



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

TESIS:

“Efecto de la fosfatidiletanolamina sobre la inducción de apoptosis y expresión de la proteína 1 de unión a fosfatidiletanolamina (PEBP1) en fibroblastos de pulmón humano normal *in vitro*”

Presenta:

Beatriz Tlatelpa Romero

DIRECTOR:

D. C. Luis Guillermo Vázquez de Lara Cisneros

CO-DIRECTOR:

Dr. Mario García Carrasco

Julio 2016, Puebla, Pue.



DEDICATORIAS PERSONALES

A Dios por ser el principal pilar de mi vida.

A mí familia por su amor, paciencia, apoyo y ayuda incondicional.

DEDICATORIAS ACADEMICAS

Al Dr. Luis Guillermo Vázquez de Lara por sus sabias enseñanzas.

A la Dra. Criselda Mendoza Milla por sus aportaciones a esta tesis.

Al Dr. Roberto Berra por sus atinados consejos.

A los académicos del posgrado por quienes he llegado a obtener los conocimientos necesarios para mi formación científica.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biología Molecular del INER.

A mis compañeros de posgrado por sus sabios consejos.

A Lorena Padilla Martínez por su paciencia.

A CONACYT por otorgarme la beca No. 612293.

INDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
RESUMEN	5
ANTECEDENTES GENERALES.....	6
SURFACTANTE PULMONAR	6
FOSFATIDILETANOLAMINA.....	8
EL PAPEL DEL SURFACTANTE EN LA FISIOPATOLOGÍA DE ENFERMEDADES PULMONARES.....	8
APOPTOSIS	9
PROTEÍNA 1 DE UNIÓN A FOSFATIDILETANOLAMINA (PEBP1).....	11
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MATERIAL Y MÉTODOS	18
METODOLOGÍA GENERAL (PARA TODOS LOS OBJETIVOS)	18
CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTOS.....	18
PROPAGACIÓN DE CULTIVO CELULARES	19
PREPARACIÓN DE FOSFATIDILETANOLAMINA.....	19
MEDICIÓN DE APOPTOSIS	19
TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-PCR).....	20
METODOLOGÍA PARA CADA OBJETIVO ESPECÍFICO	21
METODOLOGÍA PARA EL OBJETIVO ESPECÍFICO 1	21
METODOLOGÍA PARA EL OBJETIVO ESPECÍFICO 2	22
METODOLOGÍA PARA EL OBJETIVO ESPECÍFICO 3	23
METODOLOGÍA PARA EL OBJETIVO ESPECÍFICO 4	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
INFRAESTRUCTURA FÍSICA Y HUMANA	25
ASPECTOS ÉTICOS.....	25
RESULTADOS	26

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA MEDICIÓN DE APOPTOSIS POR EL KIT APOPERCENTAGE	26
EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PE EXÓGENA CON DISTINTAS CONCENTRACIONES EN FPHN.....	32
ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PEBP1 CON RT-PCR	37
MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PEBP1 CON RT-PCR EN CÉLULAS TRATADAS CON FOSFATIDILETANOLAMINA.....	37
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA.....	46

TABLA DE ABREVIATURAS

μ L	Microlitros
μ M	Micromolar
AP-1	Proteína activadora 1
APAF-1	Factor activador de peptidasa apoptótica 1
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DNAsa	Desoxirribonucleasa
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FPHN	Fibroblastos de pulmón humano normal
FSP1	Proteína específica de fibroblastos 1
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
GRK-2	Receptor acoplado a proteína G cinasa 2
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
hrs	Horas
IKK	Cinasa IκB
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
mM	Mini molar
MEK	Proteína quinasa activada por mitógenos
mg	Miligramos
nm	Nanómetros
NIK	Cinasa que induce NFκB
P4	Pase 4
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PEBP1	Proteína 1 de unión a fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
Pol2A	Pequeña subunidad de polimerasa II
PPS	Proteína fosfatasa
PS	Fosfatidilserina
PSD	fosfatidilserina descarboxilasa
PTP1B	Proteína 1B fosfatasa tirosina
RAF	Fibrosarcoma rápidamente acelerado
RKIP	Proteína inhibitoria de la RAF-kinasa
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	Reacción de cadena de la polimerasa en tiempo real
SFB	Suero fetal bovino
SDR	Síndrome de distres respiratorio
PAP	Proteinosis alveolar pulmonar
SP	Surfactante pulmonar
SP-A	Proteína del surfactante A
SP-B	Proteína del surfactante B
SP-C	Proteína del surfactante C
SP-D	Proteína del surfactante D
TADD	Dominio de muerte asociado a fas

TNF	Factor de necrosis tumoral
TRADD	Dominio de muerte asociado al factor de necrosis tumoral

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición del surfactante pulmonar (SP).....	8
Figura 2. Mecanismos que activan la apoptosis..	11
Figura 3. El modelo de la función de PEBP1.	12
Figura 4. Mecanismo por el cual PEBP1 induce apoptosis	13
Figura 5. Medición de la apoptosis en medio sin SFB.	27
Figura 6. Efecto de la adición de gelatina para la medición de apoptosis.....	28
Figura 7. Efecto del H ₂ O ₂ 10mM durante 15, 30, 60 y 120 minutos en FPHN.	29
Figura 8. Densidad celular en placas de 96 y 48 pozos tratadas con gelatina al 0.2%	30
Figura 9 Medición de la apoptosis en medio sin SFB, estaurosporina y en presencia de agua oxigenada (H ₂ O ₂)	31
Figura 10. Efecto a las 24 hrs de la PE en la inducción de apoptosis en FPHN.....	34
Figura 11. Efecto a las 48 hrs de la PE en la inducción de apoptosis en FPHN.....	35
Figura 12. Efecto de la PE a las 24 y 48 hrs en tres líneas de FPHN	36
Figura 13. Medición de la expresión de PEBP1 en tres experimentos.....	37
Figura 14. Efecto de la PE en la modificación de la expresión de PEBP1 a las 12 hrs	39
Figura 15. Efecto de la PE en la modificación de la expresión de PEBP1 a las 24 hrs	40
Figura 16. Efecto de la PE a las 24 hrs en la modificación de la expresión de PEBP1.	41
Figura 17. Efecto de la PE a 10 µM y 100 µM, en la modificación de la expresión de PEBP1.	41
Figura 18. Mecanismo por el cual estaría actuando la PE al modificar la expresión de PEBP1... ..	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones recomendadas por el fabricante del kit ApoPercentage (Biocolor Assay) ..	26
Tabla 2 Condiciones estandarizadas para la cuantificación de apoptosis en FPHN con el kit ApoPercentage.....	32

RESUMEN

Introducción: En el laboratorio se han hecho estudios *in vitro* e *in vivo* sobre el efecto antifibrosante del surfactante pulmonar y se ha llegado a la conclusión de que la fosfatidiletanolamina (PE) es el principal componente partícipe de este efecto, pero los mecanismos por los cuales actúa la PE son desconocidos. La proteína 1 de unión a fosfatidiletanolamina (PEBP1) activa la vía de señalización Raf/MEK/ERK, la cual modula el factor de transcripción AP-1 de la colágena, así como la inducción de la apoptosis.

Objetivo: Determinar el efecto de la PE en la inducción de apoptosis y la modificación en la expresión de PEBP1 en FPHN *in vitro*.

Métodos: Los cultivos de FPHN fueron crecidos en medio Ham-F12. La apoptosis fue medida con el kit de ApopPercentage con las instrucciones estandarizadas en el laboratorio. La medición de la expresión de PEBP1 se midió con RT-PCR en tiempo real. Los datos fueron analizados con estadística paramétrica, se reportó con media, desviación estándar y para la diferencia entre los grupos se analizó con ANOVA con un nivel de significancia $p < 0.05$.

Resultados: La PE exógena indujo apoptosis con una concentración de 50 μM y 100 μM a las 48 horas La PE aumento la expresión de la PEPB1 con una concentración de 100 μM a las 24 horas

Conclusiones: La PE indujo apoptosis y modifico la expresión de PEBP1 en FPHN.

ANTECEDENTES GENERALES

INTRODUCCIÓN

El surfactante pulmonar es un compuesto formado por proteínas y lípidos, cuya función principal es la de disminuir la tensión superficial, para reducir el trabajo respiratorio y evitar el colapso alveolar; pero también tiene una función importante en la inmunidad natural del pulmón. Recientemente, se han descrito otros efectos, como la de modulador de algunas funciones celulares. En el laboratorio se ha trabajado con el efecto que tiene el surfactante sobre los fibroblastos de pulmón humano normal (FPHN) y se ha demostrado que induce en estas células un fenotipo antifibrosante. Esto es importante, ya que, en algunas enfermedades parenquimatosas del pulmón, como la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la migración de fibroblastos al espacio alveolar es parte de la fisiopatogénea de la enfermedad, por lo que se postula que el surfactante pudiera ser una barrera natural para que esto no suceda. En el laboratorio, se ha avanzado en entender mejor esta propiedad sobre los fibroblastos y actualmente sabemos que el componente que muestra mayor efecto sobre la disminución de la expresión de colágena es la fosfatidiletanolamina (PE), pero el mecanismo de acción no se ha descrito y tampoco se ha estudiado el efecto de este fosfolípido sobre la apoptosis. Existe una proteína que se encuentra en la membrana celular, denominada PEBP1 (proteína 1 de unión a la fosfatidiletanolamina); es una proteína implicada en la apoptosis y además inhibe la transcripción mediada por AP-1, que es un factor de transcripción que actúa sobre el promotor de la $\alpha 2$ colágena I. No se ha descrito a la PE como modulador de la expresión de PEBP1, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto que tiene la PE sobre la expresión de PEBP1 y la inducción de apoptosis en FPHN.

SURFACTANTE PULMONAR

El SP es un complejo lipoprotéico secretado por los neumocitos tipo II compuesto por 90% de lípidos y 10% de proteínas. El SP tiene la función de reducir la tensión superficial en la interface aire-agua dentro del alveolo, optimizando el mecanismo de la respiración, evita el colapso alveolar especialmente al final de la espiración y además de impedir el crecimiento de fibroblastos dentro del alveolo (Zuo, 2008).

El SP tiene proteínas específicas y esenciales para la actividad del surfactante en el interior del alveolo; constituyen alrededor del 10%. Tres de las cuatro proteínas del SP están presentes en la hipofase alveolar SP-A, SP-B y SP-C, pero no SP-D (Salgado, 2014). La SP-A es la proteína más abundante del SP, tiene función inmunológica, interactúa con los lípidos del SP y participa en el reciclaje de los cuerpos lamelares, una vez que estos han sido depositados en la interface acuosa del alveolo (Calkovska, 2012). Esta proteína no es esencial para la respiración; sin embargo promueve el aumento de la adsorción de las vesículas de fosfolípidos (Wright, 2005). Las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C son esenciales para la actividad biofísica del SP (Parra y Perez-Gil, 2015). La proteína SP-B es esencial para la formación de cuerpos lamelares, su deficiencia es incompatible con la vida (Goss y cols., 2013) La deficiencia de SP-C permite la supervivencia, sin embargo se requiere para evitar el desarrollo de patologías pulmonares crónicas. La SP-A y la SP-D participan en el mecanismo de defensa inmune (Salgado, 2014). Los lípidos del SP constituyen un 90% del total de su composición; el más abundante es la fosfatidilcolina (PC), un lípido zwitteriónico que se encuentra a una concentración del 60-70%; también tiene fosfolípidos aniónicos como el fosfatidilglicerol (PG) y el fosfatidilinositol (PI) de un 8-15%, una importante fracción está compuesta de lípidos neutros como el colesterol en un 8-10% (Zuo y cols., 2008). La fosfatidiletanolamina (PE), otro fosfolípido zwitteriónico se encuentra en un 3% y el resto de los fosfolípidos constituyen un 4% (Lopez-Rodriguez, 2014) (figura 1).

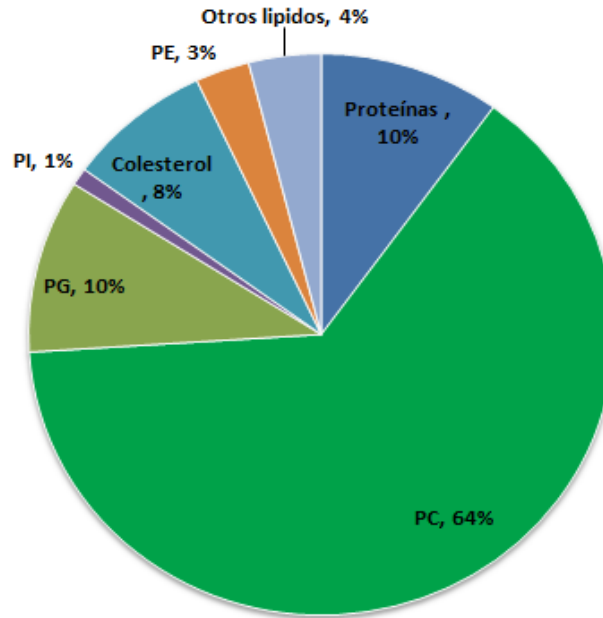


Figura 1. Composición del surfactante pulmonar (SP). El SP contiene 10 % de proteínas y 90 % de lípidos: fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidiletanolamina (PE).

FOSFATIDILETANOLAMINA

La PE es componente de la membrana plasmática y del SP (Raja, 2011). Experimentos *in vitro* han demostrado que la PE puede formar curvaturas en la membrana. Los lípidos que pueden formar tales estructuras aumentan la actividad de las proteínas que se encuentran en la superficie de la membrana mitocondrial (Tuck, 2011; Vance y Tasseva, 2013). Otra de las propiedades de la PE es que puede interactuar con proteínas del SP tales como SP-B y SP-C, facilitando la adsorción de SP en una interface aire-agua dentro del alveolo (Chavarha y cols., 2010). En una célula viable la PE se encuentra en mayor concentración en el interior de la cara citosólica de la membrana (Cheng y cols., 2012). En la activación de los mecanismos de apoptosis PE y PS, son translocadas por flipasas a la superficie de la membrana plasmática, constituyendo un marcador para activar vías de muerte celular (Vance, 2008).

EL PAPEL DEL SURFACTANTE EN LA FISIOPATOLOGÍA DE ENFERMEDADES PULMONARES.

Se ha descrito que cambios en la composición y en las propiedades biofísicas del SP se asocian con una diversidad de enfermedades pulmonares (Ariki y cols., 2012).

Alteraciones en la disminución de la síntesis de SP conduce a padecimientos como síndrome de distrés respiratorio (SDR) en niños y en adultos, esta enfermedad incrementa el trabajo respiratorio, disminuye el intercambio de gases, reduce la distensibilidad pulmonar, genera hipoxia y está asociada a otras complicaciones (Calkovska y cols., 2012). La proteinosis alveolar pulmonar (PAP) se caracteriza por la acumulación de proteínas de SP en el alveolo obstruyendo el intercambio gaseoso (Akella y Deshpande, 2013). En la fibrosis quística y en las neumonías los niveles de SP están disminuidos, en especial la porción de las proteínas SP-A y SP-D que son parte del sistema inmune (Wright, 2005). En enfermedades parenquimatosas difusas pulmonares la deficiencia del SP conduce a procesos inflamatorios y anormalidades metabólicas. Este grupo de enfermedades engloba a la sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad y la FPI. En la FPI el contenido lipídico total del SP esta disminuido (Akella y Deshpande, 2013).

En pacientes con reciente diagnóstico de FPI se identifican niveles aumentados de SP-A (Phelps y cols., 2004; Pechkovsky y cols., 2012). La FPI es una enfermedad que se caracteriza por un aumento de colágena madura debido al crecimiento de fibroblastos y miofibroblastos dentro del lumen alveolar, provocando obstrucción del intercambio de CO₂ y O₂, esta enfermedad es progresiva y mortal (Selman y cols., 2009).

APOPTOSIS

La apoptosis es uno de los mecanismos por los cuales ocurre la muerte celular (Galluzzi y cols., 2012). Este mecanismo está caracterizado por el cambio morfológico distintivo en el citoplasma del núcleo, la fragmentación de la cromatina y del ADN en los sitios internucleosomales. De este modo la muerte celular sirve como un balance de la mitosis y regulación del tamaño de los tejidos, para evitar procesos patológicos como el crecimiento de tumores cancerígenos (Yao y Szabadkai, 2012).

La apoptosis es el mecanismo responsable de la eliminación fisiológica de las células. Se lleva a cabo por dos vías: la extrínseca se activa cuando el factor de necrosis tumoral (TNF) se une a su receptor (TNFR1), el receptor activado se une a las proteínas adaptadoras citoplásmicas TRADD y FADD y a la procaspasa 8, la unión de estas proteínas forman un dominio de muerte; la otra vía es la intrínseca, en la que la

procaspasa 8 y FADD interactúan para formar dominios efectores de muerte, las dos moléculas de procaspasa generan una molécula activa de caspasa 8 que divide a las caspasas en dirección 3´(ejecutora) que da la sentencia de muerte y la vía intrínseca que es activada por las proteínas proapoptóticas como Bax que se insertan en la membrana mitocondrial externa. La inserción de proteínas en la membrana conduce la liberación de citocromo C que forma un complejo con Apaf-1 y la procaspasa 9. Las moléculas de caspasa 9 dividen y activan a las caspasas ejecutoras para la apoptosis. (figura 2) (Green y Llambi, 2015).

En algunos tumores, el nivel de expresión de PEBP1, una proteincinasa ligada a la superficie y al interior de la membrana se ha descrito como un determinante apoptótico, en el que su sobreexpresión sensibiliza a las células a activar mecanismos de apoptosis (Al-Mulla y cols., 2013).

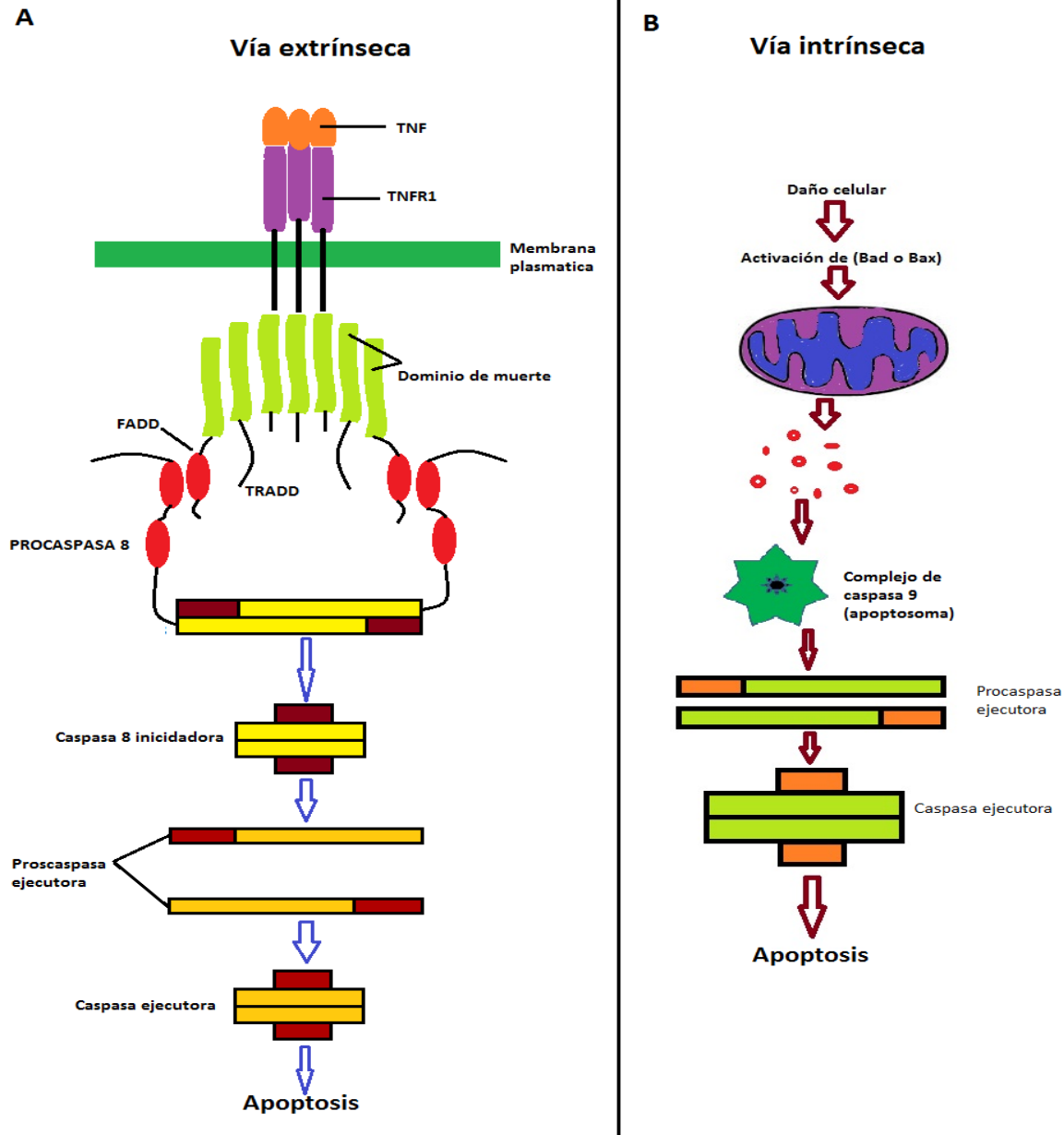


Figura 2. Mecanismos que activan la apoptosis. A) La vía del receptor de muerte (extrínseca) en la que se involucra un receptor ligando de superficie celular. B) La vía mitocondrial (intrínseca).

PROTEÍNA 1 DE UNIÓN A FOSFATIDILETANOLAMINA (PEBP1)

La PEBP1 es una cinasa que pertenece a la familia de las proteínas asociadas a PE. Tiene una masa molecular de 187 aminoácidos con un peso aproximado de 21 a 23 kDa (Keller y cols., 2004). Presenta dos características notables: tiene un bolsillo de unión a ligando y una estructura globular compacta que le proporciona una superficie amplia para interactuar con otras proteínas (Shemon y cols., 2010; Granovsky y Rosner,

2008). La estructura tridimensional de la PEBP1 revela que tiene sitios de unión para acetato, fosfato y PE. Estos sitios se encuentran en la región N-terminal libre de la proteína para permitir que otras moléculas se unan mientras que la región C-terminal está anclada a la membrana, ambos extremos permiten la flexibilidad de la PEBP1 (Vallee y cols., 1999)

La proteína PEBP1 es el único inhibidor fisiológico de las vías de señalización de Raf/MEK/ERK, de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y la cascada de señalización de NFκB. Estas vías de señalización tienen influencia en los siguientes procesos celulares: apoptosis, proliferación celular, ciclo celular, estabilidad genómica y resistencia a drogas (Al-Mulla y cols., 2013). Para inhibir la vía Raf/MEK/ERK la PEBP1 se une ya sea a Raf-1 o MEK, que contienen un sitio de unión que se superponen parcialmente, inhibiendo la fosforilación de la región N de Raf-1 para después disociar a MEK (figura 3) (Granovsky y Rosner, 2008; Hao y cols., 2012; Park y cols., 2006; Rath y cols., 2008).

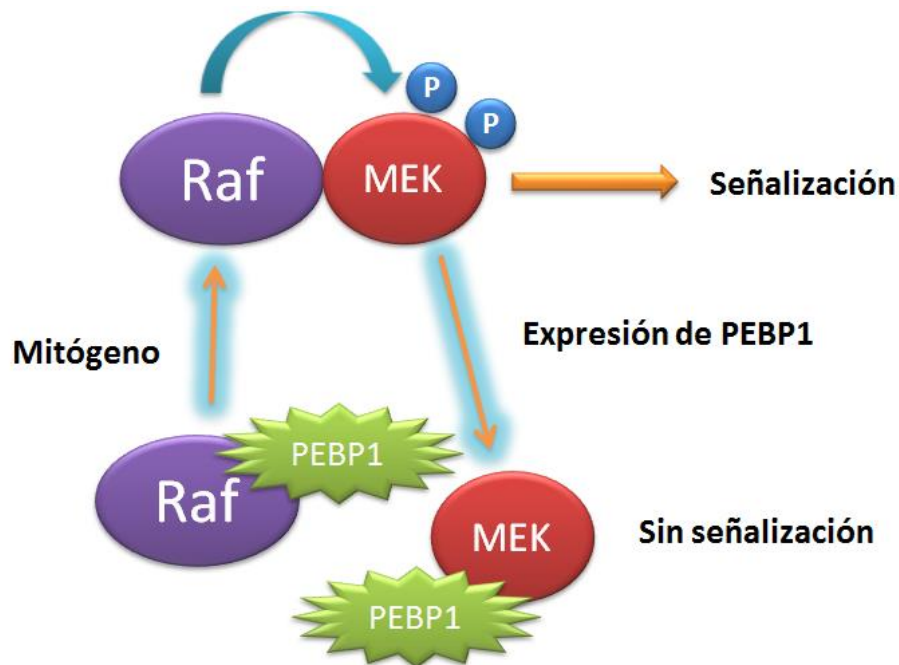


Figura 3. El modelo de la función de PEBP1. La activación de MEK por Raf requiere de la interacción física entre Raf y MEK para que se lleve a cabo su señalización. La unión de PEBP1 a Raf o MEK disociados interrumpe su fosforilación interrumpiendo su señalización. La unión de PEBP1 a Raf funciona como un regulador negativo mitogénico.

La PEBP1 tiene un sitio de unión de bolsillo con regiones conservadas de aminoácidos; este sitio contribuye a la unión con la proteína Raf-1 por fosforilación (Zhao y cols., 2011). Además, la PEBP1 está implicada en el control de los receptores acoplados a proteína GPCR y su cascada de señalización, uno de estos receptores es el receptor acoplado a proteína G cinasa 2 (GRK-2) (Lorenz y cols., 2003). Para que PEBP1 inhiba a los receptores GRK-2 es imprescindible su fosforilación. La PEBP1 inhibe la señalización de NF- κ B por la inhibición de las cinasas TAK1, NIK y IKK. De esta manera se produce la inhibición de genes anti-apoptóticos para inducir apoptosis por quimioterapia (Al-Mulla y cols., 2013). El rol de PEBP1 en la prevención de anomalías cromosómicas podría contribuir a su función como supresor de metástasis por medio de la inducción de apoptosis.(Granovsky y Rosner, 2008). El aumento en la expresión de PEBP1 inhibe la señalización de NF- κ B al inhibir las cinasas TAK1, NIK e IKK, esta inhibición resulta en la inhibición corriente abajo de productos génicos antiapoptóticos, lo que favorecería un aumento en la apoptosis (figura 4) (Yeung y cols., 2000). Esta proteína tiene múltiples funciones y eso dependerá de su fosforilación y la vía de señalización en la que se involucre (Escara-Wilke y cols., 2012; Keller y cols., 2004; Tavel y cols., 2012; Wang y cols., 2013; Yousuf y cols., 2014; Zhang y cols., 2012; Zhu y cols., 2013)

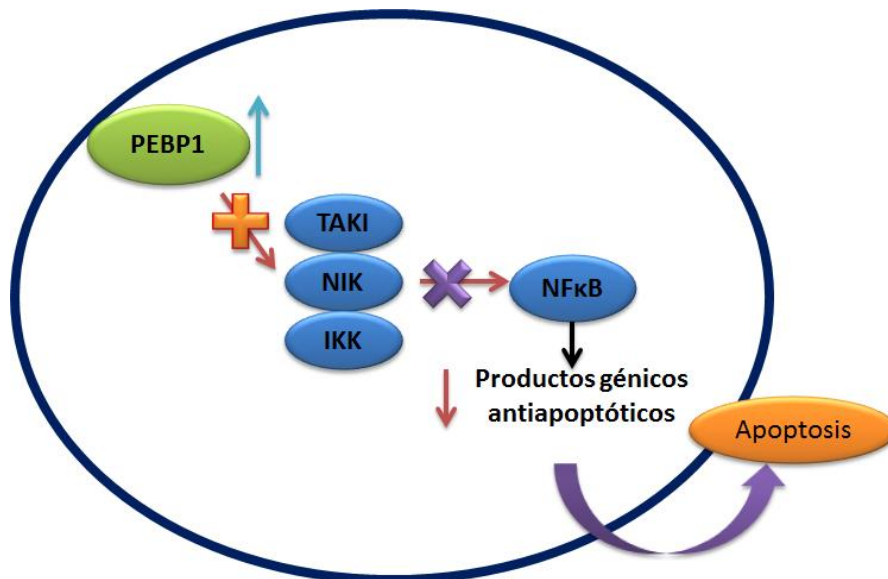


Figura 4. Mecanismo por el cual PEBP1 induce apoptosis por medio de la inhibición de la señalización de NF κ B y de las cinasas TAK1, NIK e IKK, lo que produce la disminución de los productos génicos antiapoptóticos.

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

El SP es un compuesto de proteínas y lípidos, donde el balance entre este tipo de moléculas determinará su adecuada función; en algunas patologías como la FPI, la proteína SP-A se encuentra aumentada y la concentración de lípidos disminuida (Akella y Deshpande, 2013; Phelps y cols., 2004)

En un estudio previo se probó el efecto del SP y la SP-A en fibroblastos de FPHN. En este estudio se observó que el SP aumentó la colágenasa-1 y disminuyó la colágena I. Los resultados demostraron que el SP mezclado con SP-A no disminuyó la concentración de colágena. La conclusión de este estudio sugirió que al no ser las proteínas que inducen la colágenasa-1 y la disminución de colágena I, podrían ser algún otro de los componentes del SP como los lípidos, los que estarían induciendo este efecto (Vazquez de Lara L. y cols., 2000).

Por otro lado, se ha estudiado el efecto de los fosfolípidos del surfactante para determinar si alguno de ellos podría estar induciendo la modificación de la expresión de colágena en cultivos de FPHN. Estos fosfolípidos fueron el dipalmitoilfosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidiletanolamina (PE). La PC y el PG no tuvieron efecto en la expresión de colágena mientras que la PE si lo presentó. La conclusión de este trabajo muestra que PE disminuyo significativamente la expresión de colágena, induce una señal de calcio intracelular asociada con apoptosis y que esta actúa de manera dosis dependiente (Romero Lopez, 2010).

En un modelo *in vivo* de fibrosis pulmonar se probó el efecto del SP enriquecido con PE y PE sola. Al modelo *in vivo* se le indujo lesiones pulmonares con un agente pro-fibrosante llamado bleomicina. Se observó que SP enriquecido con PE y PE sola disminuyó la concentración de colágena y el análisis histopatológico corroboró este efecto en las lesiones pulmonares causadas por bleomicina (Tlatelpa Romero, 2013).

Algunos estudios han probado el efecto de PE exógena en distintos tipos de células principalmente de cáncer que no siguen un ciclo celular normal y que además son resistentes a la apoptosis. La translocación de PE al exterior de la membrana es un marcador de apoptosis. Partiendo de esta premisa algunos estudios han probado la PE exógena para inducir apoptosis por la vía extrínseca (Phoenix y cols., 2015).

En células de hepatoma HepG2 se probó el efecto de PE en la apoptosis y se indagó en la posible vía de señalización. La PE inhibió el crecimiento de las células HepG2 de manera dosis dependiente; sin embargo no afectó el ciclo celular pero si indujo apoptosis. La expresión de Bcl-2 anti-apoptótica disminuyó, aumentó los niveles de Bax y la expresión de la Caspasa-3 pro-apoptótica (Yao y cols., 2009).

En células hepáticas de cáncer SMMC-7721 se probó el efecto de PE y su mecanismo de señalización para inducir apoptosis. Se observó que PE inhibe la proliferación, detiene el ciclo celular en las fases G0/G1 e induce apoptosis en dosis y tiempo dependiente. Además, se observó que aumento la expresión de Bax una proteína proapoptótica y una disminución de Bcl-2 antiapoptótica. Todos estos eventos fueron acompañados por un incremento en la expresión de caspasa-3 a medida que aumentaban la concentración y el tiempo de exposición con PE. Al mismo tiempo disminuyó la fosforilación de ERK y aumento la de Stat1/2. Por lo que se sugiere que PE induce apoptosis y que esta mediada por vías de señalización importantes (Xue y cols., 2014).

En células malignas de mesotelioma (NCI-H28) se indagó en el efecto antitumoral de PE y vías de señalización asociadas. La PE aumentó la actividad de proteína fosfatasa- 2A (PP2A) y proteína fosfatasa tirosina (PTP1B) asociadas con la supresión de las vías MEK y ERK1/2. La PE reduce la viabilidad de estas células en tiempo y dosis dependiente. Los resultados muestran que PE indujo apoptosis y que el aumento en la actividad de PP2A y PTP1B podría contribuir en este efecto (Kaku y cols., 2014).

El efecto de PE en células de cáncer sugiere que esto es de manera dosis dependiente y que existen vías de señalización involucradas que activan este mecanismo de apoptosis. La PE está asociada a PEBP1 que también está implicada en procesos de apoptosis, ciclo celular, crecimiento y diferenciación celular (Al-Mulla y cols., 2013).

La PEBP1 es una proteína inhibitoria de la Raf-1 cinasas porque interfiere con la activación de la vía de señalización Raf/MEK/ERK. La sobreexpresión de PEBP1 suprime la vía de señalización de MEK y ERK, como consecuencia interfiere con Raf-1 que induce la transformación y transcripción del promotor AP-1. El factor de transcripción

AP-1 es activado por la señalización de Raf-1. El promotor AP-1 regula la expresión de colágena en fibroblastos de pulmón humano (Hu y cols., 2014).

En enfermedades como la FPI el crecimiento de fibroblastos genera matriz extracelular rica en colágena. La PE podría inducir apoptosis al modificar la expresión de PEBP1 que inhibe la señalización de Raf/MEK/ERK y del promotor AP-1 de la colágena en FPHN, pero esto aún no se ha demostrado.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El SP es un compuesto complejo de lípidos y proteínas, su alteración proteica se relaciona con procesos patológicos, como es el caso de las enfermedades fibrosantes del pulmón, que se caracterizan por excesiva deposición de matriz intercelular producida por el crecimiento de fibroblastos y miofibroblastos. En base a estudios previos se ha determinado que el principal componente antifibrótico del SP es la PE ya que disminuye la expresión de colágena presente en FPHN.

En estudios *in vitro* se ha probado el efecto de la PE exógena, siendo está capaz de inducir apoptosis por la vía extrínseca en células que no pueden activar este mecanismo por sí mismas. Una de las proteínas que podría estar implicada en este proceso es la PEBP1 ya que su expresión sensibiliza a las células de cáncer a activar mecanismos de apoptosis, además inhibe las tres vías más importantes del homeostasis celular la Raf/MEK/ERK, la vía Raf inhibe el promotor AP-1 de la colágena. Con lo anterior, planteamos la pregunta de investigación:

¿La PE exógena induce apoptosis y modifica la expresión de PEBP1 en FPHN *in vitro*?

JUSTIFICACIÓN

Existen procesos patológicos en los que el aumento del crecimiento de fibroblastos y miofibroblastos dentro del alveolo induce la producción de colágena, reduciendo la funcionalidad alveolar ocasionando graves problemas para realizar el intercambio de aire y CO₂. Tal es el caso de las enfermedades fibrosantes del pulmón. El hecho de que el surfactante induce un fenotipo antifibrosante, nos hace pensar que pudiera tener un efecto terapéutico en este tipo de enfermedades. Ya se ha observado en experimentos *in vitro* la disminución de la colágena y en modelos *in vivo* de fibrosis pulmonar, que al administrar surfactante enriquecido con PE y PE sola, se atenúan las lesiones provocadas por un agente fibrosante en un modelo *in vivo* de fibrosis pulmonar. Sin embargo, es importante ahondar en el mecanismo de acción, para entender mejor este efecto con la finalidad de desarrollar una terapia farmacológica que se enfoquen en atenuar o disminuir las patologías fibrosantes del pulmón.

HIPÓTESIS

La fosfatidiletanolamina induce apoptosis y modifica la expresión de la proteína 1 de unión a fosfatidiletanolamina en fibroblastos de pulmón humano normal.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la PE en la inducción de apoptosis y la modificación en la expresión de PEBP1 en FPHN

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo específico 1. Estandarizar la técnica para la medición de apoptosis con el kit ApoPercentage

Objetivo específico 2. Evaluar la apoptosis inducida por distintas concentraciones de PE exógena en FPHN.

Objetivo específico 3. Estandarizar la técnica de medición de la expresión de PEBP1 con RT-PCR

Objetivo específico 4. Evaluar la modificación de la expresión de PEBP1 por distintas concentraciones de PE exógena en FPHN.

MATERIAL Y MÉTODOS

METODOLOGÍA GENERAL (PARA TODOS LOS OBJETIVOS)

CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTOS

Se utilizaron fibroblastos de pulmón humano normal (FPHN) del laboratorio de medicina experimental. Los FPHN fueron obtenidos de donantes de órganos con diagnóstico de muerte cerebral que no mostraban alguna patología, las líneas celulares utilizadas fueron consideradas normales al estudiar la historia clínica de los pacientes y confirmado por el estudio histopatológico. Esta línea de investigación ya se encuentra registrada en el comité de ética de la facultad de medicina. Se cuenta con el consentimiento informado de los familiares de los pacientes, para cada una de las líneas de FPHN que se utilizaron para este proyecto.

PROPAGACIÓN DE CULTIVO CELULARES

El crecimiento celular de las línea fue exponencial, ya que por cada caja en confluencia se obtuvo dos cajas T-25 y así sucesivamente. Los experimentos con las células se realizaron a partir de pase 4 (P4) porque se ha visto que más del 95% de las células en este pase son fibroblastos. Para corroborar que la población de células con las que se trabajó son fibroblastos, rutinariamente se envió una muestra de la línea celular al Instituto nacional de enfermedades respiratorias (INER), donde se midió la expresión de colágena y de la proteína FSP1 (proteína específica de fibroblastos 1) (Zhang y cols., 2013).

PREPARACIÓN DE FOSFATIDILETANOLAMINA

Se utilizó PE (Sigma Aldrich, No.Catalogo P7693-100 mg) almacenada a -20°C. Se disolvieron 100 mg de PE con 5 mL de cloroformo. Se hicieron alícuotas de 1 mL, que se almacenaron a -70°C, a una concentración de 20 mg/mL. Antes de sonicar se tomó la cantidad necesaria para el experimento. La PE e colocó en un tubo falcón de 50 mL y se evaporo el cloroformo en un ambiente de nitrógeno suavemente para evitar que se pegue en las paredes del tubo. Después se agregó medio Ham-F12 sin SFB con 10% de Albumina humana (Sigma Aldrich, No.Cat.:A1887-1G). Se esterilizó la punta del sonicador para evitar contaminación de la PE. La sonicación de PE se realizó a una amplitud ultrasónica del 75% por 3 minutos con pulsos de 30 segundos.

MEDICIÓN DE APOPTOSIS

Los experimentos de apoptosis se realizaron con el kit ApoPercentage (Biocolor Assay No. Cat. A1000). El kit utilizado se basa en la tinción de células apoptóticas con un colorante que se une a la PS cuando esta se encuentra en la superficie de la membrana. Los FPHN se sembraron en placas de cultivo celular de 48 y 24 pozos con una concentración de 5×10^3 y 25×10^3 células en 200 y 500 μ L de medio de cultivo con SFB al 10% respectivamente, se incubaron a 37°C con 2% de CO₂ durante 24 horas Se prepararon por triplicado las condiciones experimentales por 24 y 48 horas Para realizar la medición de apoptosis se prepararon los controles y condiciones de PE. Se prepararon

los agentes de ensayo apoptóticos y los controles internos del experimento. Se preparó medio de cultivo con SFB al 10% (500 μ L/pozo) y medio con SFB con colorante al 5% (500 μ L/pozo). Después de 24 horas de haber sembrado las células se cambió el medio por la condición de medio con SFB (500 μ L/pozo) durante 24 horas. Para la medición de apoptosis se retiró el medio de medio con SFB y se colocó el reactivo medio con colorante (500 μ L/pozo) por 30 minutos y se incubó a 37°C con 2% de CO₂. El medio con colorante se retiró con una micropipeta. Se lavaron las células dos veces con 500-200 μ L de PBS 1x cuidadosamente para no remover las células. Posteriormente se añadió 50 μ L de tripsina EDTA (Sigma No. T3924-500 ML) durante 10 minutos a 37°C con 2% de CO₂, y se golpeó la placa suavemente a los 5 y 10 minutos. Después se añadió 200 μ L de agente liberador a cada pozo y se agitó a placa durante 10 minutos. Se transfirió 250 μ L de cada pozo a una placa de ELISA de 96 pozos y se leyó la absorbancia a 550 nm en un multilector de placas (Molecular Devices, FilterMax, Multi-Mode-Microplate).

TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-PCR)

Se realizó la extracción del material genético con solubilidad diferencial, utilizando la preparación comercial de TRIzol (Ambion by Life technologies No. Cat. 15596-026, 100 mL), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se retiró el medio en el que se encontraban los pozos de cultivo y se homogenizó inmediatamente los cultivos con el reactivo 1mL TRIzol, se incubaron durante 5 min para permitir la disociación de los complejos nucleoproteicos. Después se transfirió a tubos eppendorff de 1.5 mL libres de RNAsas. Se añadió cloroformo 500 μ L por cada mL de TRIzol y se agitó vigorosamente por 15 segundos en un vortex. Se incubó por 3 minutos en hielo. Se centrifugó a 12,000 g por 15 minutos a 4°C. Se colocó la fase acuosa de la muestra en tubos de 1.5 mL y se agregó 0.5 mL de isopropanol al 100% y se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante de los tubos para dejar solo el pellet y se agregó etanol al 75%. Las muestras se agitaron en un vortex y se volvieron a centrifugar a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Se decantaron las muestras y secaron a temperatura ambiente y se le agregó 10 μ L de agua inyectable. La cantidad de RNAm se midió en un espectrofotómetro (NanoDrop 1000, ThermoScientific). Las muestras fueron almacenadas a -70°C.

Para la medición de la expresión genética se realizó con un microgramo de RNAm con una unidad de DNAsa durante 15 min a temperatura ambiente, se agregó 1 µl de EDTA 25 mM y se incubó a 65°C para inactivar la DNAsa. El cDNA se sintetizó por medio de transcriptasa reversa el kit Advantage RT-PCR (Clontech, Palo Alto CA).

Una vez sintetizado el cDNA, se procedió a realizar PCR en tiempo real. La reacción de amplificación se llevó a cabo utilizando sondas. Se preparó una solución por muestra de Master Mix 5 µl, la sonda específica de la PEBP1 20x (Thermo Fisher Scientific No. Cat. Hs01110783_g1) 0.5 µl y H₂O libre de RNAsas 2.5 µl y 2 µl de la muestra. Se utilizó como gen constitutivo de referencia Pol2A. Se corrieron las muestras por triplicado, para el gen PEBP1 y para el gen constitutivo de referencia Pol2A. Las muestras fueron procesadas y amplificadas en una placa de 360 pozos, utilizando un termociclador (Life Technologies QuantStudio Flex 7).

METODOLOGÍA PARA CADA OBJETIVO ESPECÍFICO

METODOLOGÍA PARA EL OBJETIVO ESPECÍFICO 1

Objetivo específico 1: Estandarización de la técnica para la medición de apoptosis con el kit ApoPercentage

Fundamento lógico: La apoptosis es un proceso crucial para la homeostasis celular de cualquier individuo cuando esta se ve alterada el ciclo natural es afectado. En este trabajo se intenta estandarizar la técnica para cuantificar la apoptosis ya que no se tienen definidas las condiciones para efectuar la medición.

Metodología: Para la estandarización se probaron distintas concentraciones de densidad celular que fueron de 5×10^4 - 25×10^3 células en 500-200 µL en placas de 24- 48 pozos e incubadas a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Previo se trató la placa con gelatina al 0.2 % por dos horas en incubación. Después de 24 horas se procedió a poner por triplicado las siguientes condiciones A: condición (Medio sin SFB). Las condiciones se mantuvieron 24 y/o 48 horas Para la medición de la apoptosis se prepararon diluciones de las condiciones y se reemplazaron las condiciones A por B: Condición 1 (Medio con SFB sin colorante, condición 2 (Medio con SFB mas colorante) y condición 3 (Medio con SFB+ H₂O₂ 10 mM + colorante). Las condiciones B se colocaron por 30 min.

Después se removieron y se realizaron dos lavados con PBS 1x. Se agregó 50 μ L de tripsina con y sin rojo fenol en cada pozo por 10 minutos a 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂. Se dieron golpes suaves a la placa a los 5 y 10 minutos para desprender las células. Posteriormente se agregó 200 μ L de agente liberador a cada pozo y se colocó sobre una placa de agitación por 10 minutos. Se transfirió 250 μ L a una placa de ELISA de 96 pozos y se leyó la absorbancia a 550 nm, usando un lector de placas (Molecular Devices, FilterMax, Multi-Mode Microplate). Se eliminan las burbujas para no interferir con la medición.

METODOLOGÍA PARA EL OBJETIVO ESPECÍFICO 2

Objetivo específico 2: Estandarización la técnica de medición de la expresión de PEBP1 con RT-PCR.

Fundamento lógico: La PEBP1 es una proteína que se expresa en la superficie y en el interior de la membrana plasmática, esta proteína está implicada en la apoptosis, hasta este momento no se ha encontrado información de experimentos que hallan medido la expresión de esta proteína en FPHN, por eso nos vemos en la tarea en realizar la estandarización de la técnica.

Metodología: FPHN en P4 sembradas en placas de 6 pozos se les midió la expresión genética de PEBP1. Las condiciones experimentales fueron: condición 1 (Control medio sin SFB), condición 2 (PE 30 μ M), condición 3 (PE 50 μ M) y condición 4 (PE 100 μ M). Se agregaron 0.2 mL de cloroformo por cada 1mL de TRIzol a cada pozo por 5 minutos y se colocó en tubo eppendorff de 1.5 mL. Se incubó por 3 minutos en hielo. Se centrifugo a 12,000 g por 15 minutos a 4°C. Se colocó la fase acuosa de las muestra en tubos de 1.5 mL y se agregó 0.5 mL de isopropanol por cada mL de TRIzol al 100% y se centrifugo a 12,000 g por 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante de los tubos para dejar sólo el botón y se agregó 1 mL de etanol al 75% por cada mL de TRIzol. Las muestras se agitaron en un vórtex y se centrifugaron a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Se decantaron las muestras y secaron a temperatura ambiente y se le agregó 10 μ L de agua inyectable. La cantidad de RNAm se midió en un espectrofotómetro (NanoDrop 1000, ThermoScientific). Las muestras fueron almacenadas a -70°C. La

técnica se estandarizó hasta que se tuvo la cantidad necesaria de RNAm de 300-600 ng/ μ L de muestra.

METODOLOGÍA PARA EL OBJETIVO ESPECÍFICO 3

Objetivo específico 3: Medir apoptosis con el kit ApoPercentage en células tratadas con distintas concentraciones de PE

Fundamento lógico: En estudios in vitro se ha demostrado el efecto apoptótico de la PE en células cancerígenas o células en metástasis, sin embargo en éste estudio se pretende demostrar que PE induce apoptosis en fibroblastos de pulmón humano. La apoptosis se midió por técnica colorimétrica.

Metodología: Se utilizaron FPHN en Pase-4, se sembraron 25×10^3 células en 500 μ L por pozo en placas de 48 pozos e incubadas a 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂. Previo se trató la placa con gelatina al 0.2 % por dos horas en incubación. Después de 24 horas se procedió a poner por triplicado las siguientes condiciones A: condición 1 (Medio sin SFB), condición 2 (PE 30 μ M), condición 2 (PE 50 μ M), condición 4(PE μ M). Las condiciones se mantuvieron 24 y/o 48 horas Para la medición de la apoptosis se prepararon diluciones de las condiciones y se remplazaron las condiciones A por B: Condición 1 (Medio con SFB sin colorante), condición 2 (Medio con SFB mas colorante), condición 3 (Medio con SFB y H₂O₂+ 5% de colorante, condición 4 (Medio con SFB + PE 30 μ M+ 5% de colorante), condición 5 (Medio con SFB + PE 50 μ M+ 5% de colorante), condición 6 (Medio con SFB + PE 100 μ M+ 5% de colorante). Las condiciones B se colocaron por 30 min. Después se removieron y se realizaron dos lavados con PBS 1x. Se agregó 50 μ L de tripsina en cada pozo por 10 minutos a 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂. Se dieron golpes suaves a la placa a los 5 y 10 minutos para desprender las células. Posteriormente se agregó 200 μ L de Agente liberador a cada pozo y se colocó sobre una placa de agitación por 10 minutos. Se transfirió 250 μ L a una placa de ELISA de 96 pozos y se leyó la absorbancia a 550 nm, usando un lector de placas (Molecular Devices, FilterMax, Multi-Mode Microplate). Se eliminaron las burbujas para no interferir con la medición.

METODOLOGÍA PARA EL OBJETIVO ESPECÍFICO 4

Objetivo específico 4: Medir la expresión de PEBP1 con RT-PCR en células tratadas con PE.

Fundamento lógico: La PEBP1 es el único inhibidor de la vía Raf/MER/ERK, esta vía ésta relacionada con promotor AP-1 de la colágena. No se sabe si la PE modifica la expresión de PEBP1 en FPHN.

Metodología: FPHN en P4 sembrados en placas de 12 pozos se les midió la expresión genética de PEBP1, estas se expusieron en medio sin SFB y H₂O₂ 10 mM. Las condiciones experimentales de este experimento: condición 1 (Control medio sin SFB), condición 2 (PE 30 µM), condición 3 (PE 50 µM) y condición 4 (PE 100 µM). Se agregó 0.1 mL de cloroformo a cada pozo por 5 minutos y se colocó en tubo eppendorff de 1.5 mL. Se incubó por 3 minutos en hielo. Se centrifugó a 12,000 g por 15 minutos a 4°C. Se colocó la fase acuosa de las muestra en tubos de 1.5 mL y se agregaron 0.25 mL de isopropanol al 100%, se centrifugaron a 12,000 x g por 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante de los tubos para dejar solo el botón y se agregaron 0.5 mL de etanol al 75%. Las muestras se agitaron en un vórtex y se centrifugaron a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Se decantaron las muestras y secaron a temperatura ambiente y se le agregaron 10 µL de agua inyectable. La cantidad de RNAm se midió en un espectrofotómetro (NanoDrop 1000, ThermoScientific). Las muestras fueron almacenadas a -70°C.

Para la medición de la expresión genética se realizó con un microgramo de RNAm con una unidad de DNAsa durante 15 min a temperatura ambiente, se agregó 1 µl de EDTA 25 mM y se incubo a 65°C para inactivar la DNAsa. El cDNA se sintetizó por medio de transcriptasa reversa el kit Advantage RT-PCR (Clontech, Palo Alto CA).

Una vez sintetizado el cDNA, se procedió a realizar PCR en tiempo real. La reacción de amplificación se llevó a cabo utilizando sondas. Se preparó una solución de cada muestra de Master Mix 5 µl, la sonda específica de la PEBP1 20x (Thermo Fisher Scientific No. Cat. Hs01110783_g1) 0.5 µl y H₂O libre de RNAsas 2.5 µl y 2 µl de la muestra. Se utilizó como gen constitutivo de referencia Pol2A. Se corrieron las muestras por triplicado para el gen PEBP1 y para el gen constitutivo de referencia Pol2A. Las

muestras fueron procesadas y amplificadas en una placa de 360 pozos, utilizando un termociclador (Life Technologies QuantStudio Flex 7).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cuantitativas se presentan con medias y desviaciones estándar de cada grupo experimental y de los grupos control. El análisis se realizó en el software SPSS versión 23. Se realizó ANOVA para comparar la diferencia entre varios grupos, después se hizo una prueba de post hoc de Dunnett para múltiples comparaciones. Se consideró significativa una $p < 0.05$.

INFRAESTRUCTURA FÍSICA Y HUMANA

Los experimentos se realizaron en laboratorio de Medicina Experimental de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y en el laboratorio de Biología Molecular del INER. Los recursos otorgados fueron provenientes de la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado; de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado; y de los Recursos del Laboratorio de Medicina experimental de la BUAP.

ASPECTOS ÉTICOS

Los lineamientos éticos establecidos por los principios básicos de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, informe de Belmont, Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud y el Reglamento para la investigación en seres humanos capítulo VI de la investigación en órganos, tejidos y sus derivados, productos y cadáveres de seres humanos artículo 59 y 60 así como lo establecido en el título décimo cuarto de la ley y su reglamento en materia de control sanitario de la disposición de órganos, tejido y cadáveres de seres humanos. También el lineamiento de la Ley Estatal de Salud del estado de Puebla, publicada en la Sección Segunda del Periódico Oficial del Estado de Puebla, se seguirán los lineamientos de los artículos 85 al 89 y el título sexto en lo referente al control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres de seres humanos en su Capítulo I siguiéndose los postulados de los artículos 90 y 91, el capítulo II de órganos y tejidos en sus artículos 101, 103, 106 y 110. Este estudio es de ciencia básica de carácter biomédico en el que no se tiene contacto con el donante, las líneas celulares que se utilizaron en este estudio son donadas a la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

RESULTADOS

Para determinar el efecto de la PE en FPHN en la inducción de apoptosis y la modificación de la expresión de PEBP1 se implementó la estandarización de las técnicas de medición para ajustar las condiciones al modelo *in vitro*. Posteriormente con las condiciones estandarizadas se procedió a medir el efecto de la PE en FPHN.

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA MEDICIÓN DE APOPTOSIS POR EL KIT APOPERCENTAGE

La estandarización de la técnica consistió en determinar las condiciones adecuadas para realizar la medición de la apoptosis con el Kit ApoPercentage en las líneas celulares que se emplearon para este trabajo. Se probaron las siguientes condiciones: área de crecimiento del cultivo, densidad celular, preparación de controles, tiempo de incubación con el colorante al 5%, lavados, desprendimiento de las células, liberación del colorante y lectura. Las condiciones recomendadas por el fabricante se muestran en la (tabla 3).

Tabla 1. Condiciones recomendadas por el fabricante del kit ApoPercentage (Biocolor Assay)

Condiciones	Recomendación del Kit
Área de crecimiento y densidad celular	Densidad celular de 5×10^4 células en 500 μ L de medio con SFB e incubadas a 37°C con una atmosfera de 5% CO ₂ hasta una confluencia temprana, relativo a 24 horas.
Preparación de controles	Placas de 24 pozos tratada con gelatina 0.2 % durante 1-3 horas Se considera los controles: Negativos con medio sin SFB sin colorante por 24 horas Positivo: H ₂ O ₂ 10 mM, 1-3 horas antes del experimento. Volumen de la condición con colorante 500 μ L al 5%.
Tiempo de incubación con el colorante al 5%	1-2 horas.
Lavados	1000 μ L PBS 1x dos veces cuidadosamente
Desprendimiento de las células	Tripsina-EDTA 1x con rojo fenol, 50 μ L por 10 minutos, golpear suavemente a los 5 y 10 minutos
Liberación del colorante	Agregar 200 μ L de agente liberador y colocar en una placa de agitación durante 10 minutos
Lectura	Transferir 250 μ L de las muestras a una placa de ELISA de 96 pozos y medir la absorbancia a 550 nm evitando las burbujas ya que intervienen en la lectura.

Se realizaron pruebas de estandarización de controles por triplicado, con una densidad celular inicial para la estandarización de 5×10^3 células en 100 μL de medio Ham F-12 sin SFB en placas de 96 pozos. Se probó como control negativo medio Ham F-12 sin SFB y control positivo H_2O_2 10 mM por 120 minutos. Con las condiciones antes mencionadas se obtuvo en promedio, una absorbancia a 550 nm del medio sin SFB fue de 0.122 ± 0.038 y de H_2O_2 10 mM de 0.0813 ± 0.033 , con una $p=0.234$ (figura 5). Al observar en el microscopio los pozos, se notó un desprendimiento celular importante en los pozos tratados con H_2O_2 10 mM, por lo que se concluyó que la disminución en la absorbancia era debida a la pérdida de células durante los lavados. Este resultado nos hizo ver que las condiciones sugeridas por el fabricante no son las adecuadas para el tipo de células que estamos empleando.

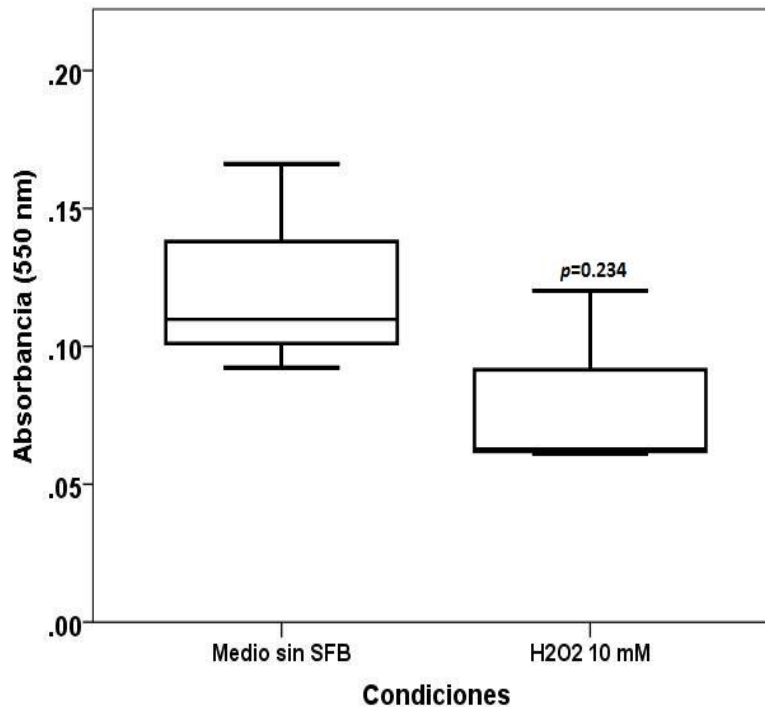


Figura 5. Medición de la apoptosis en medio sin SFB y en presencia de agua oxigenada (H_2O_2). Se sembraron las células en placas de 96 pozos y se incubaron por 24 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO_2 , 120 minutos antes de la medición, se agregó H_2O_2 10 mM. Las cajas representan los datos de 3 mediciones. Se realizó T Student considerando una significancia de $p < 0.05$, el resultado no fue significativo.

Debido a la pérdida de células adherentes en la prueba anterior se realizaron experimentos de adhesión celular. Se procedió a tratar la placa de 96 pozos con gelatina al 0.2% por 1 horas y se incubó a una temperatura de 37°C , con una atmósfera al 5% de

CO₂, después de este procedimiento se retiró la gelatina sobrante, esto se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La absorbancia media en la condición de medio sin SFB sin gelatina fue de 0.139 ± 0.071 . En la condición de H₂O₂ 10 mM sin gelatina la absorbancia media fue de 0.09 ± 0.026 . La condición de medio sin SFB con gelatina obtuvo una absorbancia media de 0.130 ± 0.03 . La condición de H₂O₂ 10 mM con gelatina obtuvo una media de 0.134 ± 0.026 . Se realizó la comparación entre la condición de medio sin SFB con y sin gelatina, y se obtuvo una $p=0.766$ no significativa (figura 6A). La comparación entre la condición H₂O₂ 10 mM con y sin gelatina, dio como resultado una $p=0.025$ significativa (figura 6B).

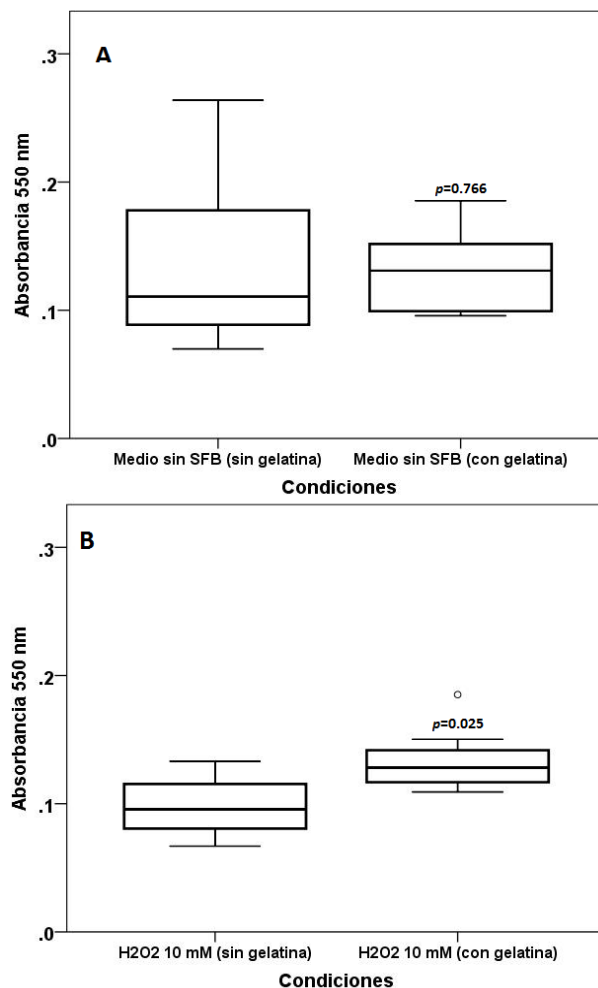


Figura 6. Efecto de la adición de gelatina para la medición de apoptosis. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos tratadas con gelatina y sin gelatina 0.2%, con medio sin SFB y H₂O₂ 10 mM. Los experimentos se realizaron por triplicado en una línea de FPHN. A) Medio sin SFB. B) H₂O₂ 10 mM. Se realizó T Student considerando una $p<0.05$.

Los resultados obtenidos en el segundo experimento fueron significativos entre tratar la placa con y sin gelatina para la condición de H_2O_2 10 mM, lo que interpretamos como que mejoró la adhesión celular, pero la técnica no fue capaz de detectar la apoptosis inducida por agua oxigenada. Por ello, el siguiente experimento fue probar diferentes tiempos de exposición con H_2O_2 10 mM. Se realizaron pruebas con las condiciones: medio sin SFB y H_2O_2 10 mM durante un tiempo de 15, 30, 60 y 120 minutos. Las pruebas se realizaron en una placa de 96 pozos tratada con gelatina al 0.2% para evitar el desprendimiento celular. La absorbancia media de la condición de medio sin SFB fue de 0.08 ± 0.033 . La condición H_2O_2 10 mM por 15 minutos obtuvo una absorbancia media de 0.087 ± 0.014 , con una $p=0.999$ no significativa. La condición H_2O_2 10 mM por 30 minutos obtuvo absorbancia media de 0.122 ± 0.038 , con una $p=0.567$ no significativa. La condición H_2O_2 10 mM por 60 minutos obtuvo una mediana de 0.107 ± 0.05 , con una $p=0.849$ no significativa. La condición H_2O_2 10 mM por 120 minutos se obtuvo una absorbancia media de 0.116 ± 0.047 , con una $p=0.686$ no significativa. Las comparaciones se realizaron con respecto al medio sin SFB que es la condición control (figura 7).

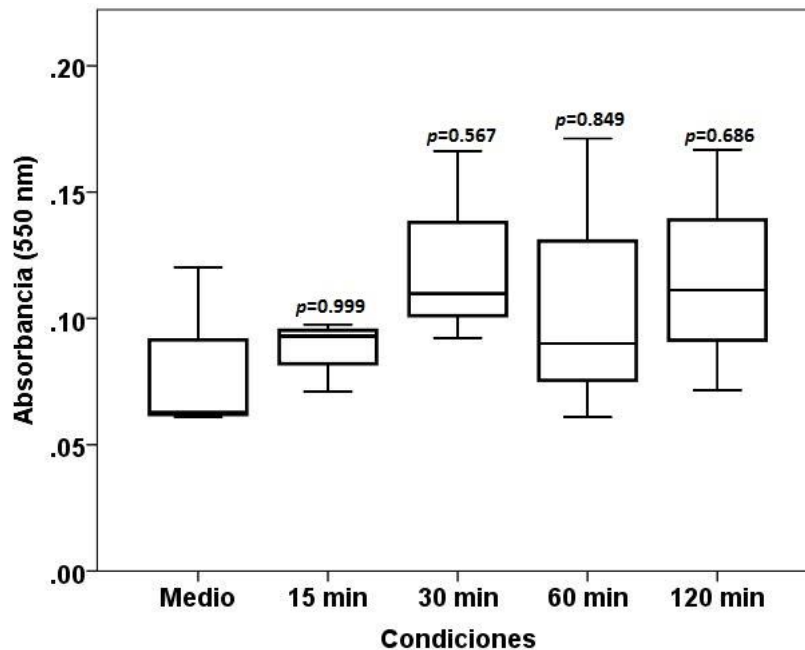


Figura 7. Efecto del H_2O_2 10mM durante 15, 30, 60 y 120 minutos en FPHN. Los experimentos se realizaron por triplicado. Las cajas representan la distribución de los datos. Se realizó ANOVA considerando una $p<0.05$ comparado con la condición de medio.

Se realizaron experimentos con medio sin SFB y en placas tratadas con gelatina al 0.2% de 96 y 48 pozos. La densidad celular requerida en la placa de 96 pozos fue de 5×10^3 por pozo, la absorbancia media de la condición de medio sin SFB fue de 0.032 ± 0.005 . La condición de H_2O_2 10 mM obtuvo una media de 0.069 ± 0.027 . En este experimento se obtuvo una $p=0.085$. La densidad celular de la placa de 48 pozos fue de 25×10^3 células, la condición de medio sin SFB obtuvo una media 0.413 ± 0.033 . La condición de H_2O_2 obtuvo una absorbancia media de 0.458 ± 0.027 , se obtuvo una $p=0.144$ no significativo (figura 8).

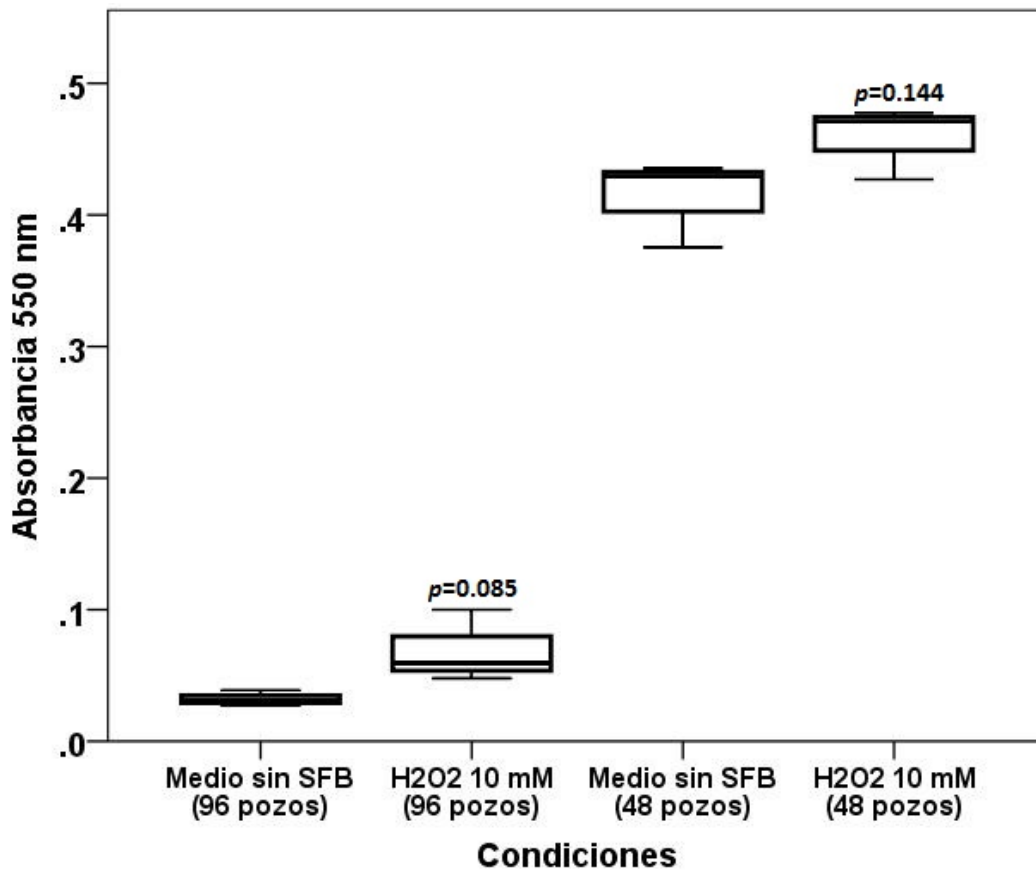


Figura 8. Densidad celular en placas de 96 y 48 pozos tratadas con gelatina al 0.2% con las siguientes condiciones: medio sin SFB y H_2O_2 . Las gráficas representan la distribución de los datos obtenidos de los experimentos por triplicados. Se realizó T Student considerando una $p < 0.05$ significativa.

Con los resultados obtenidos del experimento se observó un aumento de la absorbancia, sin embargo se decidió realizar otro experimento en el que se utilizó estaurosporina, utilizado en citometría de flujo como control estándar de apoptosis,

además el experimento se realizó con seis repeticiones y se contaron las células con mayor precisión, empleando una cámara de Neubauer. En la condición de medio sin SFB se obtuvo una absorbancia media de 0.271 ± 0.0179 . En presencia de estaurosporina la absorbancia media fue de 0.401 ± 0.14 con una $p=0.056$ no significativa. En la condición H_2O_2 10 mM la absorbancia media fue de 0.487 ± 0.07 , con una $p= 0.002$ con respecto al control. Con este experimento se concluyó que la H_2O_2 10 mM es el mejor agente para emplearlo como control positivo (figura 9).

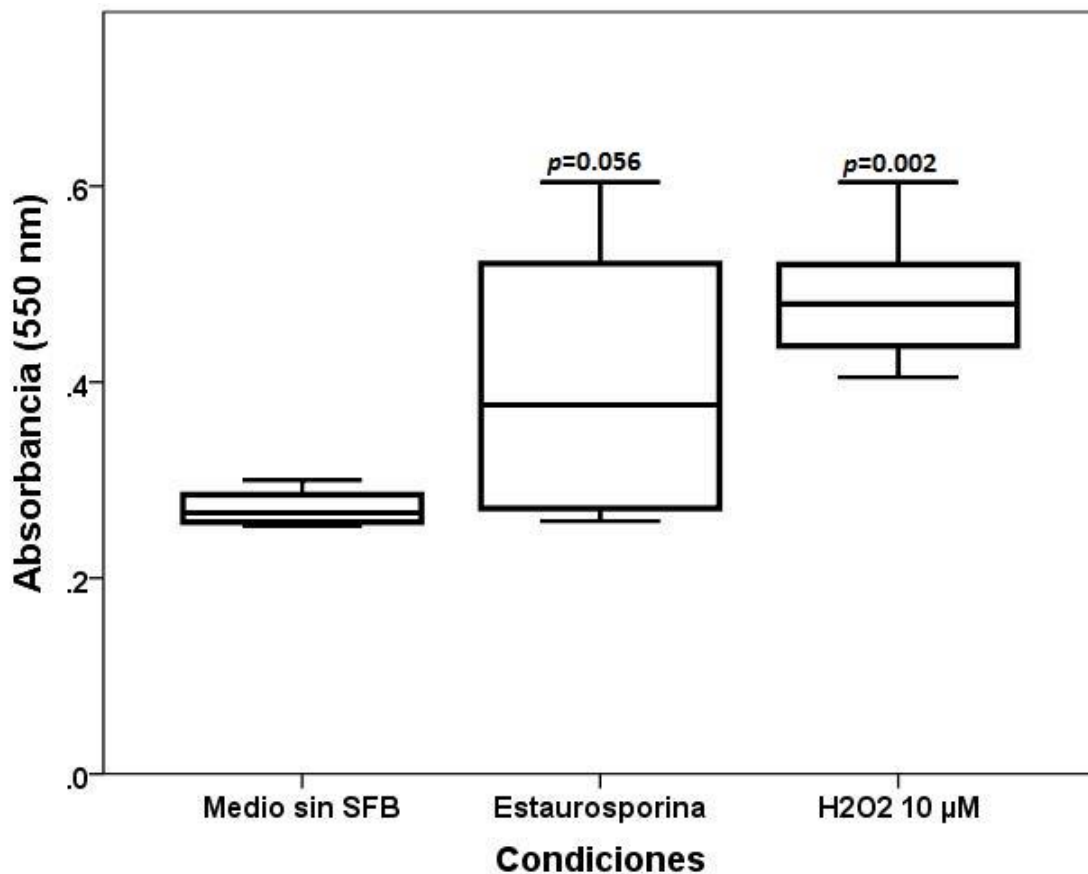


Figura 9 Medición de la apoptosis en medio sin SFB, estaurosporina y en presencia de agua oxigenada (H_2O_2). Se sembraron las células en placas de 48 pozos y se incubaron por 24 horas a $37^\circ C$ en una atmósfera de 5% de CO_2 , 30 minutos antes de la medición, se agregó staurosporina y H_2O_2 10 mM. El H_2O_2 obtuvo una diferencia significativa con respecto al medio sin SFB con una $p<0.002$. Las cajas representan los datos de 6 mediciones. Se realizó ANOVA con una significancia de $p<0.05$ y una prueba pos hoc de Dunnet.

Con los resultados anteriores, consideramos que tenemos las condiciones adecuadas para la medición de apoptosis con la técnica de ApoPercentage (tabla 4).

Tabla 2 Condiciones estandarizadas para la cuantificación de apoptosis en FPHN con el kit ApoPercentage

Condiciones	Procedimiento estandarizado
Área de crecimiento y densidad celular	Placas de 48 pozos tratada con gelatina 0.2 % durante 1 horas Densidad celular de 25×10^3 células en 500 μ L de medio con SFB incubadas a 37° C con una atmosfera de 5% CO ₂ hasta una confluencia temprana alcanzada a las 24 horas
Preparación de controles	Controles negativos: con medio sin SFB, sin y con colorante al 5% por 24 horas Positivos: H ₂ O ₂ 10 mM, 30 min antes del experimento. Volumen del colorante: 250 μ L al 5%.
Tiempo de incubación con el colorante al 5%	30 min.
Lavados	300 μ L PBS 1x dos veces cuidadosamente
Desprendimiento de las células	Tripsina 50 μ L por 10 minutos, golpear suavemente a los 5 y 10 minutos
Liberación del colorante	Agregar 100 μ L de agente liberador y colocar en una placa de agitación durante 10 minutos
Lectura	Transferir 150 μ L de las muestras a una placa de ELISA DE 96 pozos y medir la absorbancia a 550 nm evitando las burbujas porque intervienen en la lectura.

EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PE EXÓGENA CON DISTINTAS CONCENTRACIONES EN FPHN

Para determinar el efecto de la PE en la apoptosis se utilizó el Kit ApoPercentage de acuerdo a las condiciones estandarizadas para el modelo *in vitro* de FPHN, a una absorbancia de 550 nm. Se probó PE a 30 μ M, 50 μ M y 100 μ M, por 24 y 48 horas Los experimentos se realizaron por triplicado en tres líneas celulares diferentes: FN-4-12, FN-2-13 y NOVA.

Con la línea FN-4-12 La condición control obtuvo una media de 0.259 ± 0.002 . La PE 30 μ M obtuvo una absorbancia media de 0.259 ± 0.005 , con una $p=0.991$. La PE 50 μ M obtuvo una absorbancia media de 0.274 ± 0.02 , con una $p=0.841$. La PE 100 μ M obtuvo una absorbancia media de 0.302 ± 0.487 , con una $p=0.203$ (figura 10A). En la línea FN-2-3, en la condición control obtuvo un media de 0.252 ± 0.008 . La PE 30 μ M obtuvo una absorbancia media de 0.263 ± 0.013 , con una $p=0.813$. La PE 50 μ M obtuvo una absorbancia media de 0.263 ± 0.029 , con una $p=0.017$ significativa (figura 10B). La

línea NOVA en la condición control la absorbancia media fue de 0.253 ± 0.012 . La PE 30 μM obtuvo una absorbancia media de 0.290, con una $p=0.011$ significativa. La PE 50 μM obtuvo una absorbancia media de 0.307 ± 0.016 , con una $p=0.001$ significativa. La PE100 μM obtuvo una absorbancia media de 0.235 ± 0.008 , con una $p=0.233$ (figura 10C).

El efecto de la PE a 30 μM , 50 μM y 100 μM por 48 horas en la línea FN-4-12, FN-2-13 y NOVA. En la condición control se obtuvo una absorbancia media de 0.254 ± 0.013 . La PE 30 μM obtuvo una absorbancia media de 0.261 ± 0.010 , con una $p=0.626$. La PE 50 μM obtuvo una absorbancia media de 0.280 ± 0.006 , con una $p=0.021$ significativa. La PE 100 μM obtuvo una absorbancia media de 0.319 ± 0.001 , con una $p=0.00006$ significativa (figura 11A). En la línea FN-2-13 en la condición control la absorbancia media fue de $0.263 \pm .007$. La PE 30 μM la absorbancia media fue de 0.275 ± 0.004 , con una $p=0.693$. La PE 50 μM obtuvo una absorbancia media de 0.276 ± 0.013 , con una $p=0.610$. La PE 100 μM obtuvo un media de 0.346 ± 0.026 , con una $p=0.00004$ significativa (figura 11B). En la línea NOVA, en la condición control la absorbancia media fue de 0.241 ± 0.002 . La PE 30 μM la absorbancia media fue de 0.292 ± 0.007 , con una $p=0.002$ significativo. La PE 50 μM obtuvo un media de 0.281 ± 0.001 , con una $p= 0.007$ significativa. La PE 100 μM obtuvo una media de 0.297 ± 0.02 , con una $p=0.001$ significativa (figura 11C).

El conjunto de experimentos por triplicado en las tres líneas celulares a las 24 horas en la condición control obtuvo una absorbancia media de 0.254 ± 0.008 . La PE 30 μM obtuvo una media de 0.270 ± 0.016 , con una $p=0.417$. La PE 50 μM obtuvo una media de 0.281 ± 0.028 , con una $p=0.116$. La PE 100 μM obtuvo un media de 0.282 ± 0.043 , con una $p= 0.109$ (figura 12A). El conjunto de experimentos por triplicado en las tres líneas celulares a las 48 horas con la condición control la absorbancia media fue de 0.253 ± 0.012 . La PE 30 μM con una media de 0.276 ± 0.014 , con una $p=0.081$. La PE 50 μM con una media de 0.281 ± 0.028 , con una $p=0.025$ significativa. La PE 100 μM con una media de 0.320 ± 0.027 , con una $p=0.000001$ significativa (figura 12B).

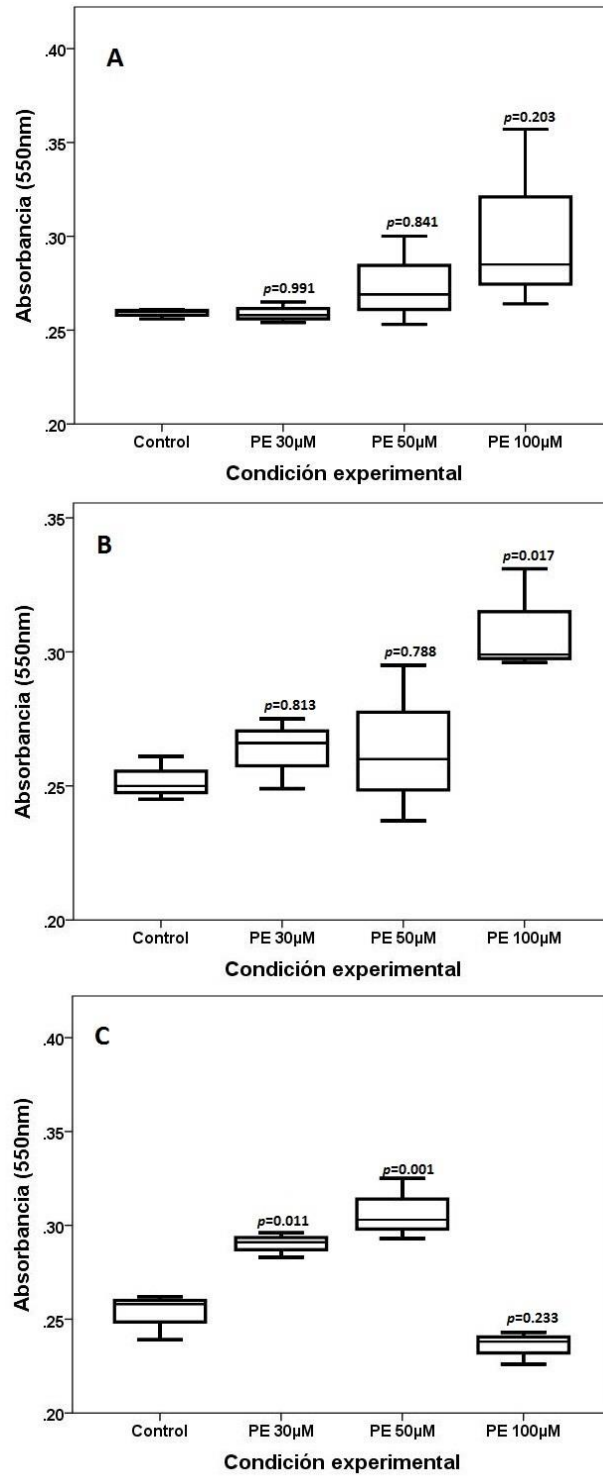


Figura 10. Efecto a las 24 horas de la PE en la inducción de apoptosis en FPHN. La PE a 30 μM, 50 μM y 100 μM, en tres líneas celulares, experimentos realizados por triplicado. A) Línea FN-4-12. B) Línea FN-2-13. C) Línea NOVA. Se realizó ANOVA considerando una $p < 0.05$ y una prueba post hoc de Dunnet.

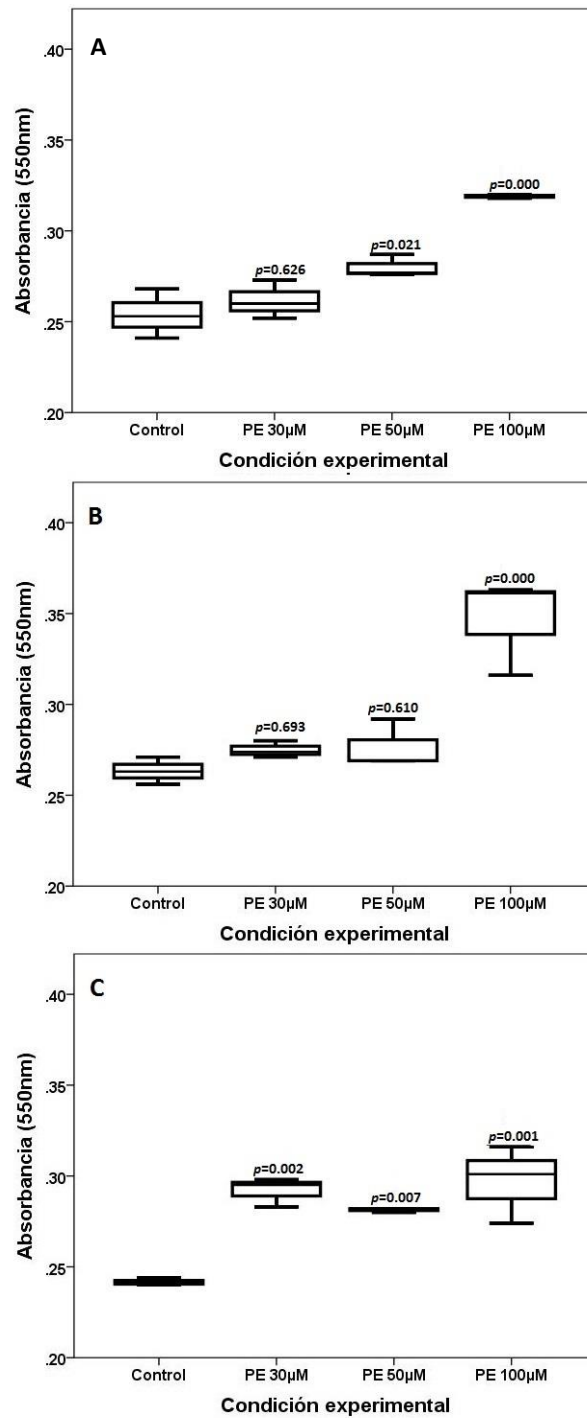


Figura 11. Efecto a las 48 horas de la PE en la inducción de apoptosis en FPHN. La PE a 30 µm, 50µm y 100 µm, en tres líneas celulares, experimentos realizados por triplicado. A) Línea FN-4-12. B) Línea FN-2-13. C) Línea NOVA. Se realizó ANOVA considerando una $p < 0.05$ y una prueba post hoc de Dunnet.

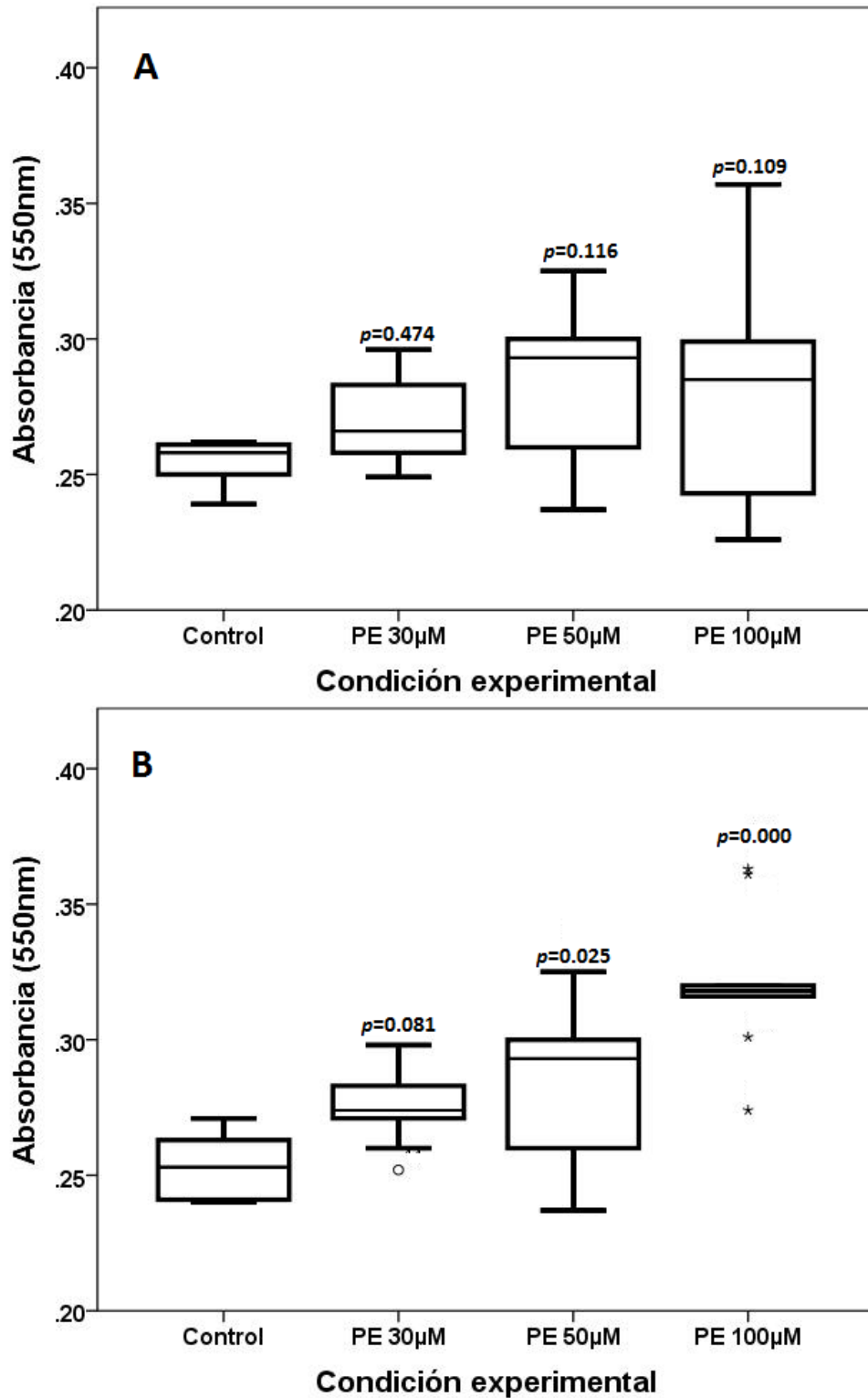


Figura 12. Efecto de la PE a las 24 y 48 horas en tres líneas de FPHN. Se probaron las concentraciones de PE 30 µM, 50 µM y 100 µM por 24 y 48 horas A) Efecto de la PE a las 24 horas B) Efecto de la PE a las 48 horas Se realizó ANOVA considerando una $p < 0$ y una prueba post hoc de Dunnet.

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PEBP1 CON RT-PCR

Se realizaron tres experimentos con cuatro replicas para estandarización la medición de la estandarización de PEBP1. La condición basal estándar fue probada con medio sin SFB. El primer experimento obtuvo una media de número de copias de 1.13 ± 0.11 . El segundo experimento obtuvo una media de número de copias de 1.27 ± 0.04 , $p=0.230$. El tercer experimento obtuvo una media de número de copias de 1.20 ± 0.08 , $p=0.741$ (figura 13). Se encontró una constancia entre las mediciones de la expresión de PEBP1 sin diferencias significativas entre los experimentos.

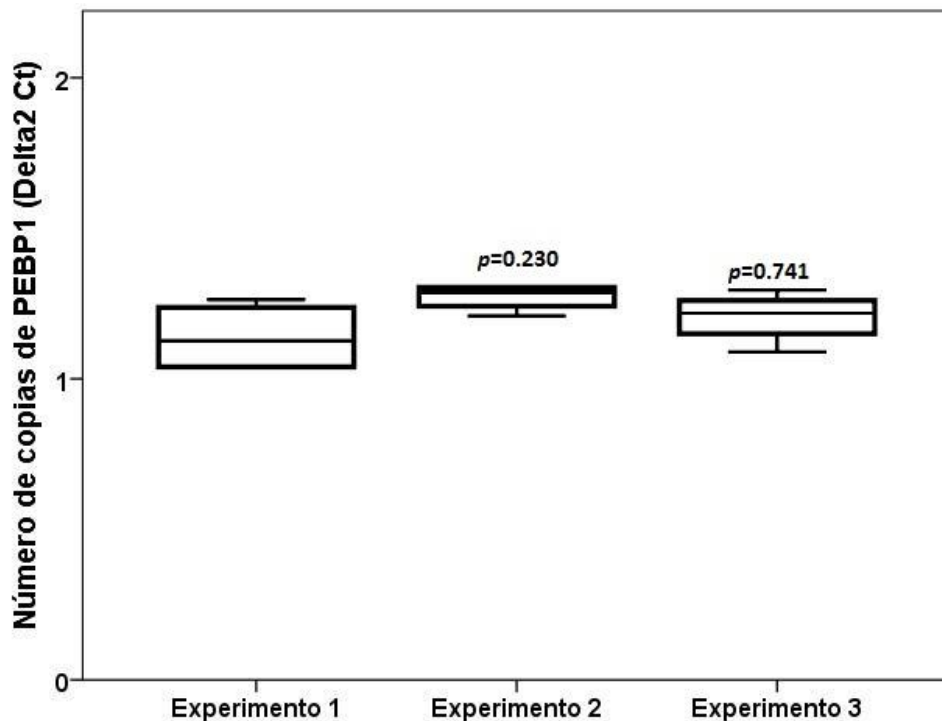


Figura 13. Medición de la expresión de PEBP1 en tres experimentos, las cajas representan cuatro repeticiones. Se realizó ANOVA considerando una $p < 0.05$ comparado con el control basal el experimento 1.

MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PEBP1 CON RT-PCR EN CÉLULAS TRATADAS CON FOSFATIDILETANOLAMINA

Para determinar la expresión de la proteína PEBP1 se midió con RT-PCR. Se midió el efecto de PE $10 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$, a las 12 y 24 horas, en tres líneas de FPHN: FN-4-12, FN-2-13 y NOVA. El efecto a las 12 horas en la línea FN-4-12 en la condición

medio sin SFB la media del número de copias fue de 1.26 ± 0.22 . La PE 10 μM obtuvo una media de número de copias 1.84 ± 0.35 , con una $p=0.196$. La PE 100 μM obtuvo una media de número de copias de 1.80 ± 0.69 , con una $p=0.231$ (figura 14A). En la línea FN-2-13 en la condición control la media de número de copias fue de 1.69 ± 0.57 . La PE 10 μM obtuvo una media de número de copias de 1.68 ± 0.35 , con una $p=0.994$. La PE 100 μM obtuvo una media de número de copias de 1.89 ± 0.59 , con una $p=0.807$ (figura 14B).

El efecto a las 24 horas en la línea FN-4-12 en la condición control la media de número de copias fue de 1.13 ± 0.11 . La PE 10 μM obtuvo una media de número de copias de 1.16 ± 0.22 , con una $p= 0.99$. La PE 100 μM obtuvo una media de número de copias de 2.34 ± 1.36 , con una $p=0.10$ (figura 15A). En la línea FN-2-13 en la condición de medio sin SFB la media de número de copias fue de 1.47 ± 0.26 . La PE 10 μM obtuvo una media de número de copias de 1.88 ± 0.43 , con una $p= 0.60$. La PE 100 μM obtuvo una media de número de copias de 2.02 ± 1.04 , con una $p=0.43$ (figura 15B). Debido a que no se encontró diferencias significativas se rediseño el experimento. Se probó únicamente la condición de medio sin SFB y PE 100 μM por 24 h. En la línea NOVA la condición de medio sin SFB obtuvo una media de número de copias de 2.31 ± 0.83 . La PE 100 μM obtuvo una media de número de copias de 4.07 ± 1.84 , con una $p=0.04$ (figura 16)

El conjunto de los experimentos realizados a las 12 horas en la condición de medio sin SFB la media de número de copias fue de 1.47 ± 0.46 . La PE 10 μM obtuvo una media de número de copias de 1.76 ± 0.33 , con una $p=0.39$. La PE 100 μM obtuvo una media de número de copias de 1.85 ± 0.59 , con una $p=0.23$ (figura 17A). El conjunto de los experimentos realizados a las 24 h. En la condición de medio sin SFB la media del número de copias fue de 1.84 ± 0.80 . La PE 10 μM obtuvo una media de número de copias de 1.52 ± 0.49 , con una $p=0.79$. La PE 100 μM obtuvo una media de número de copias de 3.18 ± 1.79 , con una $p=0.007$ (figura 17B).

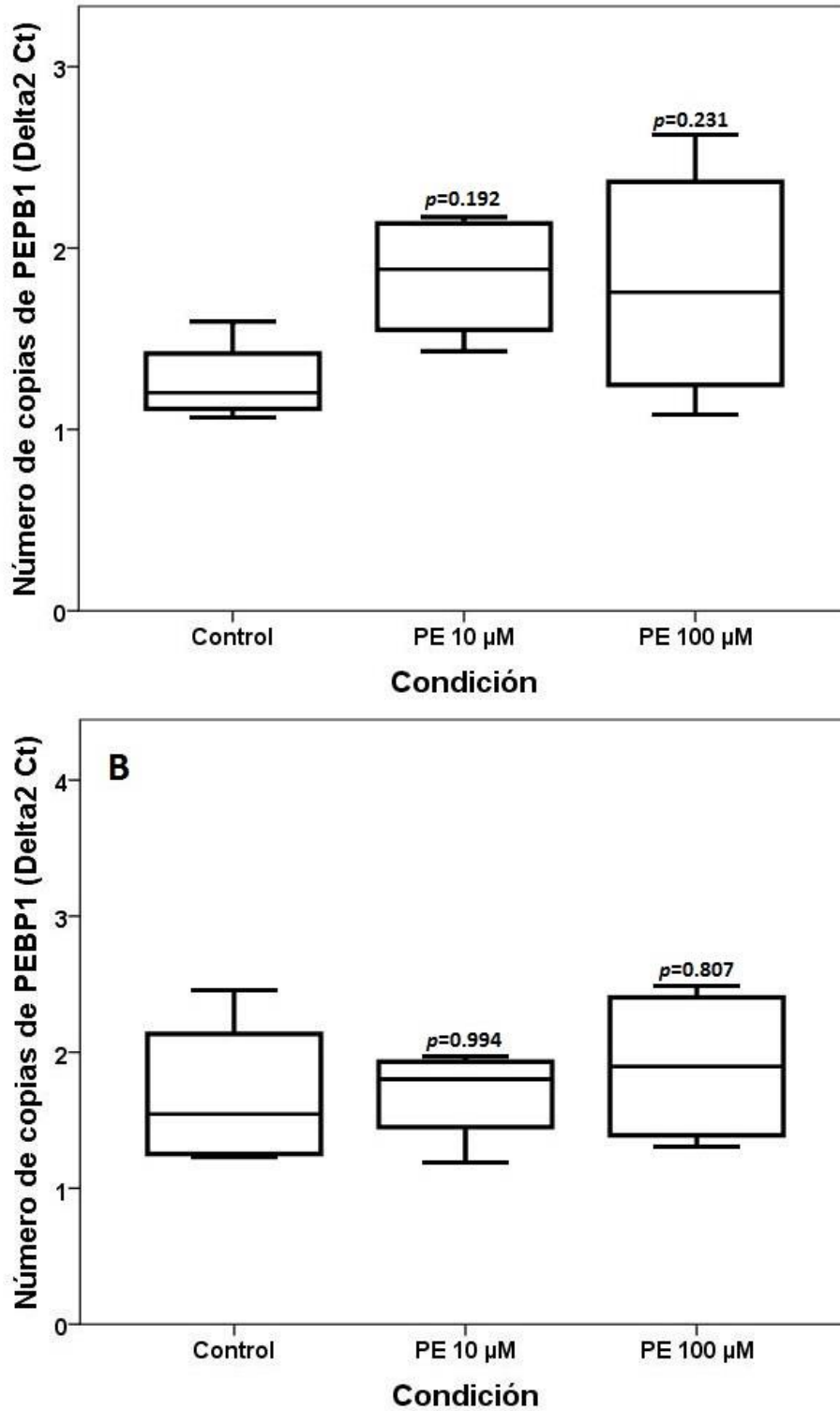


Figura 14. Efecto de la PE en la modificación de la expresión de PEPB1 a las 12 horas en dos líneas celulares de FPHN. A) Línea FN-4-12. B) Línea FN-2-13. Se realizó ANOVA considerando una significancia de $p < 0.05$.

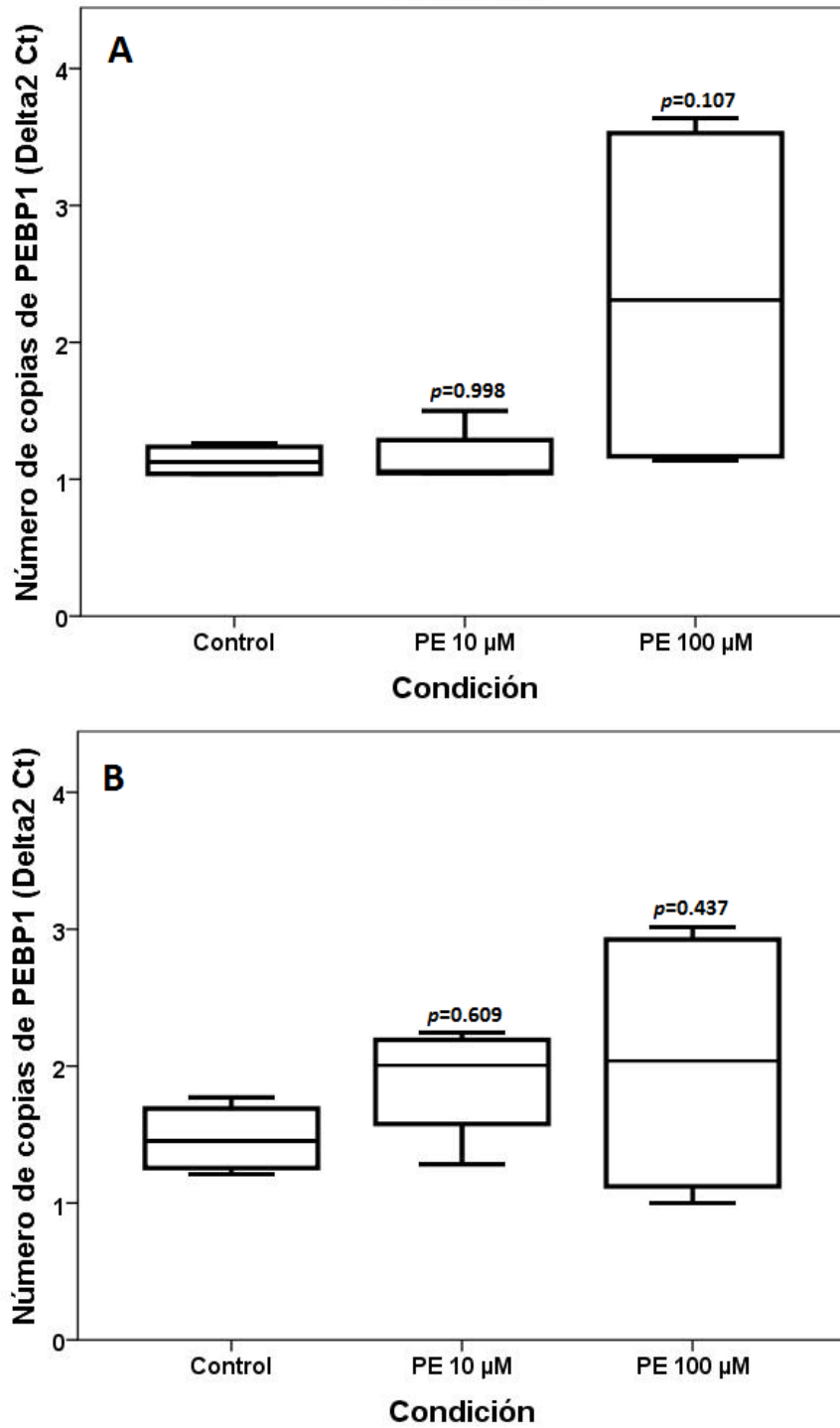


Figura 15. Efecto de la PE en la modificación de la expresión de PEBP1 a las 24 horas en FPHN. A) Línea FN-4-12. B) Línea FN-2-13. Se realizó ANOVA considerando una $p < 0.05$ significativa.

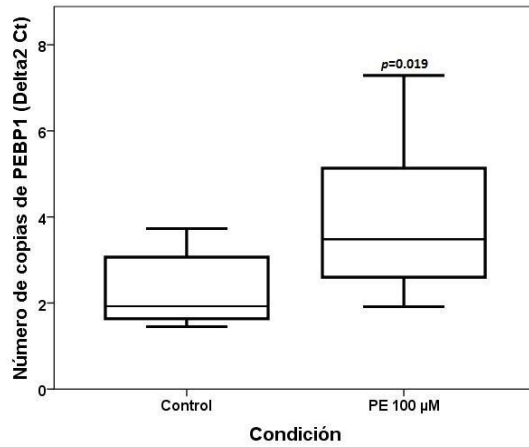


Figura 16. Efecto de la PE a las 24 horas en la modificación de la expresión de PEBP1 en la línea NOVA. Se realizó una prueba de T-Student con una significancia de $p < 0.05$.

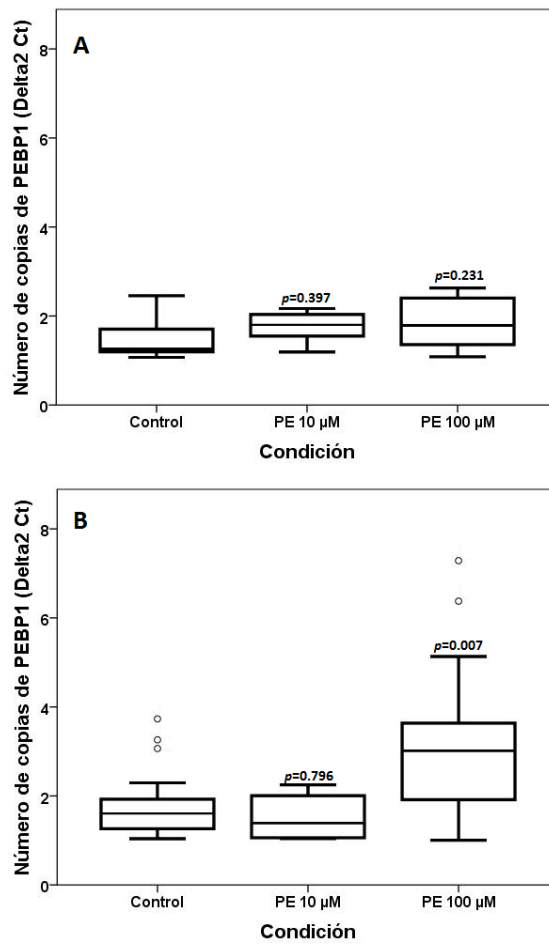


Figura 17. Efecto de la PE a 10 μM y 100 μM , en la modificación de la expresión de PEBP1 a las 12 y 24 horas en tres líneas celulares de FPHN. A) Efecto de la PE a las 12 horas. B) Efecto de la PE a las 24 horas. Se realizó ANOVA considerando una $p < 0.05$ y una prueba post hoc de Dunnett.

DISCUSIÓN

El SP tiene la función de reducir la tensión alveolar, participa en la actividad inmunitaria y es vital en el intercambio respiratorio. Sin embargo el SP es un complejo con muchos componentes que podría tener muchas otras funciones además de las que se han descrito. En experimentos *in vitro*, se demostró que SP disminuye la expresión de colágena, aumenta la expresión de colagenasa (MMP-1) e incrementa la tasa de apoptosis, induciendo así un fenotipo antifibrosante (Vazquez de Lara L. y cols., 2000). En otro estudio se observó que el fenotipo antifibrosante que produce el SP en los FPHN está relacionado con la señalización de Ca^{2+} intracelular a través de la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares mediados por fosfolipasa $C\beta$ (FLPC β), la liberación de Ca^{2+} de los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP $_3$ Rs) y a través del flujo del Ca^{2+} a los almacenes. También se observó que la inhibición de los canales impedían la inducción de apoptosis y la disminución de la expresión de α 1-procolágena en FPHN (Guzman-Silva y cols., 2015). En otro estudio se probó el efecto de los fosfolípidos del surfactante y se llegó a la conclusión de que la PE es el principal componente que participa en este efecto antifibrosante (Romero Lopez, 2010). En un modelo murino de fibrosis pulmonar con bleomicina, se probó el efecto del SP enriquecido con PE y PE sola, se encontró que disminuyó el daño epitelial y la concentración de colágena en una etapa aguda de la enfermedad (Tlatelpa Romero, 2013). Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado en FPHN si la PE también induce apoptosis, y el mecanismo a través de cual podría ejercer este efecto. En este estudio se observó que la PE induce apoptosis en FPHN de manera tiempo dosis dependiente. Este mismo efecto se ha reportado en otro tipo de células. Por ejemplo, en células malignas de mesotelioma (NCI-H28), en donde indujo apoptosis de manera dosis y tiempo dependiente (Kaku y cols., 2014), en células de hepatoma humano (HepG2) donde la apoptosis se estableció mediante la modificación de las proteínas bcl-2/bax (Yao y cols., 2009), y en células (SMMC-7721) produciendo el aumento de las proteínas Bax/Bcl-2 involucradas en la vía ERK y Stas1/2 (Xue y cols., 2014).

La PEBP1 desde que se descubrió como una proteína, se describió como un inhibidor fisiológico de la vía Raf/MEK/ERK, inicialmente se denominó como la proteína

inhibitoria de la Raf cinasa (RKIP); sin embargo actualmente se denomina PEBP1 por su unión a fosfatidiletanolamina. La PEBP1 a través de la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK modula numerosos procesos celulares incluyendo la proliferación, apoptosis y la progresión del ciclo celular (Al-Mulla y cols., 2013). La inhibición de la vía Raf/MEK/ERK regula la transcripción dependiente de AP-1, que a su vez regula la expresión de colágena (Yeung y cols., 2000). El gen de la α 1-procolágena tiene un tamaño de 18 kb y está compuesto de 52 axones. Los exones del 6 al 49 codifican los dominios alfa hélice. La mayoría de estos axones tiene de 45 a 54 pb o múltiplos de 45 bp o 54 pb (Xu y cols., 2016). La transcripción constitutiva del promotor proximal de la α 1-procolágena está bajo control de cuatro elementos *cis*, estos incluyen una serie de elementos discretos de DNA: en la región -300 está localizadas las proteínas C/EBP, Ets, AP-1 y Sp1; en el segundo segmento existen regiones ricas en TCC localizadas en -160 y -125, estas interactúan con Sp1 y SP3; en la región -80 existe una región canónica de CCAAT reconocida por el trímero CBF/NFY; en el sitio +7 CpG que ésta unido por las proteínas RFX (Ramirez y cols., 2016). Los elementos *cis* activos que controlan la actividad de los promotores proximales también están involucrados en la mediación de la repuesta transcripcional a citoquinas que están implicadas en la remodelación de tejido fibrótico (Leask y Abraham, 2004). Esto implica que alteraciones a nivel genético está estrechamente relacionados con enfermedades fibróticas. El AP-1 es uno de los principales factores de transcripción envuelto en la regulación del promotor del gen de la α 1-procolágena (Jacques y cols., 2010). Este factor de transcripción es activado por la señalización de Raf-1 (Hu y cols., 2014). La sobre expresión de PEBP1 suprime la vía de señalización de MEK y ERK, como consecuencia interfiere con Raf-1 que modula la transcripción mediada por AP-1 (Yeung y cols., 1999). En base a lo anterior uno de los objetivos en este estudio fue determinar si la PE modifica la expresión de PEBP1 nuestros resultados dan evidencia que la PE aumenta la expresión de PEBP1 en las líneas celulares estudiadas. Nosotros especulamos que la PE induce un aumento en la expresión de PEBP1 suprimiendo la vía ERK y como consecuencia interfiere en la activación tanto de enzimas antiapoptóticas como con la inducción de Raf-1 y en la transformación del factor de transcripción de la colágena la AP-1. También inhibe las señalización de NF-kb al inhibir las cinasas TAK1,

NIK e IKK, esta inhibición resulta en la inhibición corriente debajo de productos génicos antiapoptóticos, lo que favorecería un aumento en la apoptosis (figura 18).

En este estudio se probó el efecto de la PE en la inducción de apoptosis y en la modificación de la expresión de la PEBP1 en FPHN *in vitro*. Los resultados obtenidos dan evidencia de que la PE indujo apoptosis y modificó la expresión de la PEBP1, de manera tiempo dosis dependiente. Sin embargo es importante hacer notar que no se observó el mismo efecto en todas las líneas celulares lo cual podría deberse que provenían de distintos individuos, por lo que se sugiere probar el efecto de la PE en otras líneas de FPHN y en líneas celulares fibróticas. Este estudio sólo midió la apoptosis y la expresión de PEBP1 en FPHN. Se requieren realizar otros estudios que midan otras proteínas involucradas en la vía de señalización RAF/MEK/ERK, para corroborar los resultados obtenidos.

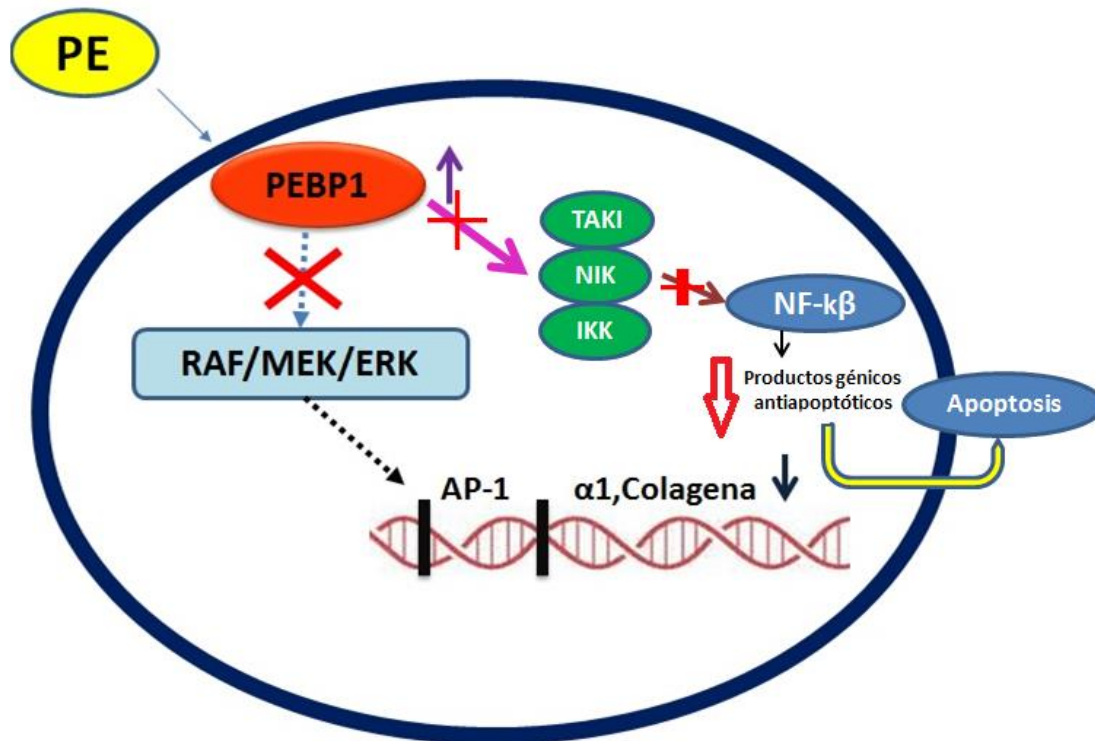


Figura 18. Mecanismo por el cual estaría actuando la PE al modificar la expresión de PEBP1. El aumento en la expresión de PEBP1 inhibe la vía RAF/MEK/ERK incidiendo en el factor promotor de la $\alpha 1$ - colágena. También inhibe las señalización de NF- κ b al inhibir las cinasas TAK1, NIK e IKK, esta inhibición resulta en la inhibición corriente debajo de productos génicos antiapoptóticos, lo que favorecería un aumento en la apoptosis (Al-Mulla y cols., 2013; Yeung y cols., 2000).

CONCLUSIONES

- La PE 50 μ M y 100 μ M a las 48 horas induce apoptosis.
- La PE 100 μ M a las 48 horas aumento la expresión de PEBP1.
- Los resultados demuestran que la PE exógena indujo apoptosis en FPHN este efecto se observó de manera tiempo dosis dependiente.
- Las condiciones de estandarización para la medición de apoptosis con el Kit ApoPercentage dependen del tipo celular.

BIBLIOGRAFÍA

- Agassandian M., Mallampalli R.K. (2013). Surfactant phospholipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1831:612-625.
- Akella A., Deshpande S.B. (2013). Pulmonary surfactants and their role in pathophysiology of lung disorders. *Indian J. Exp. Biol.* 51:5-22.
- Al-Mulla F., Bitar M.S., Taqi Z., Yeung K.C. (2013). RKIP: much more than Raf kinase inhibitory protein. *J. Cell Physiol* 228:1688-1702.
- Ariki S., Nishitani C., Kuroki Y. (2012). Diverse functions of pulmonary collectins in host defense of the lung. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:532071.
- Calkovska A., Linderholm B., Haegerstrand-Bjorkman M., Curstedt T. (2012). Properties of modified natural surfactant after exposure to fibrinogen in vitro and in an animal model of respiratory distress syndrome. *Pediatr. Res.* 72:262-269.
- Chavarha M., Khoojinian H., Schulwitz L.E., Jr., Biswas S.C., Rananavare S.B., Hall S.B. (2010). Hydrophobic surfactant proteins induce a phosphatidylethanolamine to form cubic phases. *Biophys. J.* 98:1549-1557.
- Cheng K.H., Virtanen J., Somerharju P. (2012). Calorimetric behavior of phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine bilayers is compatible with the superlattice model. *J. Phys. Chem. B* 116:1802-1811.
- Escara-Wilke J., Yeung K., Keller E.T. (2012). Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 31:615-620.
- Galluzzi L., Vitale I., Abrams JM., Baehrecke EH., Dawson TM., El-Deiry W., Fulda S., Gottlieb E., Green E. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death. Differ.* 107-120.
- Goss V., Hunt A.N., Postle A.D. (2013). Regulation of lung surfactant phospholipid synthesis and metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1831:448-458.
- Granovsky A.E., Rosner M.R. (2008). Raf kinase inhibitory protein: a signal transduction modulator and metastasis suppressor. *Cell Res.* 18:452-457.
- Green D.R., Llambi F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7.
- Guzman-Silva A., Vazquez de Lara L.G., Torres-Jacome J., Vargaz-Guadarrama A., Flores-Flores M., Pezzat S.E., Lagunas-Martinez A., Mendoza-Milla C., Tanzi F., Moccia F., Berra-Romani R. (2015). Lung Surfactant Increases Free Cytosolic Levels of Ca²⁺ in Human Lung Fibroblasts. *PLoS ONE.* 10:e0134564.
- Hao C., Wei S., Tong Z., Li S., Shi Y., Wang X., Zhu Z.H. (2012). The effects of RKIP gene expression on the biological characteristics of human triple-negative breast cancer cells in vitro. *Tumour. Biol.* 33:1159-1167.

- Hu C.J., Zhou L., Cai Y. (2014). Dihydroartemisinin induces apoptosis of cervical cancer cells via upregulation of RKIP and downregulation of bcl-2. *Cancer Biol. Ther.* 15:279-288.
- Jacques E., SemLali A., Boulet L.P., Chakir J. (2010). AP-1 overexpression impairs corticosteroid inhibition of collagen production by fibroblasts isolated from asthmatic subjects. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* 299:L281-L287.
- Kainu V., Hermansson M., Hanninen S., Hokynar K., Somerharju P. (2013). Import of phosphatidylserine to and export of phosphatidylethanolamine molecular species from mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1831:429-437.
- Kaku Y., Tsuchiya A., Kanno T., Nakano T., Nishizaki T. (2014). Dipalmitoleoyl-phosphatidylethanolamine induces apoptosis of NCI-H28 malignant mesothelioma cells. *Anticancer Res.* 34:1759-1764.
- Keller E.T., Fu Z., Brennan M. (2004). The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease. *Biochem. Pharmacol.* 68:1049-1053.
- Leask A., Abraham J.D. (2004). TGF- β signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 18:816-827.
- Lopez-Rodriguez E., Perez-Gil J. (2014). Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: from biophysics to therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1838:1568-1585.
- Lorenz K., Lohse M.J., Quitterer U. (2003). Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature* 426:574-579.
- Park S., Rath O., Beach S., Xiang X., Kelly S.M., Luo Z., Kolch W., Yeung K.C. (2006). Regulation of RKIP binding to the N-region of the Raf-1 kinase. *FEBS Lett.* 580:6405-6412.
- Parra E., Perez-Gil J. (2015). Composition, structure and mechanical properties define performance of pulmonary surfactant membranes and films. *Chem. Phys. Lipids* 185:153-175.
- Pechkovsky D.V., Prele C.M., Wong J., Hogaboam C.M., McAnulty R.J., Laurent G.J., Zhang S.S., Selman M., Mutsaers S.E., Knight D.A. (2012). STAT3-mediated signaling dysregulates lung fibroblast-myofibroblast activation and differentiation in UIP/IPF. *Am. J. Pathol.* 180:1398-1412.
- Phelps D.S., Umstead T.M., Mejia M., Carrillo G., Pardo A., Selman M. (2004). Increased surfactant protein-A levels in patients with newly diagnosed idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 125:617-625.
- Phoenix D.A., Harris F., Mura M., Dennison S.R. (2015). The increasing role of phosphatidylethanolamine as a lipid receptor in the action of host defence peptides. *Prog. Lipid Res.* 59:26-37.
- Raja M. (2011). Do small headgroups of phosphatidylethanolamine and phosphatidic acid lead to a similar folding pattern of the K(+) channel? *J. Membr. Biol.* 242:137-143.
- Ramirez F., Tanaka S., Bou-Gharios G. (2016). Transcriptional regulation of the human $\alpha 2(I)$ collagen gene (COL1A2), an informative model system to study fibrotic diseases. *Matrix Biol.* 25:365-372.

Rath O., Park S., Tang H.H., Banfield M.J., Brady R.L., Lee Y.C., Dignam J.D., Sedivy J.M., Kolch W., Yeung K.C. (2008). The RKIP (Raf-1 Kinase Inhibitor Protein) conserved pocket binds to the phosphorylated N-region of Raf-1 and inhibits the Raf-1-mediated activated phosphorylation of MEK. *Cell Signal*. 20:935-941.

Romero Lopez, Y. Papel de los fosfolípidos del surfactante pulmonar como moduladores de la expresión de colágena en fibroblastos de pulmón humano. 2010. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Salgado D., Fischer R., Schillberg S., Twyman R.M., Rasche S. (2014). Comparative evaluation of heterologous production systems for recombinant pulmonary surfactant protein D. *Front Immunol*. 5:623.

Selman M., Mejia M., Pardo A. (2009). [Idiopathic pulmonary fibrosis]. *Rev. Invest Clin*. 61:233-242.

Shaulian E. (2010). AP-1 The Jun proteins: Oncogenes of tumor suppressors in disguise?. *Cell signal*. 22:894-899.

Shemon A.N., Heil G.L., Granovsky A.E., Clark M.M., McElheny D., Chimon A., Rosner M.R., Koide S. (2010). Characterization of the Raf kinase inhibitory protein (RKIP) binding pocket: NMR-based screening identifies small-molecule ligands. *PLoS ONE*. 5:e10479.

Tavel L., Jaquillard L., Karsisiotis A.I., Saab F., Jouvensal L., Brans A., Delmas A.F., Schoentgen F., Cadene M., Damblon C. (2012). Ligand binding study of human PEBP1/RKIP: interaction with nucleotides and Raf-1 peptides evidenced by NMR and mass spectrometry. *PLoS ONE*. 7:e36187.

Tlatelpa Romero, B. Efecto del factor surfactante y la fosfatidiletanolamina en un modelo murino de fibrosis pulmonar idiopática. 2013. Benemerita Universidad Autónoma de Puebla.

Tuck S. (2011). Extracellular vesicles: budding regulated by a phosphatidylethanolamine translocase. *Curr. Biol*. 21:R988-R990.

Vallee B., Teyssier C., Maget-Dana R., Ramstein J., Bureaud N., Schoentgen F. (1999). Stability and physicochemical properties of the bovine brain phosphatidylethanolamine-binding protein. *Eur. J. Biochem* 266:40-52.

Vance J.E. (2008). Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *J. Lipid Res*. 49:1377-1387.

Vance J.E., Tasseva G. (2013). Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1831:543-554.

Vazquez de Lara L., Becerril C., Montano M., Ramos C., Maldonado V., Melendez J., Phelps D.S., Pardo A., Selman M. (2000). Surfactant components modulate fibroblast apoptosis and type I collagen and collagenase-1 expression. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 279:L950-L957.

Wang L., Li H., Zhang J., Lu W., Zhao J., Su L., Zhao B., Zhang Y., Zhang S., Miao J. (2013). Phosphatidylethanolamine binding protein 1 in vacuolar endothelial cell autophagy and atherosclerosis. *J. Physiol* 591:5005-5015.

- Wright J.R. (2005). Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 5:58-68.
- Xu Y., McDonald J., Perloff E., Buttice G., Schreiber M.B., Smith D.B. (2016). Collagen and major histocompatibility class II expression in mesenchymal cells from CIITA hypomorphic mice. *Molecular Immunology* 44:1709-1721.
- Xue L., Li M., Chen T., Sun H., Zhu J., Li X., Wu F., Wang B., Li J., Chen Y. (2014). PEinduced apoptosis in SMMC7721 cells: involvement of Erk and Stat signalling pathways. *Int. J. Mol. Med.* 34:119-129.
- Yao Y., Huang C., Li Z.F., Wang A.Y., Liu L.Y., Zhao X.G., Luo Y., Ni L., Zhang W.G., Song T.S. (2009). Exogenous phosphatidylethanolamine induces apoptosis of human hepatoma HepG2 cells via the bcl-2/Bax pathway. *World J. Gastroenterol.* 15:1751-1758.
- Yeung K., Janosch P., McFerran B., Rose W.D., Mischak H., Sedivy J.M., Kolch W. (2000). Mechanism of Suppression of the Raf/MEK/Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway by the Raf Kinase Inhibitor Protein. *Molecular and Cellular Biology* 20:3079-3085.
- Yeung K., Seitz T., Li S., Janosch P., McFerran B., Kaiser C., Fee F., Katsanakis K.D., Rose D.W., Mischak H., Sedivy J.M., Kolch W. (1999). Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Letters to nature* 401:173-177.
- Yousuf S., Duan M., Moen E.L., Cross-Knorr S., Brilliant K., Bonavida B., LaValle T., Yeung K.C., Al-Mulla F., Chin E., Chatterjee D. (2014). Raf kinase inhibitor protein (RKIP) blocks signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in breast and prostate cancer. *PLoS. One.* 9:e92478.
- Zhang H., Wu J., Keller J.M., Yeung K., Keller E.T., Fu Z. (2012). Transcriptional regulation of RKIP expression by androgen in prostate cells. *Cell Physiol Biochem.* 30:1340-1350.
- Zhang J., Chen L., Liu X., Kammertoens T., Blankenstein T., Qin Z. (2013). Fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells prevent carcinoma through collagen production and encapsulation of carcinogens. *Cancer Res.* 73:2770-2781.
- Zhao J., O'Donnell V.B., Balzar S., St Croix C.M., Trudeau J.B., Wenzel S.E. (2011). 15-Lipoxygenase 1 interacts with phosphatidylethanolamine-binding protein to regulate MAPK signaling in human airway epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108:14246-14251.
- Zhu C., Wang Q., Xie J., Shi J., Zhou X., Li D., Xiong F., Zhang L. (2013). Expression and significance of RKIP and E-cadherin in lung squamous cell carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.* 19:19-26.
- Zuo Y.Y., Veldhuizen R.A., Neumann A.W., Petersen N.O., Possmayer F. (2008). Current perspectives in pulmonary surfactant--inhibition, enhancement and evaluation. *Biochim. Biophys. Acta* 1778:1947-1977.