel importante en el desarrollo de la fibrosis pulmonar se observó que existe una disminución en la expresión de esta sirtuina en regiones fibróticas en el pulmón y también se demostró que la disminución de la expresión de esta proteína en fibroblastos de pulmón promueve su diferenciación a miofibroblastos [43].

Se ha reportado que la inhibición de SIRT6, en fibroblastos derivados de fibrosis cardíaca promueve la proliferación y el depósito de matriz extracelular [44] y en fibrosis pulmonar se demostró que la SIRT6 participa en la senescencia mediada por TGF- β 1 en células epiteliales de pulmón [45].

A pesar de lo anterior la información existente acerca de la función de la sirtuina 7 es controversial y la mayoría de los trabajos se han hecho en células de cáncer [46].

Existen reportes de que la SIRT7 puede desempeñar un papel en la senescencia celular. En este sentido, un reporte realizado por Kiran, S. et al muestra que la localización de esta proteína cambia de núcleo a citoplasma en células a las que se le indujo

senescencia replicativa [47]. En el 2008, Vakhrusheva *et al*, reportaron que el ratón deficiente de SIRT7 desarrolla hipertrofia cardíaca acompañada por una fibrosis abundante [40]. Sin embargo, la presencia o ausencia de la SIRT7 en procesos como la FPI aún no ha sido del todo esclarecida.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La FPI es una enfermedad letal asociada al envejecimiento en donde los fibroblastos son las principales células efectoras involucradas en la patogénesis. En la actualidad no se conocen por completo los mecanismos moleculares y celulares implicados en su desarrollo y progresión y existen evidencias que sugieren la presencia de fibroblastos disfuncionales con un fenotipo senescente. Las sirtuinas son proteínas implicadas en procesos de senescencia celular. Sin embargo la información sobre la presencia o ausencia de SIRT7 es escasa.

Es por esto que en el presente trabajo se pretende estudiar la expresión de SIRT7 en la FPI y analizar el impacto del TGF-beta sobre esta proteína.

IV. HIPÓTESIS

Existe un cambio en la expresión de SIRT7 en fibroblastos de pacientes con FPI con respecto a los fibroblastos control, posiblemente asociado a la presencia del TGF- β 1.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar cambios en la expresión de SIRT7 entre fibroblastos de pacientes con FPI y fibroblastos de sujetos control.

5.2 Objetivos particulares

1. Analizar y comparar la expresión de SIRT7 en fibroblastos de pacientes con FPI y fibroblastos de sujetos control en condiciones basales y estimuladas con TGF- β 1.
2. Identificar la localización subcelular de SIRT7 en los fibroblastos.
3. Evaluar la presencia o ausencia de la SIRT7 y de marcadores de senescencia en fibroblastos.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Obtención y cultivo de fibroblastos.

Se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos congelados entre los pasajes 6-8 que forman parte del banco de células de nuestro laboratorio y que previamente fueron aislados de biopsias de pacientes diagnosticados con FPI (n=7) y de donadores (n=4) sin enfermedad pulmonar aparente que fueron considerados como normales (controles). Adicionalmente, también se utilizaron dos líneas comerciales de fibroblastos normales (NHLF, Lonza Suiza), una de estas líneas provenía de un donador de 17 años y fue empleada para la estandarización las técnicas de western blot e inmunofluorescencia y como control negativo en los ensayos de senescencia, la otra línea de NHLF provenía de un donador de 70 años (NHLF 70) por lo que fue usada en los experimentos para evaluar la expresión de SIRT7 a nivel de proteína. Los fibroblastos se cultivaron y propagaron en medio HAM's F12 con 10% de suero fetal bovino a 37°C en una atmosfera de 95% aire y 5% de CO₂. Para el caso de la línea NHLF, las células se mantuvieron en medio FGM-2 (Lonza, Suiza). Cuando las células alcanzaron 90% de confluencia, se dividieron para propagar el cultivo y para congelar células para futuros experimentos.

Para diferentes experimentos, los fibroblastos se sembraron en cajas de 6 y 12 pozos y se mantuvieron creciendo en estado normal (Basal) en medio de cultivo completo o en medio de cultivo completo más TGF- β 1.

6.2 Aislamiento y purificación de RNA.

Para estos experimentos las células se sembraron en placas de 12 pozos a una confluencia del 75% creciendo con medio basal o medio más TGF- β 1 (5ng/mL) durante 6 horas. Se utilizaron 7 cultivos primarios de fibroblastos de FPI y 4 cultivos primarios de fibroblastos de sujetos control. En los experimentos de RNA no se empleó la línea comercial NHLF debido a que aún no se contaba con la línea de 70 años de edad.

La extracción de RNA se llevó a cabo con el Kit comercial microRNA Purification (Norgen Biotek Corp, Ontario Canadá), el RNA se resuspendió en agua libre de RNAasas y se guardó a -70°C para su posterior uso.

La cantidad y pureza del RNA se midió en un espectrofotómetro y se trabajó con aquellas muestras cuya relación se encontraba entre 1.8 y 2. Así mismo, la integridad del RNA fue evaluada por electroforesis microcapilar con el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, California E.U.A), para asegurar que las muestras no se encontraban degradadas y únicamente se trabajó con las que tuvieran un RIN (del inglés RNA Integrity Number) mayor a 7.

6.3 Reacción de PCR.

Para cuantificar la expresión génica de SIRT7 se llevó a cabo un ensayo de PCR en tiempo real, en 7 cultivos primarios de fibroblastos de FPI (FPI-1, 2, 3, 4, 5, 6, y 7) y 4 cultivos primarios de fibroblastos de sujetos control (Control-1, 2, 3 y 4). En primer lugar, se sintetizó cDNA a partir de 0.4µg de RNA total con el kit Revert Aid Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, California, E.U.A), el templado de RNA fue transcrito inversamente con cebadores oligo dT y se ajustó para tener una concentración de 10 ng/ul.

Para la reacción se empleó un Master Mix comercial (Thermo Fisher Scientific California, E.U.A) que contiene 0.05 U/µL de la enzima Taq DNA polimerasa, buffer de reacción, 4 mM de MgCl₂ y 0.4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), la mezcla de reacción también contenía 10µg de cDNA y sondas TaqMan (Applied Biosystems) contra SIRT7 y la proteína de unión a caja TATA (TBP por sus siglas en inglés). Los ensayos se hicieron 2 veces por triplicado y fueron analizados con el software Qgene utilizando como referencia los valores de Ct, como gen de referencia se usó TBP los valores de expresión de SIRT7 se obtuvieron mediante el método $2^{-\Delta Ct}$.

6.4 Extracción de proteínas.

En estos ensayos los cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de 3 pacientes (FPI 1, 3 y 4) y 3 sujetos control (Control 3, 4 y 5, la línea 5 es la NHLF 70) se sembraron por duplicado en cajas de 6 pozos al 80% de confluencia y se mantuvieron durante 24 horas medio solo o en presencia de TGF-β1 (5 ng/ml). Las células se lisaron con 50 ul de Buffer RIPA (Thermo Fisher Scientific, IL, E.U.A) adicionando inhibidores de proteasas y fosfatasa. La concentración de proteína obtenida se cuantificó mediante la técnica de Bradford (Bio-Rad, California, E.U.A).

Para obtener lisados de la fracción nuclear y citoplasmática, los fibroblastos se sembraron en cajas de 25 cm² y la extracción de proteínas se llevó a cabo con el Kit comercial, NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific, IL, E.U.A). La cantidad de proteína obtenida se cuantificó mediante la técnica de Lowry con el Kit DC Protein Assay (Bio-Rad, California, E.U.A).

6.5 Western Blot

Las muestras de proteína (40 ug) de los lisados totales fueron sujetas a SDS-PAGE en geles al 10% bajo condiciones desnaturalizantes. Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de PVDF. Para evaluar la expresión de la proteína SIRT7, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% y posteriormente se incubaron toda la noche a 4° con el anticuerpo primario anti-SIRT7 (Cell Signaling, Massachusetts, E.U.A) a una concentración de 2 ug/ml y con el anticuerpo primario anti-P21 a una concentración de 2 ug/ml (Millipore, E.U.A.). Después de lavar con buffer PBS-T las membranas se incubaron durante una hora con el anticuerpo secundario mouse-Anti rabbit-HRP diluido 1:10000 (Lycor E.U.A). Para detectar la marca de las proteínas las membranas se expusieron al sustrato Luminol (Thermo Fisher Scientific, IL, E.U.A) en presencia de peróxido y la reacción de quimioluminiscencia fue detectada con el foto-documentador BioRad XP.

Después de revelar la proteína SIRT7, las membranas se lavaron con PBS y se incubaron en agitación durante 10 min con buffer stripping (Lycor E.U.A), se bloquearon nuevamente con leche y se incubaron con un anticuerpo anti-GAPDH (Genetex, E.U.A) que se utilizó como control de carga.

Para analizar la presencia de proteínas en extractos de núcleo y citoplasma se, se cargaron 10 µg de proteína para la fracción de núcleo y 40 µg para citoplasma en geles al 10% que fueron sujetos a electroforesis como se indicó anteriormente.

Las membranas correspondientes fueron incubadas con el anticuerpo primario contra SIRT7 y se trataron como ya se indicó. Como controles de carga para citoplasma se usaron anticuerpos contra GAPDH y contra la proteína actina. Para núcleo se usó un anticuerpo contra lámina A/C (rabbit Antihuman Lamina A/C; 1 ug/ml).

Todas las imágenes que se capturaron con el foto-documentador y se analizaron con el software Image J.

6.6 Inducción de senescencia.

Se indujo senescencia replicativa en 3 cultivos de fibroblastos de (FPI-2, 5 y 6) y 3 cultivos de fibroblastos de sujetos control (Control-3, 4 y 5) para lo cual las células se sembraron en el pasaje más bajo que se tenía en cajas de 6 pozos y cuando alcanzaban 80-90% de confluencia se dividieron de manera secuencial al 50% hasta alcanzar una disminución del potencial proliferativo. El cultivo de cada línea fue detenido cuando esta tardaba más de una semana en llegar a confluencia. En estos experimentos cada vez que los fibroblastos se dividían, se sembraban 30,000 células en cubreobjetos de 12mm y el resto de los fibroblastos se sembraban en un pozo de caja de 6 pozos para hacer ensayos de inmunofluorescencia y evaluar la senescencia celular.

6.7 Ensayo de actividad para β -galactosidasa

Para evaluar la senescencia en las células a las cuales se les indujo senescencia replicativa, se midió la actividad de la enzima β -gal con ayuda del Kit Cellular Senescence Assay (Merck Millipore E.U.A) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Para lo cual se sembraron 20 mil células/cm² en portaobjetos de 12 mm se usaron 3 cultivos de fibroblastos de (FPI-2, 5 y 6) y 3 cultivos de fibroblastos de sujetos control (Control-3, 4 y 5). Los fibroblastos se fijaron durante 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron por 18 horas con el Mix de reacción que incluye la solución de X-Gal que es el sustrato cromogénico para la (β -gal). Al día siguiente las muestras se lavaron dos veces con PBS posteriormente se montaron con glicerol y se tomaron imágenes con el microscopio Olympus IX81 a un aumento de 100x. Como control positivo se usó la línea celular A549 a la cual se le indujo senescencia mediante la estimulación con 400 μ M de H₂O₂ durante 3 horas con 16 horas de recuperación y como control negativo se empleó la línea NHLF en pasaje 5 pero de un donador que tenía una edad de 17 años.

6.8 Inmunofluorescencia.

Para evaluar la presencia y localización subcelular de SIRT7 y marcadores de senescencia se sembraron 20 mil células/cm² en portaobjetos de 12 mm previamente

tratados con ácido sulfúrico y clorhídrico (1:1) y se mantuvieron 24 horas en medio solo o en medio con TGF- β 1. Las células se fijaron a -20°C con metanol durante 3 minutos y acetona 2 minutos.

Los sitios inespecíficos se bloquearon con la solución Power Block (Biogenex, California, E.U.A) a temperatura ambiente y se incubaron con los anticuerpos primarios. Anti-SIRT7 (1:75, EpiGentek E.U.A), anti- γ H2AX (1:150, Millipore E.U.A), anti-p21 (1:50, Millipore E.U.A) y anti-H3K18ac (1:150, Millipore E.U.A).

En el caso del ensayo para determinar la ubicación subcelular de SIRT7 se empelaron muestras basales y tratadas con TGF- β 1 durante 24 horas, también se usaron muestras a las cuales se les indujo senescencia, el anticuerpo primario anti-SIRT7 se incubo toda la noche, posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente Alexa Fluor 488.

Para evaluar la colocalización de SIRT7 con marcadores de senescencia se usaron los anticuerpos primarios anti-SIRT7, anti- γ H2AX, anti-p21 y anti-H3K18ac y con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 y Alexa Fluor 594.

Antes de montar todas las muestras, las células se tiñeron con DAPI después fueron montadas con el medio ProLong™ Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, IL, E.U.A). Las imágenes se tomaron con el microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 y con el microscopio confocal Olympus FV1000 a un aumento de 60X. Todas las imágenes capturadas fueron analizadas con el software Image J

6.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software Graph Pad Prism v.5.01 (GraphPad, California, E.U.A).

La primera prueba estadística con la que se analizaron los datos obtenidos fue Shapiro-W para conocer si estos presentaban una distribución normal posteriormente, según la distribución de los datos se realizaron las pruebas T de Student o U de Man-Whitney. Se consideró un valor significativo de p cuando este era ≤ 0.05 .

VII. RESULTADOS

7.1 Características demográficas y clínicas de los pacientes.

En este estudio se incluyeron 7 cultivos primarios de fibroblastos aislados de pulmón de pacientes con FPI que fueron comparadas contra 4 cultivos primarios de fibroblastos de donadores sin enfermedad pulmonar aparente y la línea comercial NHLF (Controles). En el caso de las muestras de pacientes con FPI, 2 líneas provenían de mujeres y 5 de hombres, la edad promedio era de 57.5 años, 4 de los 7 pacientes contaban con antecedentes de tabaquismo. En el caso de los controles, 3 líneas provenían de mujeres y 1 hombre, la edad media fue 47.0 años y solo uno de los controles presentaban antecedentes de tabaquismo. Los datos demográficos se presentan en la tabla 1 y en ella no se incluyeron los datos de la línea comercial NHLF (Tabla 1).

Tabla 1. Características demográficas y clínicas.

		FPI	Controles	p
		% (n=7)	% (n=4)	
Edad*		57,50 ± 6,055	47,00 ± 15,43	0,25
Sexo	Masculino	71,43 (5)	25 (1)	0,24
	Femenino	28,57 (2)	75 (3)	
Tabaquismo	Positivo	57,14 (4)	25 (1)	0,54
	Negativo	42,86 (3)	75 (3)	

Se presentan los porcentajes y número de caso (n) correspondientes a los grupos de estudio. (*) Valor de media y DE.

Como se observa en la tabla 1, no encontramos diferencia estadística en la edad entre pacientes y controles sugiriendo que las muestras se encontraban pareadas por edad. Esto resulta importante debido a que la FPI es una enfermedad asociada al envejecimiento y de esta manera nos aseguramos que los resultados obtenidos no fueron efecto de marcadas diferencias en la edad entre ambos grupos.

7.2 Análisis de integridad del RNA.

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue cuantificar la expresión del gen SIRT7 por qPCR y para ello primero se determinó la calidad del RNA sometiendo las muestras a una evaluación cuantitativa del RIN (RNA Integrity Number) y cuyos valores se muestran en la tabla 2. Con este análisis se descartaron una línea de FPI y una línea control ya que los valores del RIN para estas muestras fueron menores a 6 que es el valor mínimo aceptado para considerar que la muestra tiene la calidad suficiente para ser analizada.

Tabla 2. Valores del análisis de integridad de los RNAs.

Pacientes		Controles	
Línea	RIN	Línea	RIN
FPI-1	8,80	Control-1	9,20
FPI-2	7,40	Control-2	9,0
FPI-3	8,70	Control-3	8,10
FPI-4	8,20	Control-4	7,90
FPI-5	8,80	Control-6	1
FPI-6	8,0		
FPI-7	8,80		
FPI-8	5.40		

En rojo se muestran los valores de RIN de las líneas que fueron descartadas.

7.3 Expresión de SIRT7.

La actividad de SIRT7, así como su presencia o ausencia en procesos patológicos es controversial y la mayoría de los trabajos se han llevado a cabo en cáncer. Respecto a fibrosis pulmonar en la base de datos GEO (Gene Expression Omnibus) existen reportes donde se muestra que la expresión de SIRT7 en pulmón total y en fibroblastos de pulmón de pacientes con FPI comparados con muestras de sujetos control los niveles de expresión son heterogéneos [48] [49].

Como se ha mencionado previamente el objetivo primordial de este trabajo fue analizar la expresión de SIRT7 a nivel de RNA mensajero y a nivel de proteína en fibroblastos de pulmón de pacientes con FPI y compararla contra muestras de sujetos sanos (controles) pareados por edad. Para ello, los fibroblastos se cultivaron en medio completo para tener la expresión en condiciones normales de crecimiento (Basal) y también se estimularon con TGF- β 1, que es una molécula con un alto potencial profibrosante que participa en la activación y diferenciación de fibroblastos y además promueve la aparición de un fenotipo senescente.

En la figura 7 se muestran los resultados de la expresión del gen que fue analizada por qPCR y normalizada utilizando TBP como gen de referencia.

Para evaluar la expresión de gen se utilizaron 7 cultivos primarios de fibroblastos de pacientes y 4 cultivos primarios de fibroblastos de controles. En condiciones basales se observó un aumento en la expresión de SIRT7 en los fibroblastos de FPI comparando contra los fibroblastos de los controles ($P < 0.05$) (Figura 7 A). Cuando las células fueron estimuladas con 5ng/mL de TGF- β durante 6 horas, se encontró que este factor induce una disminución significativa en la expresión de SIRT7 en los fibroblastos de FPI ($p < 0.03$) (Figura 7 C).

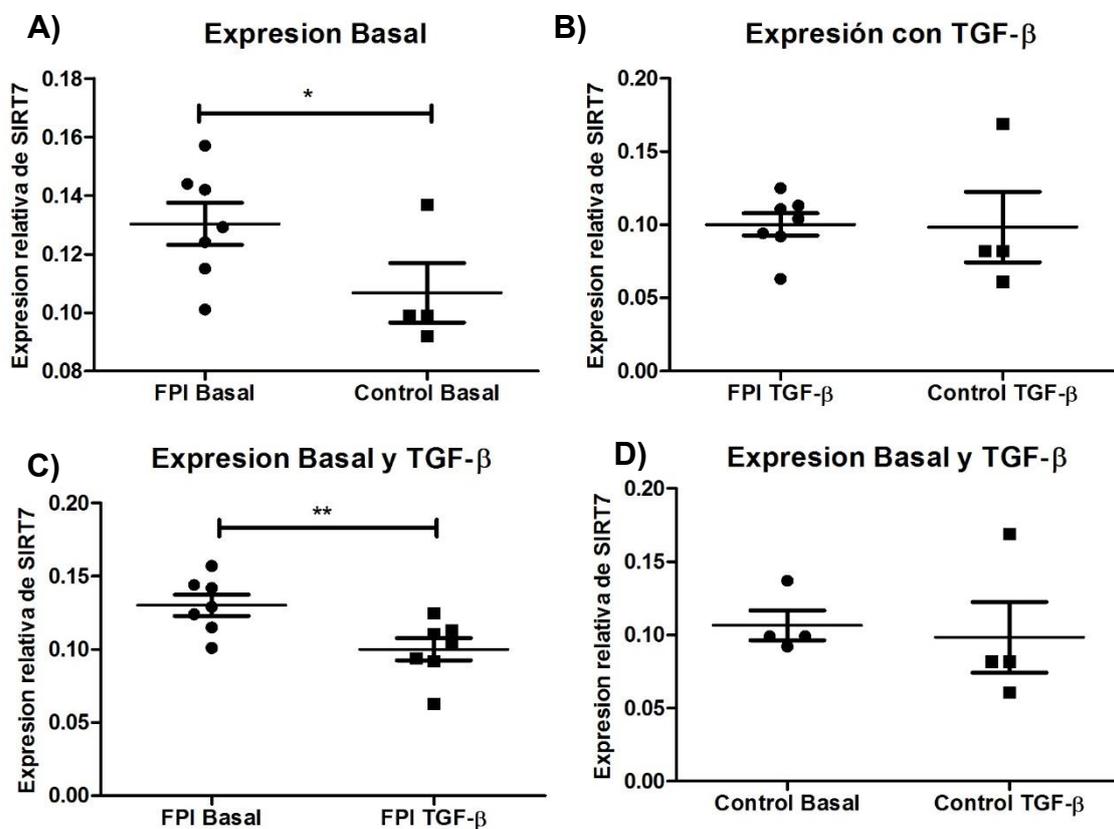


Figura 7. Expresión génica de SIRT7. A) Expresión relativa del mRNA de SIRT7 en cultivos de fibroblastos de pulmón de pacientes comparados con sujetos control ($p=$). B) Expresión relativa del mRNA de SIRT7 en cultivos de fibroblastos de pulmón de pacientes comparados con sujetos control, estimulados con TGF- β 1 ($p=$). C) Expresión relativa del mRNA de SIRT7 en cultivos de fibroblastos de pulmón de pacientes en estado basal comparados con el estímulo de TGF- β 1 ($p=$). D) Expresión relativa del mRNA de SIRT7 en cultivos de fibroblastos de pulmón de sujetos control en estado basal comparados con el estímulo de TGF- β 1 ($p=$) (Para todas las condiciones se aplicó la prueba estadística U- Mann Whitney, FPI $n= 7$ Control $n= 4$).

La respuesta de los cultivos primarios a los estímulos exógenos como el TGF- β 1 siempre es heterogénea, por lo que para poder visualizar de mejor manera el efecto del TGF- β 1 sobre cada una de las líneas utilizadas, se graficaron en barras los datos de

expresión de cada línea utilizada para evaluar la expresión génica (figura 8) y así se observó que el estímulo con TGF- β 1 disminuye la expresión de SIRT7 en todas las líneas de FPI, pero solo en 5 de ellas la disminución es significativa (FPI-1,-2,-5,-6,-7) (figura 8A) mientras que en el caso de los controles, este efecto sólo se observó en 2 de 4 líneas analizadas (Control 1 y 3) (figura 8 B).

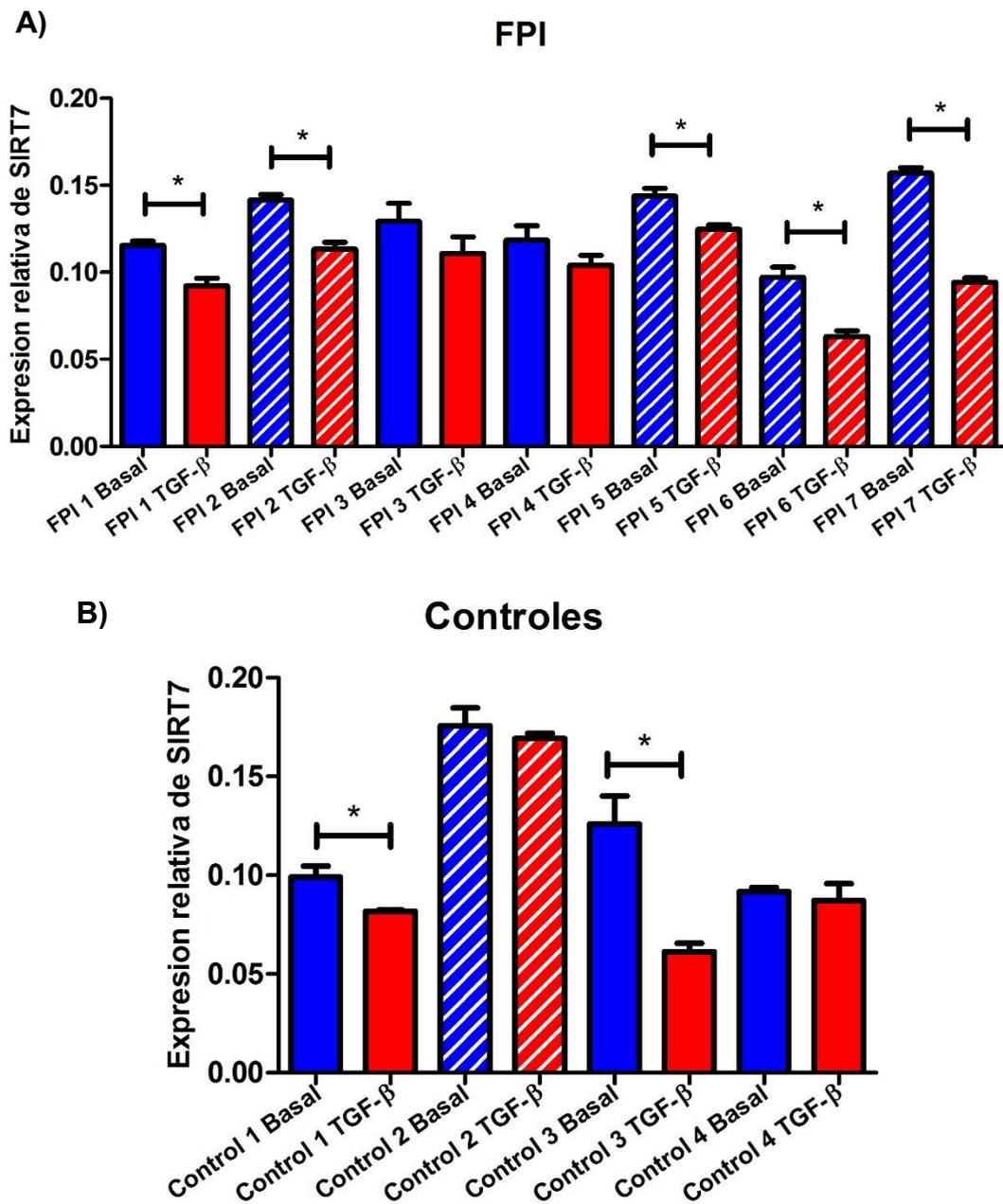


Figura 8. Efecto del TGF- β 1 sobre la expresión de SIRT7. A) Comparación de la expresión del gen de SIRT7 por cultivo de fibroblastos de pacientes, en estado basal y después del tratamiento con TGF- β 1. B) Comparación de la expresión del gen SIRT7 por cultivo de fibroblastos de controles en estado basal y después del tratamiento con TGF- β 1. En azul se muestran los datos basales y en rojo los datos del estímulo con TGF- β 1. En ambas gráficas, las barras con rayas representan las líneas positivas para el consumo de tabaco. (Para todas las condiciones se aplicó la prueba estadística U- Mann Whitney, FPI n= 5 Control n= 4).

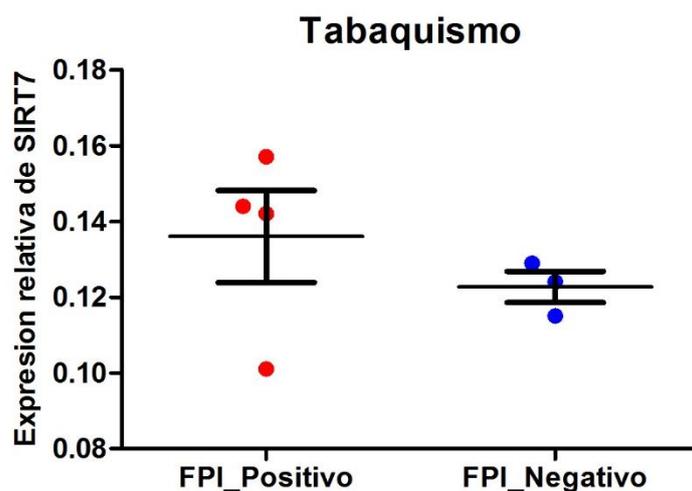


Figura 9. Efecto del tabaquismo sobre la expresión de SIRT7. En azul se muestran los datos de expresión de mRNA de los pacientes con antecedentes de tabaquismo y en rojo los datos de expresión de mRNA de los pacientes sin antecedentes de tabaquismo. (Para todas las condiciones se aplicó la prueba estadística U- Mann Whitney. $p=0.200$)

Una de las características clínicas más relevantes en estudios que involucran al pulmón es el hábito de fumar. A pesar de que no pudimos tener acceso a todos los expedientes clínicos de los controles, en el caso de los pacientes con FPI si pudimos comprobar si tenían o no antecedentes de tabaquismo. La figura 9 muestra la expresión de SIRT7 en fibroblastos de pacientes con FPI tomando en cuenta esta característica, se observó una tendencia en la disminución de SIRT7 en fibroblastos de pacientes que no fumaban. A su vez, como se ilustra en la figura 8 tres de los pacientes sobre los que TGF- β 1 tuvo en efecto contaban con antecedentes de tabaquismo.

La nomenclatura que reciben las líneas en la figura 8 fue la misma que se aplicó en todo el texto. La línea control 5 representa a la línea NHLF 70.

7.4 Expresión de SIRT7 a nivel de proteína.

Además de la evaluación de la expresión del gen de SIRT7 también nos interesaba conocer los niveles de expresión de la proteína SIRT7, por lo cual se realizó la extracción total de proteínas de tres cultivos de fibroblastos de pacientes (FPI 1, 3 y 4) y de tres cultivos de fibroblastos control (Control 3, 4 y 5), en condición basal y después del estímulo con 5ng/mL de TGF- β 1 durante 24 horas. Los extractos fueron evaluados mediante ensayos de western blot (figura 10).

En el análisis de densitometría se observó que a nivel de proteína los fibroblastos de los pacientes presentaban una mayor expresión basal de SIRT7 con respecto al control ($p=0.05$) (figura 10 B). Al igual que a nivel génico los fibroblastos de pulmón de los

pacientes estimulados con TGF- β 1 muestran una tendencia a la disminución de SIRT7 ($p=0.07$); sin embargo, el análisis estadístico no arrojó diferencias.

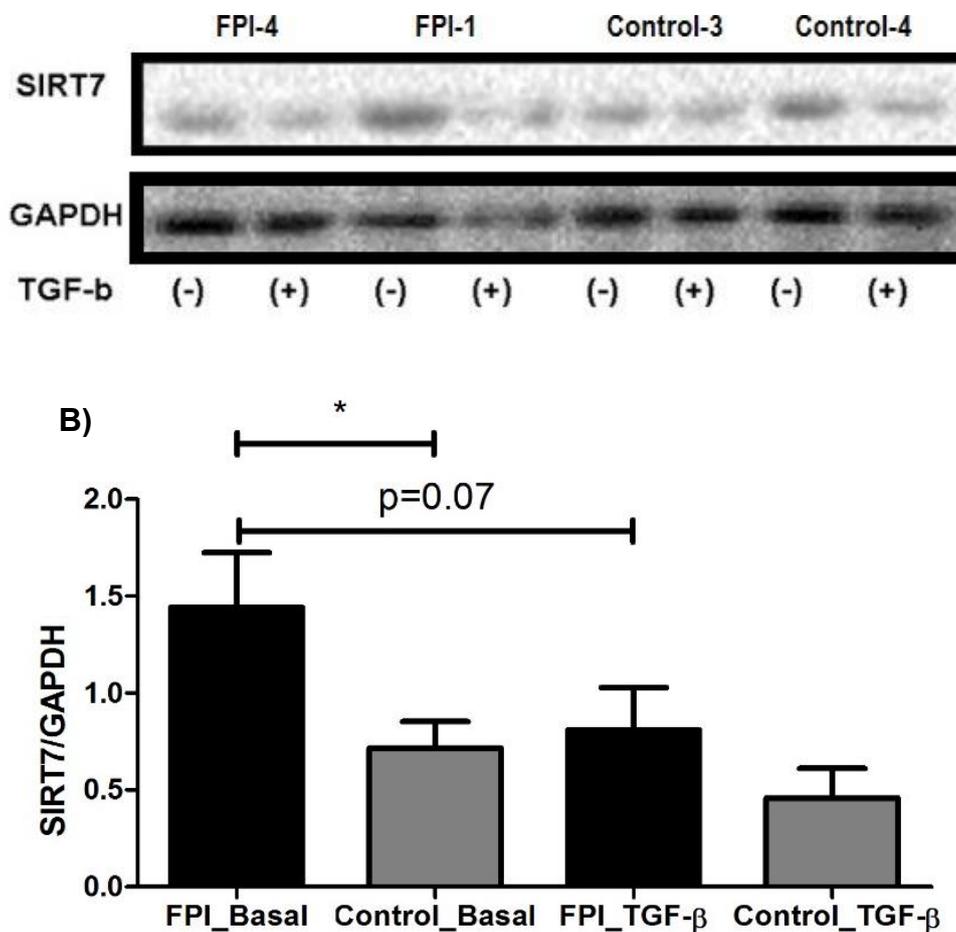
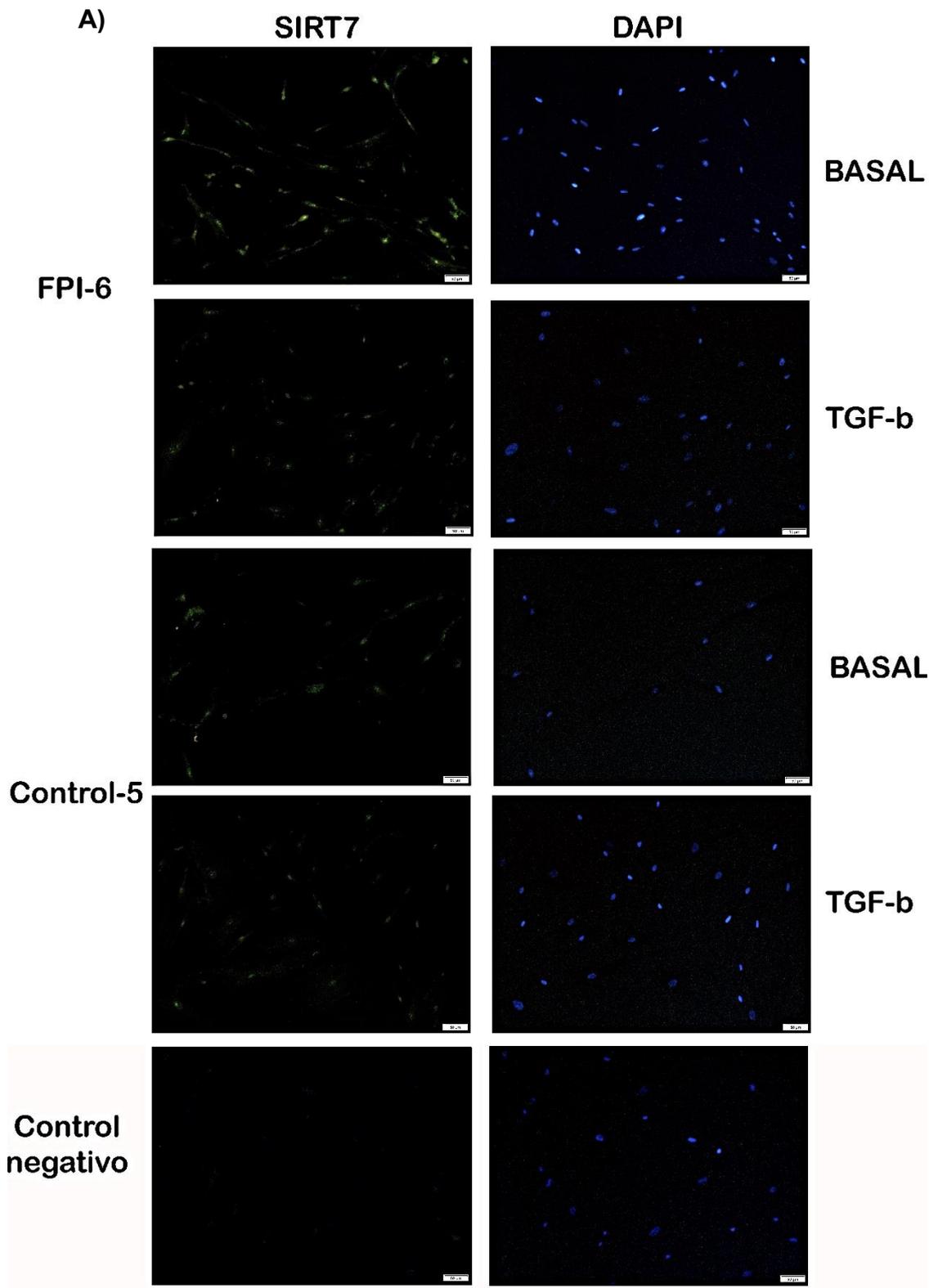


Figura 10. Expresión total de SIRT7 a nivel de proteína. A) Muestra representativa de un Western Blot. B) Análisis de densitometría de cultivos de fibroblastos de pacientes y controles en estado basal y estimulados con TGF- β 1 durante 24 (Se aplicó la prueba estadística U- Mann Whitney, FPI n= 3 Control n= 3).

Además de los experimentos de western blot, se llevó a cabo evaluación de la expresión de la proteína mediante ensayos de inmunofluorescencia, para lo cual se usaron 4 cultivos de fibroblastos de FPI (FPI 1, 2, 4 y 6) y 3 cultivos de fibroblastos de sujetos control (Control 3, 4 y 5). En la figura 11 A) se observan las imágenes capturas por microscopia de fluorescencia a un aumento de 100x, se obtuvo el porcentaje de células positivas en ambos grupos, no se observaron diferencias (figura 11 B). Los resultados obtenidos mediante esta técnica no son contradictorios con los obtenidos mediante western blot debido a que la inmunofluorescencia refleja la presencia o ausencia de células positivas y el western blot refleja nivel de expresión en general.



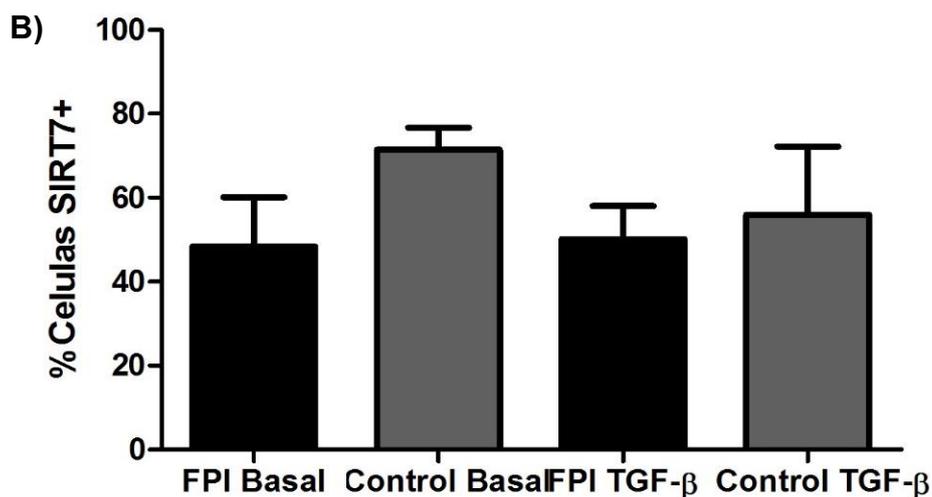


Figura 11. Expresión de SIRT7 evaluada por inmunofluorescencia. A) Imagen representativa un cultivo de fibroblastos de paciente con FPI y un sujeto control, en estado basal y estimulados con TGF-β1. Imágenes en aumento 100x. B) Gráfica representativa del porcentaje de células positivas para SIRT7 (Se aplicó la prueba estadística U- Mann Whitney, FPI n= 4, Control n= 3).

Los resultados observados a nivel de RNA mensajero y proteína en fibroblastos de pulmón de pacientes con FPI muestran que existe una mayor expresión de SIRT7 en estado basal si se comparan con la expresión de los fibroblastos de pulmón de sujetos sin enfermedad pulmonar. También se encontró que el estímulo con TGF-β1 disminuye la expresión de gen pero no de la proteína.

7.5 Localización subcelular de SIRT7.

SIRT7 es una proteína que a nivel subcelular se ubica principalmente en núcleo con mayor abundancia en nucléolo sin embargo, reportes previos demostraron que la localización de esta proteína se puede modificar en fibroblastos senescentes en donde se ubica también en citoplasma [47]. Debido a que reportes previos sugieren que los fibroblastos de FPI presentan un fenotipo senescente [50] [51], nos interesamos en conocer la ubicación de esta proteína en fibroblastos de pulmón, por lo que se realizaron experimentos de western blot de las fracciones celulares de núcleo y citoplasma e inmunocitofluorescencia.

Para asegurar que la extracción de las proteínas de núcleo y citoplasma se realizaba de manera adecuada se llevó a cabo un ensayo de western blot en el que se corrieron proteínas de núcleo y citoplasma en una misma membrana, posteriormente la membrana se incubó con los anticuerpos anti GAPDH y lámina (figura 12).

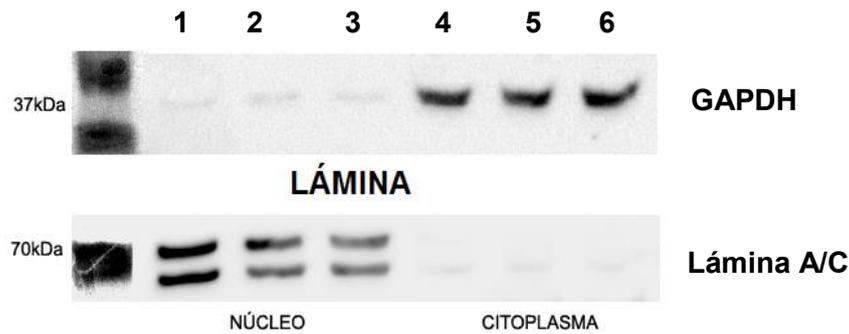


Figura 12. Estandarización de la extracción de proteína de núcleo y citoplasma. Imagen representativa de WB contra GAPDH y lamina A. Carriles 1-3 extractos nucleares. Carriles 4-6 extractos citosólicos.

En el ensayo de estandarización se observó poca contaminación de núcleo en citoplasma y viceversa, a pesar de esto, en los experimentos de western blot de las fracciones nucleares y citoplasmáticas posteriores la membrana de núcleo se incubo con GAPDH y la de citoplasma con lámina para comprobar que el fraccionamiento celular se realizaba de manera adecuada.

En los ensayos de western blot del fraccionamiento celular se usaron 3 cultivos de fibroblastos de pacientes (FPI 2,4 y 6) y 3 cultivos de fibroblastos de sujetos control (Control 3, 4 y 5) (figura 13), en el caso de los extractos de citoplasma los resultados son muy heterogéneos, no se observó diferencia en la expresión de la proteína a nivel de citoplasma entre ambos grupos. Tampoco hubo diferencia en los niveles de expresión después del estímulo con TGF- β 1 en ninguno de los grupos de estudio (FPI y controles) (figura 13 A).

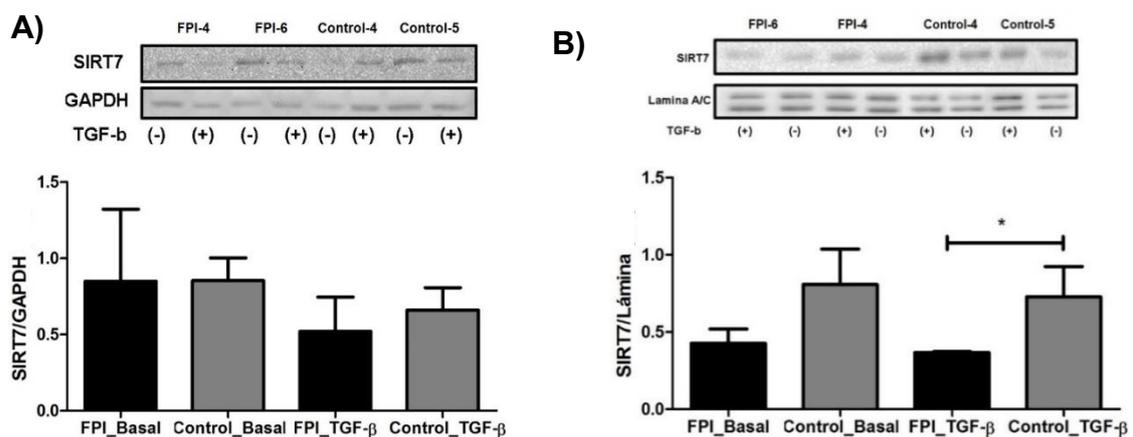


Figura 13. Expresión de SIRT7 en extractos de citoplasma y núcleo. A) Muestra representativa de un Western Blot de extractos de citoplasma de cultivos de fibroblastos, debajo el análisis densitométrico de fibroblastos de pulmón de pacientes con FPI y de sujetos control en estado basal y con TGF- β 1 durante 24h. B) Muestra representativa de un Western blot de extractos de núcleo, debajo el análisis densitométrico de fibroblastos de pulmón de pacientes con FPI y fibroblastos de pulmón de sujetos control en estado basal y estimulados con TGF- β 1 durante 24h (Se aplicó la prueba estadística U- Mann Whitney, FPI n= 3 Control n= 3).

En cuanto a la expresión en núcleo no se encontraron diferencias significativas en estado basal entre los fibroblastos de FPI y de controles, pero se observó una disminución significativa ($p=0.050$) de SIRT7 en los fibroblastos de pacientes con FPI con respecto a los fibroblastos de los sujetos control que fueron tratados con TGF- β 1 (figura 13 B).

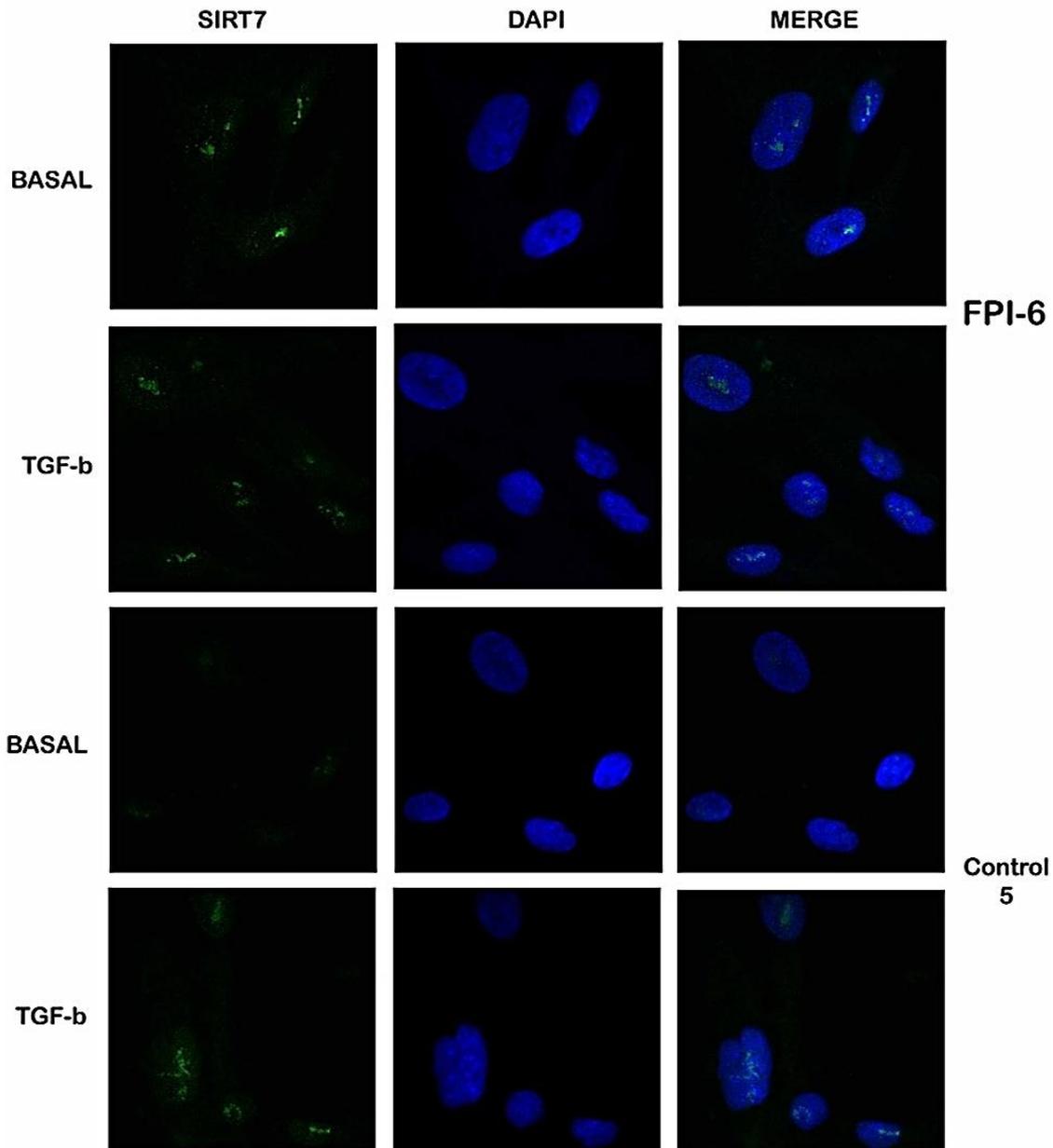


Figura 14. Inmunofluorescencia para detectar la localización subcelular de SIRT7. Tinción de núcleo en Hoescht 34580 y SIRT7 en Alexa 488. Fibroblastos en estado basal a un aumento 600x En la parte superior las imágenes representativas de un cultivo de fibroblastos de pulmón de un paciente con FPI estado basal y estimulados con TGF- β 1, debajo se muestran las imágenes representativas de una línea fibroblastos de pulmón de sujetos control.

En fibroblastos de pulmón de pacientes con FPI y de controles, SIRT7 está presente tanto en citoplasma como en núcleo y no se observa un incremento en ninguna de las dos fracciones con el experimento de western blot, sin embargo, hay una tendencia al enriquecimiento de esta proteína en el núcleo de los fibroblastos de los controles con y sin estímulo de TGF- β 1 en comparación con los de FPI.

A continuación, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia para evaluar mediante otra técnica cual era la localización subcelular de SIRT7 en los fibroblastos de pulmón; se analizaron 3 cultivos de fibroblastos de pacientes con FPI (FPI 2, 4 y 6) y 3 cultivos de fibroblastos de pacientes controles (Control 3, 4 y 5) en ambos grupos se evaluó la localización en células en estado basal y después del ser estimuladas con TGF- β 1 (figura 14).

Los resultados obtenidos con los experimentos de western blot mostraban que la proteína se distribuye tanto en núcleo como en citoplasma sin embargo con las imágenes obtenidas del microscopio confocal a un aumento de 600x se encontró que en ambos grupos de estudio SIRT7 se distribuye principalmente en núcleo (figura 14).

7.6 Ensayo para evaluar senescencia celular en fibroblastos.

Recientemente se ha propuesto que la senescencia celular juega un papel preponderante en la aparición de un fenotipo fibrótico [50]. En el presente trabajo se trabajó con un modelo de inducción de senescencia para evaluar los niveles de expresión de SIRT7 y la presencia de marcadores de senescencia en fibroblastos de pulmón.

En las células a las cuales se les indujo senescencia replicativa se realizaron ensayos para determinar la presencia de la enzima β -gal activa que es un importante marcador de senescencia para lo cual se utilizaron 3 cultivos de fibroblastos de (FPI-2, 5 y 6) y 3 cultivos de fibroblastos de sujetos control (Control-3, 4 y 5) y como control negativo la línea NHLF17.

Los resultados obtenidos demostraron la presencia de la enzima β -gal en los fibroblastos de pacientes con FPI en pasaje bajo (pasaje 5) también se observó este marcador de senescencia en fibroblastos de FPI en pasajes altos (pasaje 9). De igual manera se reportó la presencia de la enzima β -gal activa en fibroblastos de pulmón de sujetos control en pasajes bajo (pasaje 5) y en pasajes altos (pasaje 7) (figura 15).

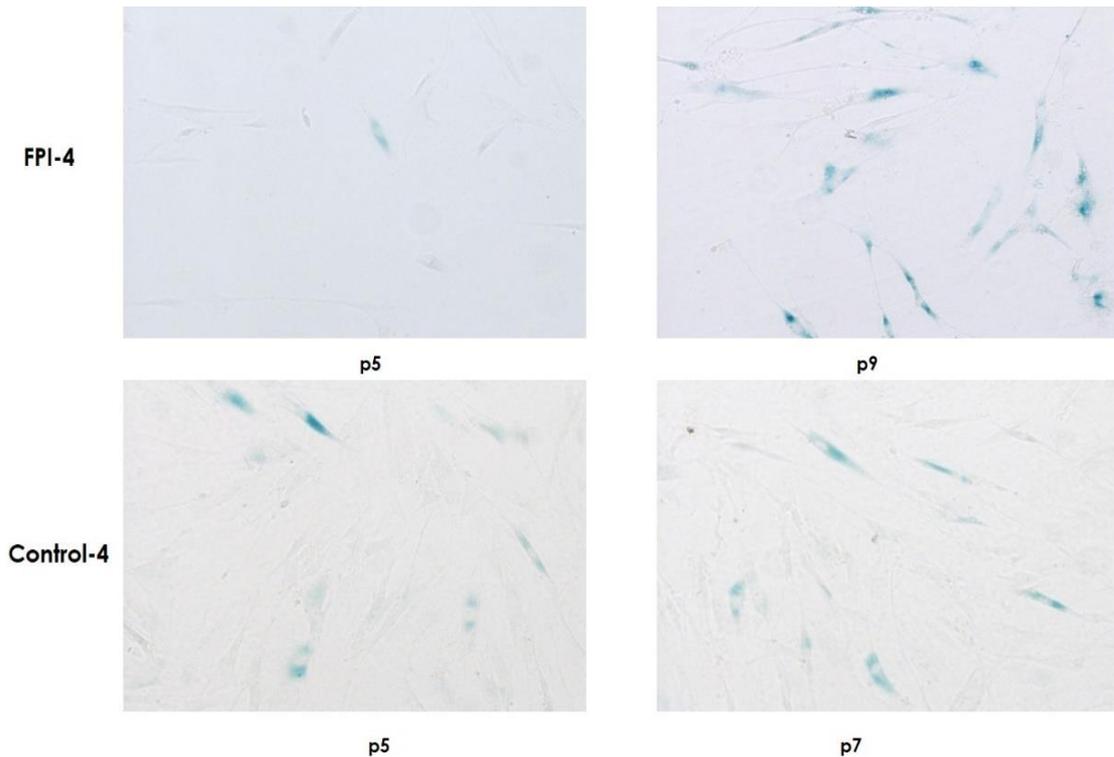


Figura 15. . Evaluación de senescencia en fibroblastos. En la parte superior se presenta una imagen representativa de un cultivo de fibroblastos de FPI, a la izquierda pasaje temprano a la derecha pasaje alto. Debajo una imagen representativa de un cultivo de fibroblastos de sujetos control, a la izquierda pasaje temprano a la derecha pasaje alto. (FPI n= 3 y Control n= 3).

7.7 Identificación de marcadores de senescencia.

SIRT7 es una proteína que ha sido asociada a senescencia celular [36], por lo que nos interesó conocer si existe una asociación entre marcadores de senescencia y la expresión de esta proteína en fibroblastos de pulmón.

Se observó que en ambos grupos de estudio la distribución subcelular de la proteína ocurría principalmente en núcleo (figura 16) aunque en la línea de FPI-6 se puede observar también distribución en citoplasma en un pasaje alto, respecto a los ensayos de Western blot de las fracciones celulares se observó que esta línea presentaba disminución de SIRT7 en núcleo en comparación con los cultivos de fibroblastos de los sujetos control y a nivel génico el TGF- β 1 promovía la disminución del gen de SIRT7 (figura 16).

En ambos grupos de estudio se observó que en pasajes altos la proteína se re-distribuía del nucléolo al nucleoplasma, sin embargo, los resultado no representan un fenómeno global.

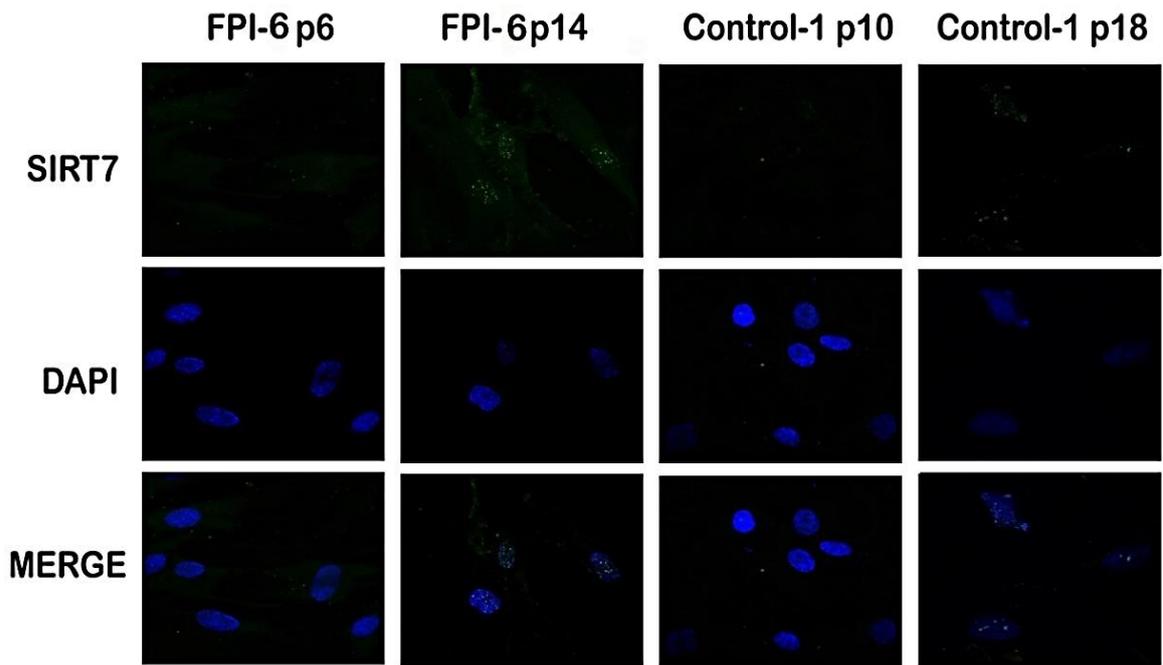
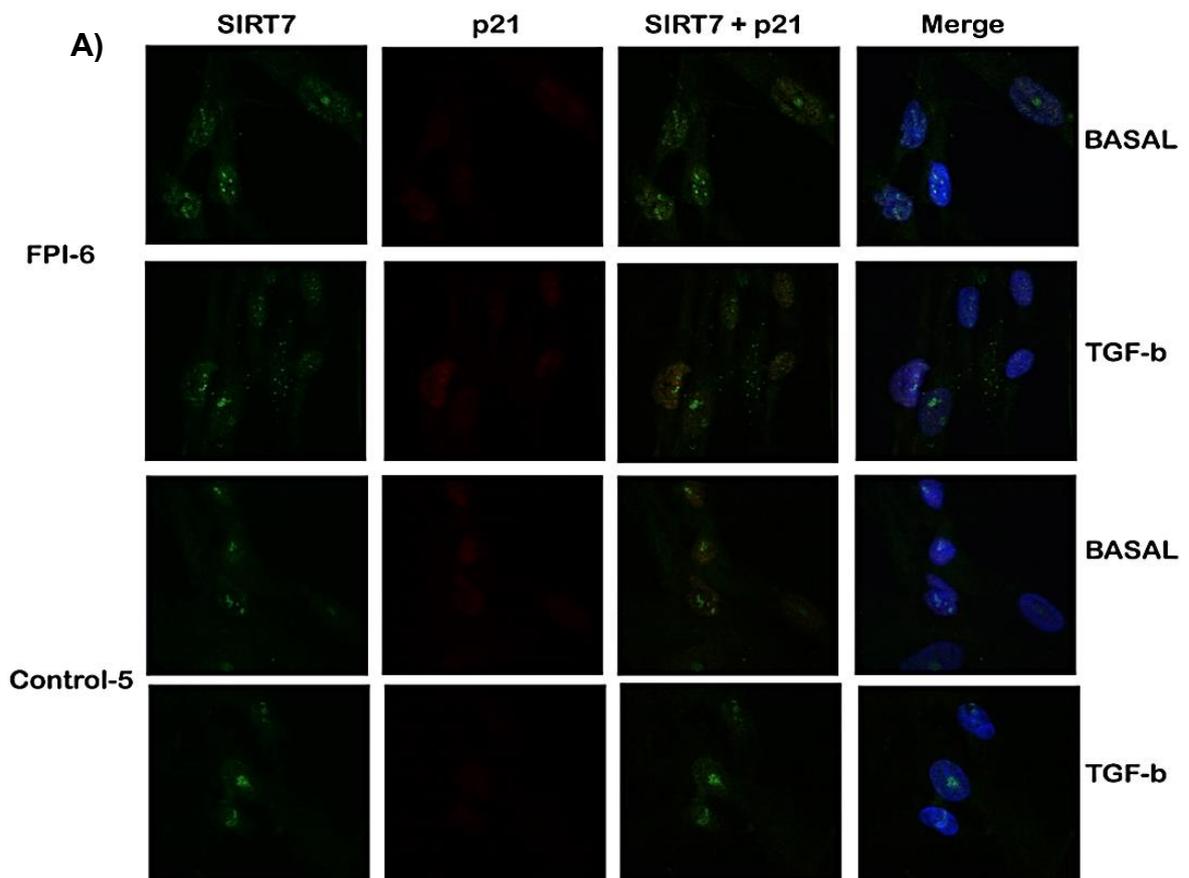


Figura 16. Inmunofluorescencia de SIRT7 en fibroblastos senescentes. Tinción de núcleo en Hoescht 34580 y SIRT7 en Alexa 488. Imagen representativa de un cultivo de fibroblastos de FPI y un cultivo de fibroblastos de sujeto control, se observó marca positiva para SIRT7 en el citoplasma de fibroblastos de FPI (FPI n=3 y control n=3).



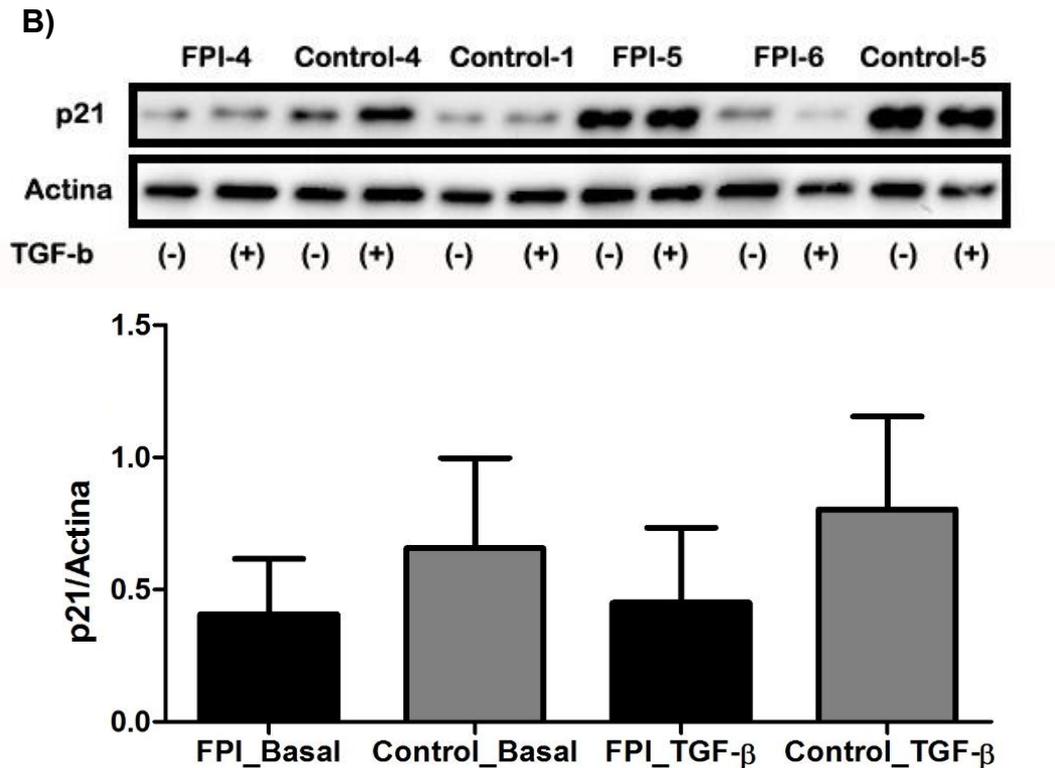


Figura 17. Expresión de SIRT7 y p21. Tinción de núcleo en Hoescht 34580, SIRT7 en Alexa 488 y p21 en Alexa 546. A) Se muestra la imagen representativa de un paciente y un sujeto control en estado basal y estimulados con TGF-β1. B) Análisis densitométrico de fibroblastos de pacientes y controles en estado basal y estimulados con TGF-β1 durante 24h (Se aplicó la prueba estadística U- Mann Whitney, FPI n= 3 y Control n= 3).

Otro de los objetivos del proyecto fue evaluar la presencia marcadores de senescencia en fibroblastos. En principio se valoró la expresión de p21, los ensayos de fluorescencia mostraron que esta proteína se expresa en los fibroblastos de pulmón de pacientes y controles en estado basal así como después haber sido estimuladas con TGF-β1 durante 24 horas. Se observó una tendencia al incremento de la expresión de la proteína después del tratamiento con TGF- β1 (figura 17 A).

Los resultados obtenidos en el western blot de p21 de lisados totales de los cultivos de fibroblastos de pacientes y controles no revelaron diferencias en la expresión de esta proteína entre pacientes y controles, pero al igual que en los datos observados por inmunofluorescencia existía una tendencia al incremento en la expresión de p21 en los fibroblastos de pulmón de pacientes y controles estimulados con TGF-β1 (figura 17 B). En los fibroblastos de pacientes y controles que se les indujo senescencia replicativa, fue posible la identificación de células positivas para p21 (figura 18).

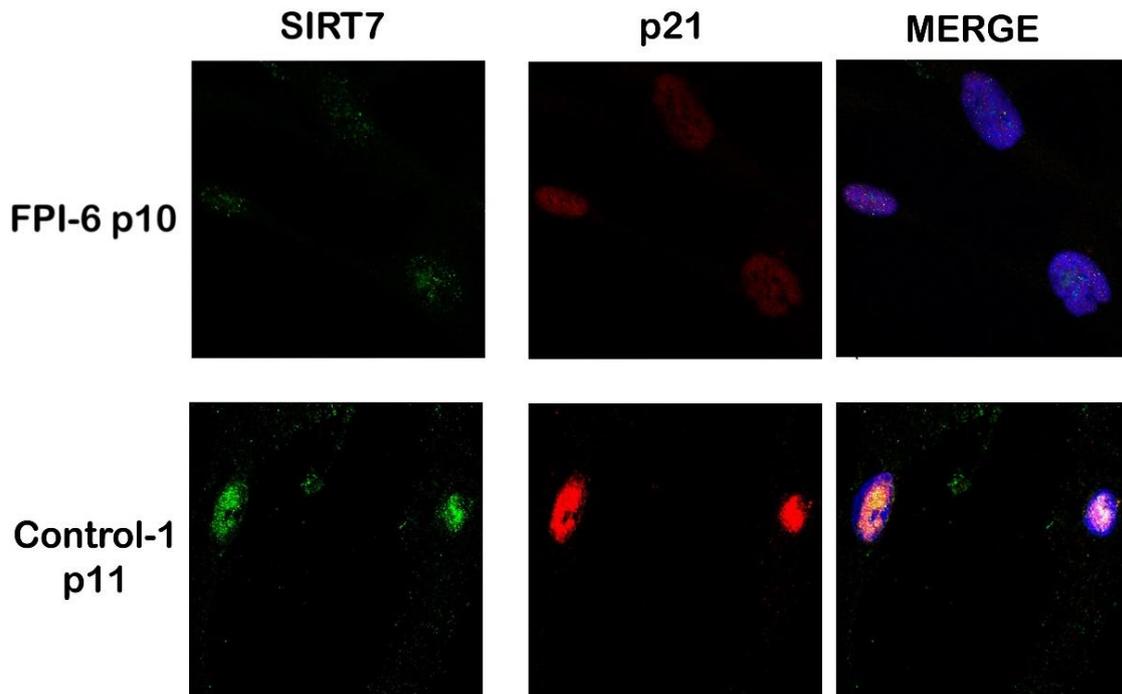


Figura 18. Inmunofluorescencia de SIRT7 y p21. Tinción de núcleo en Hoescht 34580, SIRT 7 en Alexa 488 y p21 en Alexa 546. Fibroblastos en estado basal a un aumento 600x. En la parte superior las imágenes representativas de fibroblastos senescentes de pulmón de FPI, debajo se muestran las imágenes representativas de fibroblastos senescentes de pulmón de sujetos control. (FPI=3, Controles=3).

Continuando con la expresión de marcadores de senescencia se evaluó la modificación de histonas pH2AX en los fibroblastos a los que se les indujo senescencia, se identificó la presencia de células positivas para este marcador en las muestras de pacientes y controles en pasajes altos (pasaje 10-11) (figura 19).

Uno de los principales blancos de SIRT7 a nivel de cromatina es la modificación de histonas H3K18ac, que además tiene implicaciones en el daño al DNA [52], por lo cual se evaluó la expresión de esta modificación en 3 cultivos de fibroblastos de FPI (FPI 2, 4 y 6) y en 3 cultivos de fibroblastos de sujetos control (3, 4 y 5), se encontró que esta modificación de la histona H3 se expresa en fibroblastos de pulmón de pacientes y en sujetos control en pasajes bajos (pasaje 4-6) y había una tendencia a disminución de la expresión de esta en los pasajes altos (pasaje 10 a 14) (figura 20).

Finalmente en los cultivos primarios de fibroblastos de pacientes y de sujetos control que fueron estimuladas con TGF- β 1 también se reportó una tendencia a la disminución de esta marca de acetilación de la histona H3 (figura 21).

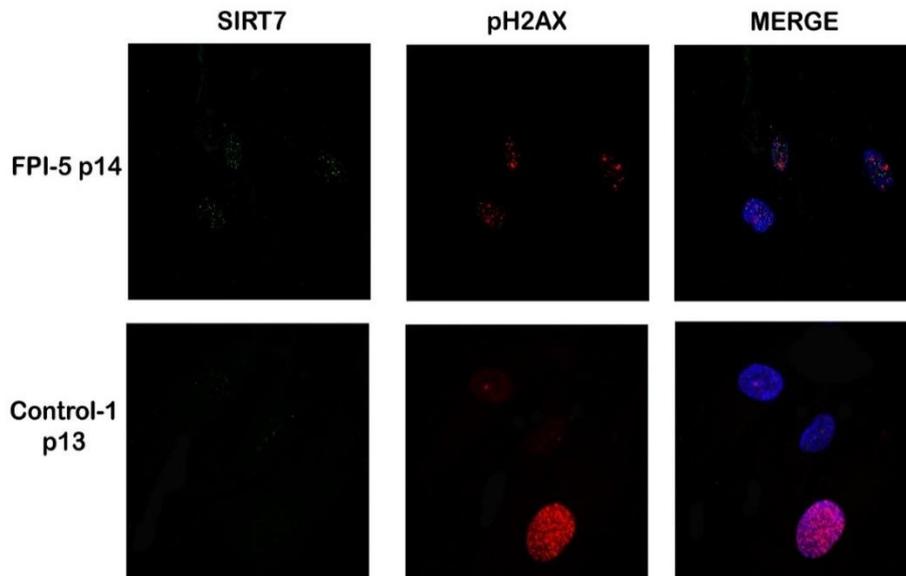


Figura 19. Inmunofluorescencia de SIRT7 y pH2Ax. Tinción de núcleo en Hoescht 34580, SIRT7 en Alexa 488 y pH2AX en Alexa 546. Se muestra la imagen representativa de un sujeto control y un paciente en estado basal en un pasaje tardío a un aumento 60x (FPI n= 3 y Control n= 3).

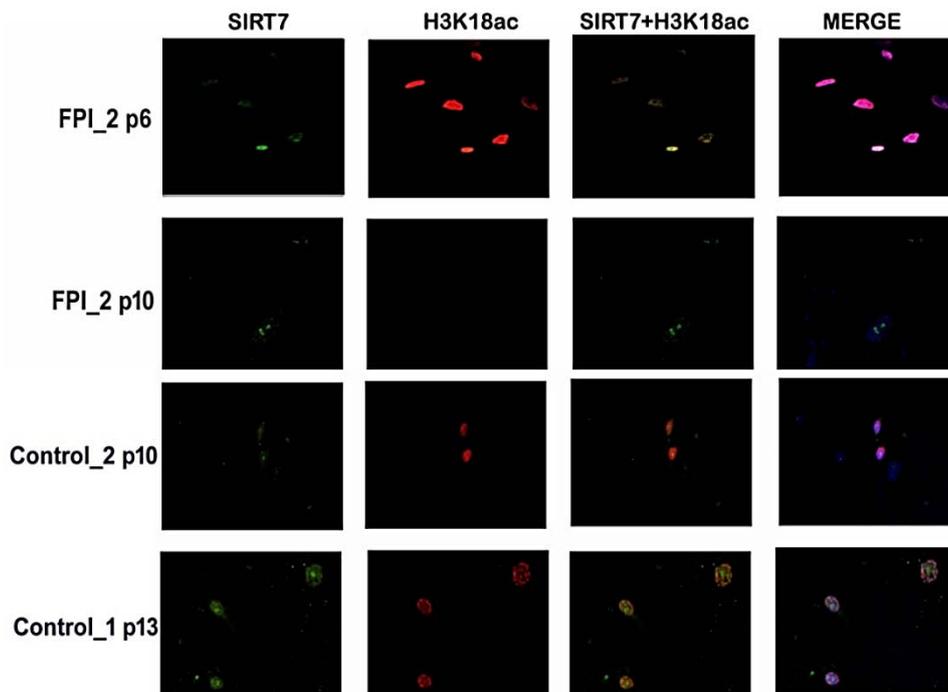


Figura 20. Inmunofluorescencia de SIRT7 y H3K18ac en células senescentes. Tinción de núcleo, SIRT7 en en Hoesch 34580 Alexa 488 y H3K18ac en Alexa 546. Se muestra la imagen representativa de un sujeto control y un paciente en estado basal en un pasaje temprano y uno tardío a un aumento 60x (FPI n= 3 y Control n= 3).

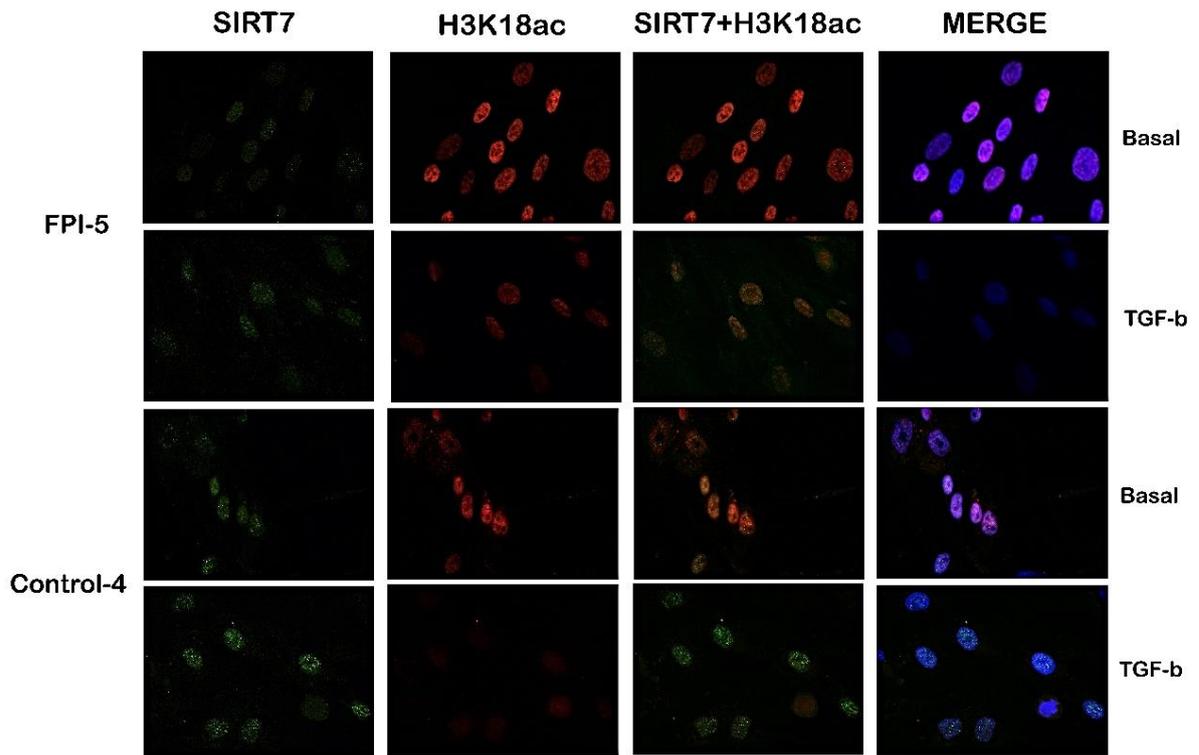


Figura 21. Inmunofluorescencia de SIRT7 y H3K18ac. Tinción de núcleo en Hoescht 34580, SIRT7 en Alexa 488 y H3K18ac en Alexa 546. Se muestra la imagen representativa de un sujeto control y un paciente en estado basal y bajo el estímulo con a un aumento 60x (FPI n= 3 y Control n= 3)

VIII. DISCUSIÓN

La fibrosis pulmonar idiopática es una patología crónica y letal que generalmente ocurre en individuos adultos mayores por lo que hoy es considerada como una enfermedad asociada al envejecimiento [53]. Evidencias recientes indican que los fibroblastos de pulmón de pacientes con FPI pueden tener un fenotipo senescente con características aberrantes, incluyendo la presencia de mitocondrias disfuncionales, y que son estos fibroblastos senescentes una pieza importante para la progresión de la enfermedad [54]. Las sirtuinas y en particular SIRT1, son proteínas que desempeñan un papel esencial en la regulación de procesos asociados al envejecimiento, como la senescencia celular y recientemente también se les ha considerado como moduladores implicados en la fibrosis pulmonar. En este contexto, no está completamente clarificado si en estas células la presencia o ausencia de SIRT7 puede ser asociada a un fenotipo senescente y de manera importante, en este trabajo también evaluamos el efecto del TGF-beta en la expresión de esta proteína en fibroblastos pareados por edad.

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue examinar si en condiciones basales existían o no diferencias en la expresión de SIRT7 entre fibroblastos de FPI y controles sanos. Nuestros resultados muestran una mayor expresión de SIRT7 tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína en fibroblastos de pacientes con FPI en comparación con los controles, lo cual podría sugerir que esta proteína tiene un papel pro-fibrosante. Los resultados de expresión encontrados en nuestro trabajo son importantes debido a que la información previa sobre los niveles de expresión de esta sirtuina es escasa y en este sentido, un aspecto trascendental de nuestros datos es el hecho de los resultados de expresión contradicen a lo reportado en estudios previos, en donde la constante apunta a que SIRT7 puede ser una molécula antifibrosante debido a que se encuentra disminuida. En este particular, recientemente Wyman y colaboradores [55] reportaron que SIRT7 se encuentra disminuida en fibroblastos de pulmón de pacientes con FPI comparados con fibroblastos de sujetos control.

Las diferencias entre lo que encontramos y lo que ya se ha reportado pueden ser debidas a varios factores, incluyendo las características clínicas de los pacientes y donadores, así como el pasaje en donde fueron estudiadas. Las muestras utilizadas en nuestro trabajo fueron pareadas por edad y por pasaje y esto no está especificado en los reportes previos. Adicionalmente, nuestros datos mostraron una tendencia que sugiere que fumar puede incrementar la expresión de SIRT7 en fibroblastos de pacientes con FPI y este dato no es analizado en los reportes previos y podría ser un

elemento importante para considerar en el sesgo de los resultados; sin embargo, es necesario analizar más muestras para poder corroborar esta aseveración.

En varios tipos de cáncer se ha reportado que SIRT7 se encuentra incrementada y se le ha considerado como un oncogén[38], [39] y algunos estudios han planteado la idea de que existe una asociación entre en desarrollo de FPI y el desarrollo de cáncer de pulmón [56], [57]. Aunque no contemplamos experimentos para establecer dicha asociación y las características clínicas de los pacientes no permiten sacar alguna conjetura al respecto, sería importante considerar futuros experimentos para ver si en muestras de tejido de estos pacientes se puede observar alguna asociación entre la expresión de SIRT7 y marcadores de cáncer.

A pesar de que nuestros resultados contradicen a lo ya publicado por Wyman [55] creemos que abonan en el sentido de que deja claro que es necesario considerar análisis más minuciosos de las características clínicas de los pacientes de donde provienen las muestras para establecer si existe o no una diferencia en la expresión de esta proteína entre pacientes y sujetos control pareados por edad, ya que incluso en la base de datos GEO los reportes de expresión de SIRT7 en tejido pulmonar y en fibroblastos derivados de pacientes con FPI la expresión de SIRT7 es heterogénea y no se pueden establecer diferencias contra los controles [44, 45].

Otro objetivo de nuestro trabajo era analizar si TGF- β 1 tenía un efecto en la expresión de SIRT7. De manera interesante encontramos que este factor de crecimiento disminuye significativamente SIRT7 en el grupo de FPI, pero no tiene efecto sobre el grupo control. TGF- β 1 es una de las principales moléculas que promueven y mantienen un fenotipo fibrótico en fibroblastos además de ser un promotor de senescencia [10], [45]. Los trabajos encaminados a establecer el efecto del TGF- β en la expresión de sirtuinas en fibroblastos de pulmón son escasos y en el caso de FPI no existen reportes previos que describan si TGF- β 1 modifica la expresión de SIRT7 por lo que nuestros resultados serían los primeros en describir este efecto. Cuando los datos de expresión se graficaron de manera individual en cada grupo, observamos que en 5 de las 7 muestras de FPI TGF- β 1 disminuye a SIRT7 mientras que en los controles solo en 2 de las 4 líneas utilizadas observamos este comportamiento. De manera interesante, 4 de las 5 muestras de fibroblastos de FPI en donde TGF- β 1 disminuyó la expresión de SIRT7 también corresponden a pacientes con tabaquismo positivo mientras que en los controles las dos líneas en donde TGF- β 1 tuvo efecto provienen de pacientes que no fumaban por lo que nuevamente el tabaquismo resultaría un componente importante a considerar en futuros trabajos.

Adicional al efecto sobre SIRT7, también evaluamos si TGF- β 1 modifica algunos marcadores de senescencia y encontramos que este factor incrementa la expresión de

p21 lo cual podría indicar una mayor susceptibilidad al desarrollo de fibrosis en fibroblastos normales y de FPI. En este sentido un trabajo publicado por Sosulski y colaboradores [43] muestra que en fibroblastos de pulmón normal TGF- β 1 induce una disminución significativa en la expresión de SIRT3 y que esta disminución está asociada con una disminución en la respuesta antioxidante en un fenotipo senescente que favorece el desarrollo de fibrosis pulmonar.

Después de haber analizado la expresión de SIRT7, nos enfocamos en tratar de establecer si existía una diferencia en la distribución subcelular de la proteína. Encontramos a SIRT7 en núcleo y citoplasma, aunque su distribución es más abundante en núcleo. Estudios previos han reportado que SIRT7 es una proteína localizada principalmente en el núcleo y específicamente en el nucléolo, pero en el trabajo de Kiran et al, se describió que en fibroblastos fetales de pulmón senescentes, la distribución de SIRT7 se ve modificada ya que se pierde la expresión en núcleo y únicamente se observa la proteína en citoplasma [47]. Únicamente observamos la expresión de SIRT7 en el citoplasma de una línea de FPI. Se ha descrito que la expresión de SIRT7 en citoplasma es mediada por la interacción con Dicer, en respuesta a daño al DNA, durante esta alteración SIRT7 se acumula en el citoplasma en donde a su vez ocurre un incremento en la expresión de Dicer, aunque, en la actualidad se desconoce si la sobreexpresión de Dicer impide la transportación del nuevo SIRT7 sintetizado al núcleo o promueve la translocación del SIRT7 de núcleo a citoplasma [52]. No obstante, en algunos cultivos de pacientes y controles se observó que en el último pasaje alcanzado, la proteína pasaba del nucléolo al nucleoplasma; sin embargo, los resultados no representan un fenómeno global. Estudios previos han demostrado la redistribución de SIRT7 del nucléolo al nucleoplasma en condiciones de estrés genómico en un intento por promover la supervivencia celular [58], [59]. Por lo que la redistribución que observamos en algunos cultivos de fibroblastos a los que se les indujo senescencia puede deberse a que SIRT7 podría estar promoviendo supervivencia favoreciendo el fenotipo senescente que se ha propuesto como un elemento fundamental en el desarrollo y progresión de la enfermedad, aunque este es un fenómeno donde los mecanismos moleculares aún permanecen en estudio.

Por otra parte, analizamos la acetilación de la H3K18ac y encontramos que se encuentra disminuida en fibroblastos senescentes y después del estímulo de TGF- β 1 lo que sugiere que esta desacetilación pudiera estar implicada en la expresión de genes de senescencia y/o profibrosantes que favorecen la continuidad de la enfermedad. En cáncer la desacetilación de H3K18 por parte de SIRT7 se asocia a el mantenimiento de un fenotipo canceroso más agresivos [60]. En nuestras células, TGF- β 1 disminuye H3K18ac y SIRT7, sin embargo, en el caso de la histona acetilada también se ha visto

que SIRT6 puede modificarla [61]. Evidencias sugieren que la SIRT6 promueve la senescencia de células epiteliales [45] en FPI, por lo que también resultaría importante evaluar la participación de SIRT6 en los fibroblastos de FPI.

IX. CONCLUSIONES

- Existe un aumento en la expresión del gen y la proteína de SIRT7 en los cultivos de fibroblastos de pacientes con FPI comparados con los cultivos de fibroblastos de los sujetos control. Los pacientes con antecedentes de tabaquismo muestran mayores niveles de expresión a nivel de mRNA, por lo que el hábito de fumar debe ser factor importante a considerar en los análisis de expresión de esta molécula.
- TGF- β 1 disminuye el mRNA de SIRT7 en fibroblastos de FPI.
- No existen diferencias en la localización subcelular de SIRT7 entre los cultivos derivados de pacientes con FPI y controles, aunque SIRT7 se localizó preferentemente en núcleo.
- La modificación H3K18ac disminuye en fibroblastos senescentes y después del estímulo de TGF- β 1.

X. LITERATURA CITADA

- [1] T. E. King Jr, A. Pardo, and M. Selman, "Idiopathic pulmonary fibrosis," *Lancet*, vol. 378, no. 9807, pp. 1949–1961, Dec. 2011.
- [2] R. Weiskirchen, S. Weiskirchen, and F. Tacke, "Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications," *Mol. Aspects Med.*, no. June, pp. 0–1, 2018.
- [3] A. Xaubet, M. Molina-Molina, and M. Sánchez, "Enfermedades pulmonares intersticiales difusas," *Arch. Bronconeumol.*, vol. 43, no. Supl 2, pp. 24–30, 2007.
- [4] B. Ley and H. R. Collard, "Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis," *Clin. Epidemiol.*, vol. 5, pp. 483–492, 2013.
- [5] L. Knudsen and T. Geiser, "Pathogenesis and diagnostic work-up of patients with idiopathic pulmonary fibrosis," *memo - Mag. Eur. Med. Oncol.*, vol. 1, no. S3, pp. 7–11, 2008.
- [6] J. O. Barreto-Rodríguez, M. E. Mejía, and I. Buendía-Roldán, "Panorama actual de la fibrosis pulmonar idiopática en México," *Orig. Neumol Cir Torax Neumol Cir Torax*, vol. 74, no. 4, pp. 256–261, 2015.
- [7] C. E. Barkauskas and P. W. Noble, "Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 7. New insights into the cellular mechanisms of pulmonary fibrosis.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 306, no. 11, pp. C987-96, 2014.
- [8] M. Selman *et al.*, "Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: Clinical behavior and gene expression pattern," *PLoS One*, vol. 2, no. 5, 2007.
- [9] A. L. Mora, M. Rojas, A. Pardo, and M. Selman, "Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 16, no. 11, pp. 755–772, 2017.
- [10] I. E. Fernandez and O. Eickelberg, "The Impact of TGF- β on Lung Fibrosis," *Proc. Am. Thorac. Soc.*, vol. 9, no. 3, pp. 111–116, 2012.
- [11] M. Selman, J. King, and A. Pardo, "Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy," *Ann. Intern. Med.*, vol. 134, no. 2, pp. 136–151, 2001.
- [12] C. E. Barkauskas and P. W. Noble, "Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 7. New insights into the cellular mechanisms of pulmonary fibrosis," *AJP Cell Physiol.*, vol. 306, no. 11, pp. C987–C996, 2014.
- [13] C. Vancheri, M. Failla, N. Crimi, and G. Raghu, "Idiopathic pulmonary fibrosis: a disease with similarities and links to cancer biology," *Eur. Respir. J.*, vol. 35, no. 3, pp. 496–504, 2010.
- [14] R. T. Kendall and C. A. Feghali-Bostwick, "Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators," *Front. Pharmacol.*, vol. 5 MAY, no. May, pp. 1–13, 2014.
- [15] M.-L. Bochaton-Piallat, G. Gabbiani, and B. Hinz, "The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions," *F1000Research*, vol. 5, no. 0, p. 752, 2016.
- [16] C. López-Otín, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer, "The hallmarks of aging," *Cell*, vol. 153, no. 6, 2013.
- [17] M. Selman and A. Pardo, "Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis: An integral model," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 189, no. 10, pp. 1161–1172, 2014.
- [18] A. Pardo and M. Selman, "Lung fibroblasts, aging, and idiopathic pulmonary fibrosis," *Ann. Am. Thorac. Soc.*, vol. 13, pp. S417–S421, 2016.
- [19] D. Muñoz-Espín and M. Serrano, "Cellular senescence: From physiology to pathology," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 7, pp. 482–496, 2014.
- [20] E. Gamen, W. Seeger, and S. S. Pullamsetti, "The emerging role of epigenetics in pulmonary hypertension," *Eur. Respir. J.*, vol. 48, no. 3, pp. 903–917, 2016.
- [21] J. Leung, Y. Cho, R. F. Lockey, and N. Kolliputi, "The Role of Aging in Idiopathic Pulmonary Fibrosis," *Lung*, vol. 193, no. 4, pp. 605–610, 2015.

- [22] C. López-Ramírez, L. Suarez Valdivia, and J. Rodríguez Portal, "Causes of Pulmonary Fibrosis in the Elderly," *Med. Sci.*, vol. 6, no. 3, p. 58, 2018.
- [23] E. Seto and M. Yoshida, "Erasers of histone acetylation: The histone deacetylase enzymes," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 6, no. 4, pp. 1–26, 2014.
- [24] H. Tao, K. H. Shi, J. J. Yang, C. Huang, L. P. Liu, and J. Li, "Epigenetic regulation of cardiac fibrosis," *Cell. Signal.*, vol. 25, no. 9, pp. 1932–1938, 2013.
- [25] A. Belmonte Fernández, "Las HDAC en la regulación de la expresión génica y el cáncer," *Fac. Ciencias Experimentales*, vol. 144, no. 5, pp. 16–19, 2011.
- [26] A. J. M. de RUIJTER, A. H. van GENNIP, H. N. CARON, S. KEMP, and A. B. P. van KUILENBURG, "Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family," *Biochem. J.*, vol. 370, no. 3, pp. 737–749, 2003.
- [27] K. Shirakawa, L. Chavez, S. Hakre, V. Calvanese, and E. Verdin, "Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors," *Trends Microbiol.*, vol. 21, no. 6, pp. 277–285, 2013.
- [28] L. Guarente and L. Guarente, "Sirtuins in aging and disease.," *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. 72, pp. 483–8, 2007.
- [29] V. Carafa *et al.*, "Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic," *Clin. Epigenetics*, vol. 8, no. 1, 2016.
- [30] H. Yamamoto, K. Schoonjans, and J. Auwerx, "Sirtuin Functions in Health and Disease," *Mol. Endocrinol.*, vol. 21, no. 8, pp. 1745–1755, 2007.
- [31] U. Mahlknecht and S. Voelter-Mahlknecht, "Fluorescence in situ hybridization and chromosomal organization of the sirtuin 4 gene (Sirt4) in the mouse," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 382, no. 4, pp. 685–690, 2009.
- [32] U. Mahlknecht and S. Voelter-Mahlknecht, "Fluorescence in situ hybridization and chromosomal organization of the human Sirtuin 7 gene," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 382, no. 4, pp. 685–690, 2009.
- [33] S. Kiran, T. Anwar, M. Kiran, and G. Ramakrishna, "Sirtuin 7 in cell proliferation, stress and disease: Rise of the Seventh Sirtuin!," *Cell. Signal.*, vol. 27, no. 3, pp. 673–682, 2015.
- [34] S. Kiran, T. Anwar, M. Kiran, and G. Ramakrishna, "Sirtuin 7 in cell proliferation, stress and disease: Rise of the Seventh Sirtuin!," *Cell. Signal.*, vol. 27, no. 3, pp. 673–682, 2015.
- [35] Y.-C. Tsai, T. M. Greco, and I. M. Cristea, "Sirtuin 7 Plays a Role in Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 13, no. 1, pp. 73–83, 2014.
- [36] B. N. Vazquez *et al.*, "SIRT 7 promotes genome integrity and modulates non-homologous end joining DNA repair," *EMBO J.*, vol. 35, no. 14, pp. 1–16, 2016.
- [37] S. Paredes *et al.*, "The epigenetic regulator SIRT7 guards against mammalian cellular senescence induced by ribosomal DNA instability," *J. Biol. Chem.*, vol. 293, pp. 11242–11250, 2018.
- [38] S. Paredes, L. Villanova, and K. F. Chua, "Molecular pathways: Emerging roles of mammalian Sirtuin SIRT7 in cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 20, no. 7, pp. 1741–1746, 2014.
- [39] S. Malik *et al.*, "SIRT7 inactivation reverses metastatic phenotypes in epithelial and mesenchymal tumors," *Sci. Rep.*, vol. 5, pp. 1–9, 2015.
- [40] O. Vakhrusheva *et al.*, "Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice," *Circ. Res.*, vol. 102, no. 6, pp. 703–710, 2008.
- [41] A. Tzouvelekis and N. Kaminski, "Epigenetics in idiopathic pulmonary fibrosis.," *Biochem. Cell Biol.*, vol. 93, no. 2, pp. 159–70, 2015.
- [42] Z. Zeng *et al.*, "Activation and overexpression of Sirt1 attenuates lung fibrosis via P300," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 486, no. 4, pp. 1021–1026, 2017.
- [43] M. L. Sosulski, R. Gongora, C. Feghali-Bostwick, J. A. Lasky, and C. G. Sanchez, "Sirtuin 3 deregulation promotes pulmonary fibrosis," *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 72, no. 5, pp. 595–602, 2017.

- [44] K. Tian, Z. Liu, J. Wang, S. Xu, T. You, and P. Liu, "Sirtuin-6 inhibits cardiac fibroblasts differentiation into myofibroblasts via inactivation of nuclear factor κ B signaling," *Transl. Res.*, vol. 165, no. 3, pp. 374–386, 2015.
- [45] S. Minagawa *et al.*, "Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF- β -induced senescence of human bronchial epithelial cells," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, pp. 391–401, 2011.
- [46] M. F. Barber *et al.*, "SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation," *Nature*, vol. 487, no. 7405, pp. 114–118, 2012.
- [47] S. Kiran, N. Chatterjee, S. Singh, S. C. Kaul, R. Wadhwa, and G. Ramakrishna, "Intracellular distribution of human SIRT7 and mapping of the nuclear/nucleolar localization signal," *FEBS J.*, vol. 280, no. 14, pp. 3451–3466, 2013.
- [48] E. B. Meltzer *et al.*, "Bayesian probit regression model for the diagnosis of pulmonary fibrosis: Proof-of-principle," *BMC Med. Genomics*, vol. 4, no. 1, p. 70, 2011.
- [49] R. Peng *et al.*, "Bleomycin Induces Molecular Changes Directly Relevant to Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Model for 'Active' Disease," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, 2013.
- [50] M. J. Schafer *et al.*, "Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease," *Nat. Commun.*, vol. 8, 2017.
- [51] D. Alvarez *et al.*, "IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype," *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, p. ajplung.00220.2017, 2017.
- [52] P. Y. Zhang *et al.*, "Dicer interacts with SIRT7 and regulates H3K18 deacetylation in response to DNA damaging agents," *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 8, pp. 3629–3642, 2016.
- [53] M. Selman, I. Buendía-Roldán, and A. Pardo, "Aging and Pulmonary Fibrosis.," *Rev. Investig. Clínica - Clin. Transl. Investig.*, vol. 68, no. 2, pp. 75–83, 2016.
- [54] M. Schuliga *et al.*, "Mitochondrial dysfunction contributes to the senescent phenotype of IPF lung fibroblasts," *J. Cell. Mol. Med.*, no. July, pp. 5847–5861, 2018.
- [55] A. E. Wyman *et al.*, "Sirtuin 7 is decreased in pulmonary fibrosis and regulates the fibrotic phenotype of lung fibroblasts," *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 312, no. 6, pp. L945–L958, 2017.
- [56] A. Saito, M. Horie, P. Micke, and T. Nagase, "The Role of TGF- β Signaling in Lung Cancer Associated with Idiopathic Pulmonary Fibrosis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 11, p. 3611, 2018.
- [57] E. Bargagli *et al.*, "Lung cancer in patients with severe idiopathic pulmonary fibrosis: Critical aspects," *In Vivo (Brooklyn)*, vol. 31, no. 4, pp. 773–777, 2017.
- [58] S. Kiran, V. Oddi, and G. Ramakrishna, "Sirtuin 7 promotes cellular survival following genomic stress by attenuation of DNA damage, SAPK activation and p53 response," *Exp. Cell Res.*, vol. 331, no. 1, pp. 123–141, 2015.
- [59] S. Chen, J. Seiler, M. Santiago-reichert, K. Felbel, I. Grummt, and R. Voit, "Article Repression of RNA Polymerase I upon Stress Is Caused by Inhibition of RNA-Dependent Deacetylation of PAF53 by SIRT7," *Mol. Cell*, vol. 52, no. 3, pp. 303–313, 2013.
- [60] Z. Tong *et al.*, "SIRT7 Is Activated by DNA and Deacetylates Histone H3 in the Chromatin Context," *ACS Chem. Biol.*, vol. 11, no. 3, pp. 742–747, 2016.
- [61] L. Tasselli *et al.*, "SIRT6 deacetylates H3K18ac at pericentric chromatin to prevent mitotic errors and cellular senescence," *Nat. Struct. & Mol. Biol.*, vol. 23, p. 434, Apr. 2016.