

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI
NATURAL



Grado en Biotecnología

Papel de MUC1 en la Fibrosis Pulmonar Idiopática

**Laboratorio de Farmacología
Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia**

CURSO ACADÉMICO:

2015/2016

AUTOR:

Paula Montero Magalló

TUTORES:

Dr. Javier Milara Paya y Dra. Patricia Almudéver Folch

Valencia, Julio 2016



ALUMNO: Paula Montero Magalló

TUTOR ACADÉMICO: Prof. Dña. Patricia Almudéver Folch

COTUTOR: D. Javier Milara Paya

Valencia, Julio 2016

Licenciado bajo creative commons Reconocimiento – No Comercial –Sin Obra Derivada CC BY-NC-ND

TÍTULO: *Papel de MUC1 en la Fibrosis Pulmonar Idiopática*

RESUMEN:

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar intersticial que afecta alrededor de 500000 personas en Europa. Se trata de una enfermedad pulmonar fibrótica que cursa con disnea, disminución de la función pulmonar y cuya esperanza de vida es de 3 a 5 años desde el momento del diagnóstico. Actualmente se considera como una enfermedad fibroproliferativa en la cual tiene lugar la activación de los fibroblastos pulmonares y la transformación a miofibroblastos de diferentes tipos celulares como son las células epiteliales alveolares tipo II, vasculares endoteliales, pericitos, fibrocitos circulantes y células mesoteliales. Hoy en día se sabe que la fracción extracelular de MUC1 (KL-6) es un biomarcador de FPI y que MUC1 participa en la regulación de procesos proliferativos en diversas enfermedades, principalmente cáncer. Por tanto, en este trabajo se ha decidido investigar la posible participación intracelular de MUC1 en FPI, tratando de estudiar los distintos mecanismos intracelulares en los que interviene dicha proteína. Para ello, se evaluó la participación de MUC1-Ct en las vías de transducción de señal desencadenadas por el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), principal factor profibrótico, tratando de elucidar interacciones de MUC1-Ct con proteínas de dichas vías de transducción de señal.

Los resultados obtenidos permiten afirmar una participación de MUC1 a nivel intracelular en los procesos celulares característicos de la FPI, actuando en la vía de transducción de señal de TGF- $\beta 1$ a través de su interacción con p-Smad2/3. Por tanto, se podría plantear que la modulación farmacológica de MUC1 podría ser una prometedora diana en FPI.

PALABRAS CLAVE: Fibrosis pulmonar idiopática, MUC1, TGF- $\beta 1$

STUDENT: Paula Montero Magalló

ACADEMIC TUTOR: Prof. Dña. Patricia Almudéver Folch

TUTOR: D. Javier Milara Paya

Valencia, July 2016

**Licensed under Creative Commons Attribution – Noncommercial – No Derivatives
Attribution CC BY-NC-ND**

TITLE: *Role of MUC1 in idiopathic pulmonary fibrosis*

ABSTRACT:

Idiopathic pulmonary fibrosis is an interstitial lung disease which affects about to 500,000 people in Europe. This fibrosing disease is characterized by dyspnea, lung functional impairment and it has an estimated survival of 3-5 years after diagnosis. Currently, it is considered as a fibrotic proliferative disease in which both the activation of lung fibroblasts and transformation from different cell types to miofibroblasts have a pathogenic key role. This transformation may occur from alveolar type II cells, vascular endothelial cells, pericytes, circulating fibrocytes and mesothelial cells. Nowadays it is known that the extracellular region of MUC1 (KL-6) is a biomarker for IPF and that MUC1 is involved in the regulation of proliferative processes in several diseases, but especially in cancer. Therefore, the aim of this work is to investigate the potential intracellular role of MUC1 in IPF, trying to study the intracellular mechanisms in whom this protein is involved. To do so, we assessed MUC1-Ct participation in the signaling pathways triggered by transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), which is the main profibrotic factor, trying to elucidate interactions between MUC1-Ct and the characteristic proteins of these signaling pathways. The results shown in this study support the idea of MUC1 participating, at an intracellular level, in the cellular processes involved in IPF, taking part in the TGF- β 1 signaling pathway through its interaction with p-Smad2/3. Therefore, the pharmacological modulation of MUC1 could be a potential target in IPF.

KEY WORDS: Idiopathic pulmonary fibrosis, MUC1, TGF- β 1.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer la ayuda recibida a lo largo de las prácticas en la Fundación Hospital General Universitario de Valencia, tanto a nivel práctico como durante el desarrollo del trabajo, a las siguientes personas: En primer lugar, a Julio Cortijo y Javier Milara, por darme la oportunidad de participar en su grupo de investigación y de realizar el trabajo en una línea muy estimulante y enriquecedora. También, a mi tutora UPV, Patricia Almudéver, por su disposición en todo momento y los consejos que me ha transmitido.

Por último, especialmente a Beatriz Ballester, por ejercer perfectamente su papel tanto de compañera de laboratorio como de supervisora. Por estar siempre dispuesta a enseñarme cualquier técnica y transmitirme nuevos conocimientos y por su paciencia y dedicación, que han hecho posible que este trabajo se desarrolle de forma exitosa.

ÍNDICE: Papel de MUC1 en la Fibrosis Pulmonar Idiopática

1.	Introducción	1
1.1.	Fibrosis pulmonar idiopática	1
1.1.1.	Definición	1
1.1.2.	Prevalencia e incidencia	1
1.1.3.	Mortalidad.....	3
1.1.4.	Fisiopatología	3
1.1.5.	Tratamiento.....	6
1.2.	Factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) como principal factor profibrótico	8
1.2.1.	Activación y función celular.....	8
1.2.2.	Vías de señalización celular.....	8
1.3.	Marcadores moleculares en Fibrosis Pulmonar Idiopática	9
1.4.	MUC1	10
1.4.1.	Estructura y localización celular.....	10
1.4.2.	Participación en procesos patológicos	11
2.	Objetivos.....	13
3.	Material y métodos	14
3.1.	Experimento de silenciamiento de <i>MUC1</i> en células epiteliales alveolares tipo II y fibroblastos.....	14
3.2.	<i>Western Blot</i>	14
3.3.	Transcripción Inversa (RT) y Real Time-PCR	15
3.4.	Monitorización de la actividad de la vía de señalización TGF- β 1/Smad en A549 mediante “Smad binding element reporter kit (SBE)”	16
3.5.	Co-Inmunofluorescencia en A549 de MUC1 y p-Smad2/3	16
3.6.	Co-Inmunoprecipitación en A549 de MUC1 y p-Smad2/3	17
3.7.	Análisis estadístico.....	17
4.	Resultados y discusión.....	18
4.1.	Expresión de MUC1-Ct en pacientes FPI (estudios realizados previamente)	18
4.2.	Activación <i>in vitro</i> de MUC1 mediada por TGF- β 1 a nivel de células epiteliales y fibroblastos.....	18
4.3.	Participación de MUC1 en la fisiopatología de la FPI a nivel intracelular de células epiteliales y fibroblastos	19
4.4.	Interacción de MUC1 con p-Smad3 en FPI.....	24

5.	Conclusiones	28
6.	Bibliografía	29

ÍNDICE DE FIGURAS

1.	Incidencia de FPI estratificada por sexo y edad.....	2
2.	Prevalencia de FPI estratificada por sexo y edad.....	2
3.	Mortalidad estandarizada por edad para distintos países	3
4.	Estructura del acino alveolar.....	4
5.	A: Imagen radiológica de pulmón sano. B: Imagen radiológica de pulmón de paciente con FPI y con patrón de panal de abeja	5
6.	Origen de los miofibroblastos en fibrosis pulmonar idiopática.	6
7.	Activación y señalización profibrótica del factor de crecimiento transformante $\beta 1$	9
8.	Estructura heterodimérica de MUC1.	11
9.	Expresión de MUC1-Ct en sujetos control (n=14) y pacientes FPI (n=14) a nivel de expresión génica (A) y proteica (B).....	18
10.	Activación <i>in vitro</i> de MUC1-Ct mediada por TGF- $\beta 1$ en células epiteliales alveolares tipo II (A549) (A) y fibroblastos (MRC5) (B).....	19
11.	Participación <i>in vitro</i> de MUC1-Ct en los procesos de remodelado tisular de FPI mediados por TGF- $\beta 1$ en células epiteliales alveolares tipo II (A549).	21
12.	Participación <i>in vitro</i> de MUC1-Ct en los procesos de remodelado tisular de FPI mediados por TGF- $\beta 1$ en fibroblastos (MRC5).....	22
13.	Interacción y colocalización celular <i>in vitro</i> de MUC1-Ct con p-Smad 2/3 en células epiteliales alveolares tipo II (A549).....	25
14.	Participación <i>in vitro</i> de MUC1 en la vía de señalización TGF- $\beta 1$ /smad en células epiteliales alveolares tipo II (A549).....	26
15.	Modelo propuesto en células alveolares tipo II de la vía de transducción de señal en FPI mediada por TGF- $\beta 1$ y MUC1-Ct.....	27

ABREVIATURAS

A549: Línea celular epitelial alveolar tipo II humana.

BSA: seroalbúmina bovina.

CTGF: factor de crecimiento de tejido conectivo.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

EPI: Enfermedad pulmonar intersticial

FPI: Fibrosis Pulmonar Idiopática.

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

KL6: Krebs von den lungen-6.

MMP: Metaloproteinasa de matriz extracelular.

MRC5: Línea celular de fibroblastos pulmonares fetales.

MUC1-Ct: Región citoplasmática (C-terminal) de la mucina MUC1

PBS: tampón salino fosfatado.

SFB: suero fetal bovino.

TEM: transición epitelio – mesenquimal.

TEndM: transición endotelio – mesenquimal.

TGF- β 1: factor de crecimiento transformante β 1.

α -SMA: α actina de músculo liso.

1. Introducción

1.1. Fibrosis pulmonar idiopática

1.1.1. Definición

Las enfermedades pulmonares intersticiales (EPI) son un grupo heterogéneo de patologías respiratorias de carácter crónico que comparten alteraciones funcionales tales como la fibrosis e inflamación del parénquima pulmonar. La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) se clasifica como una de las formas más comunes de EPI, concretamente en el subgrupo de enfermedades de etiología desconocida.

La FPI viene definida por las principales sociedades torácicas y respiratorias como: “una forma específica de neumonía intersticial fibrosante, progresiva, crónica y de causa desconocida, que ocurre principalmente en individuos de edad avanzada y que se encuentra limitada a los pulmones” (Raghu et al., 2011). Dicha patología se caracteriza principalmente por un empeoramiento progresivo e irreversible de la funcionalidad pulmonar, teniendo lugar una sintomatología caracterizada por disnea progresiva, tos seca, crépitos en la inspiración final y disminución del intercambio gaseoso (Wollin, Bonella and Stowasser, 2015).

1.1.2. Prevalencia e incidencia

En epidemiología, la incidencia contabiliza el número de casos nuevos que aparecen en un período de tiempo previamente determinado, mientras que la prevalencia determina la proporción de personas que sufren una enfermedad con respecto al total de la población en estudio. En el caso de la FPI, los datos epidemiológicos son escasos y poco concluyentes, debido a que no hay un consenso en cuanto a la definición y clasificación de la enfermedad, y a la dificultad de su diagnóstico. Esto supone que cada uno de los estudios epidemiológicos realizados debe de analizarse de forma individualizada, pues las distintas metodologías empleadas para cada uno de ellos limitan las comparaciones. Es por ello que, los rangos que se presentan a continuación tienen un amplio nivel de variación.

Por lo que respecta a la incidencia, los estudios realizados en Europa mostraron, entre otros datos, una incidencia de 8,65/100.000 entre 2000-2012 en Reino Unido (Maher et al., 2013), 7,5 – 9,3/100.000 entre 2013- 2014 en Italia (Agabiti et al., 2014) y 1,3/100.000 en el caso de Dinamarca (Hyldgaard et al., 2014). Por lo que respecta a Estados Unidos, en Norteamérica se estimó una incidencia anual de 6,8/100000 considerando una definición estricta de FPI y 16,3/100.000 considerando una definición amplia de FPI (Raghu et al., 2006). También se realizaron estudios en EEUU incluyendo una población de individuos de 65 años o más. En este caso, la incidencia estimada entre los años 2001-2011 fue de 93,7/100.000 por año (Raghu et al., 2014).

Abarcando los datos de forma general, se observa que el ratio de incidencia puede variar de 0,22 a 93,7 por 100.000 por año en todo el mundo (Wollin, Bonella and Stowasser, 2015), siendo menor en Asia y Sudamérica (Hutchinson et al., 2015). Por tanto, como se observa en la Figura 1, la dificultad de comparación de los estudios epidemiológicos no permite obtener conclusiones objetivas acerca de la incidencia a nivel mundial. No obstante, el patrón común observado los últimos años es un aumento de la incidencia (similar a la de enfermedades tales como el cáncer de estómago, hígado, testículo y cervical (Hyldgaard et al., 2014)) en general,

viéndose más aumentada en personas de edad avanzada y de sexo masculino (Raghu et al., 2014).

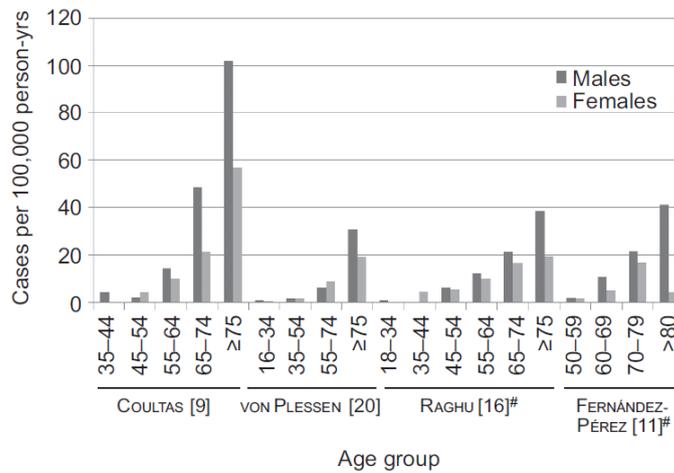


Figura 1: Incidencia de FPI estratificada por sexo y edad. Datos procedentes de cuatro estudios epidemiológicos distintos. # Definición estricta de la enfermedad. (Nalysnyk et al., 2012).

En el caso de la prevalencia, ésta también varía en función de la población estudiada y la definición empleada para identificar pacientes FPI. Así pues, en el año 2000 en EEUU se informó de una prevalencia de 14 casos por 100.000 habitantes usando definiciones estrictas de la enfermedad y 42,7 casos por 100.000 habitantes usando definiciones amplias (Raghu et al., 2006). Sin embargo, en los países europeos la prevalencia es más baja, oscilando desde 3,4/100.000 en el caso de Grecia (Karakatsani et al., 2009) hasta 23,4/100.000 en Noruega (Vonplessen, Grinde and Gulsvik, 2003). Como se puede observar en la Figura 2, de igual modo que ocurre en el caso de la incidencia, la prevalencia de la FPI aumenta con la edad, siendo mayor en pacientes que superan los 75 años. En este caso no existe una tendencia con respecto al sexo, pues los datos varían en función del estudio epidemiológico que se trate (Nalysnyk et al., 2012).

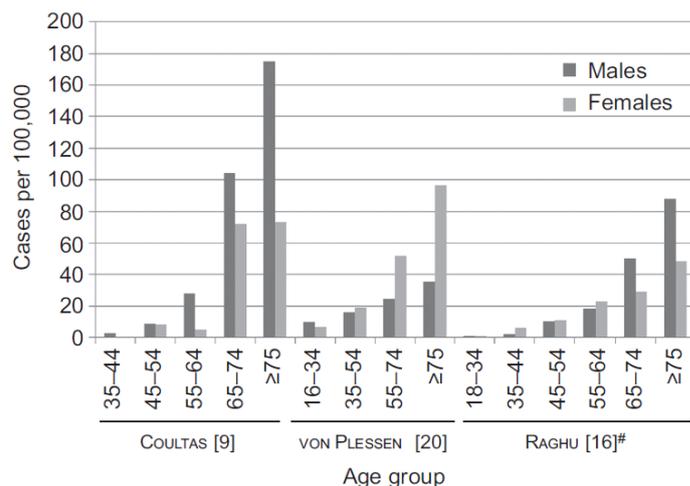


Figura 2: Prevalencia de FPI estratificada por sexo y edad. Datos procedentes de tres estudios epidemiológicos distintos. # Definición estricta de la enfermedad (Nalysnyk et al., 2012).

En cuanto a la posible influencia de factores geográficos, étnicos o culturales en la FPI, actualmente se desconoce.

1.1.3. Mortalidad

La FPI es una enfermedad progresiva que puede resultar en insuficiencias respiratorias, y en consecuencia, en una esperanza de vida de 3 a 5 años tras el diagnóstico (Loomis-King, Flaherty and Moore, 2013). Esto se debe a que a día de hoy, a pesar de las numerosas investigaciones, todavía no existe un tratamiento que sea capaz de combatirla eficazmente.

Los ratios de mortalidad varían entre 4 y 10 por cada 100000 habitantes y afecta a personas de edades comprendidas entre 40 y 75 años. Además, se observa una tendencia de mayor mortalidad en los hombres que en las mujeres. Los índices más elevados de mortalidad se encuentran en áreas industrializadas, lo que sugiere la exposición ocupacional y ambiental como posible factor de riesgo para el desarrollo de la FPI (Hutchinson et al., 2014).

Los ratios de mortalidad también son variables entre distintas áreas geográficas, siendo más bajos en países como Nueva Zelanda, Suecia y España, y más altos en Reino Unido y Japón. La tendencia general observada en esta enfermedad es un aumento continuo de la mortalidad a lo largo de los años a nivel mundial (Figura 3) (Hutchinson et al., 2014).

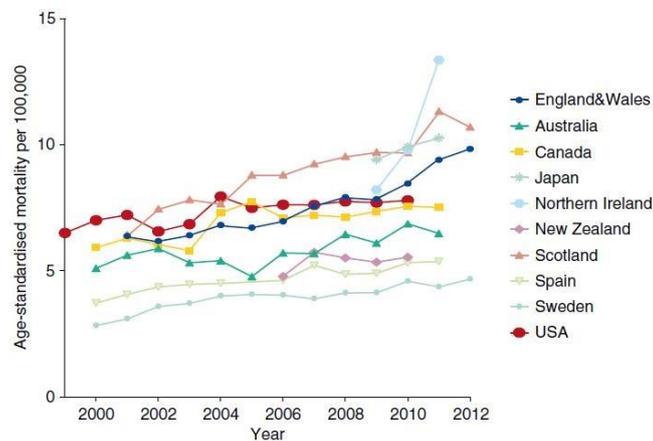


Figura 3: Mortalidad asociada a FPI estandarizada por edad para distintos países (Hutchinson et al., 2014).

1.1.4. Fisiopatología

Como se ha comentado anteriormente, la FPI afecta a los pulmones, encargados de suministrar oxígeno a los tejidos y eliminar el dióxido de carbono. Este proceso fisiológico se basa en la ventilación pulmonar, es decir, el flujo de entrada y salida de aire en los alveolos pulmonares y la difusión de oxígeno y dióxido de carbono entre estos y la sangre (Guyton and Hall, 2006). Los alveolos (Figura 4), situados al final del árbol bronquial, son por tanto los encargados del intercambio gaseoso. Para llevar a cabo su función, constan de unas paredes muy delgadas formadas por endotelio capilar, membrana basal y epitelio alveolar. Los capilares pulmonares tienen un diámetro muy pequeño y están limitados por el endotelio, separado del revestimiento epitelial alveolar por la membrana basal y el tejido intersticial adyacente. Este revestimiento epitelial se encuentra alineando los alveolos y está formado por dos tipos celulares, las células epiteliales alveolares de tipo I o neumocitos membranosos, que cubren aproximadamente el

90% de la superficie, y las células epiteliales alveolares de tipo II o neumocitos granulares que cubren el resto de superficie (Whitsett and Alenghat, 2014).

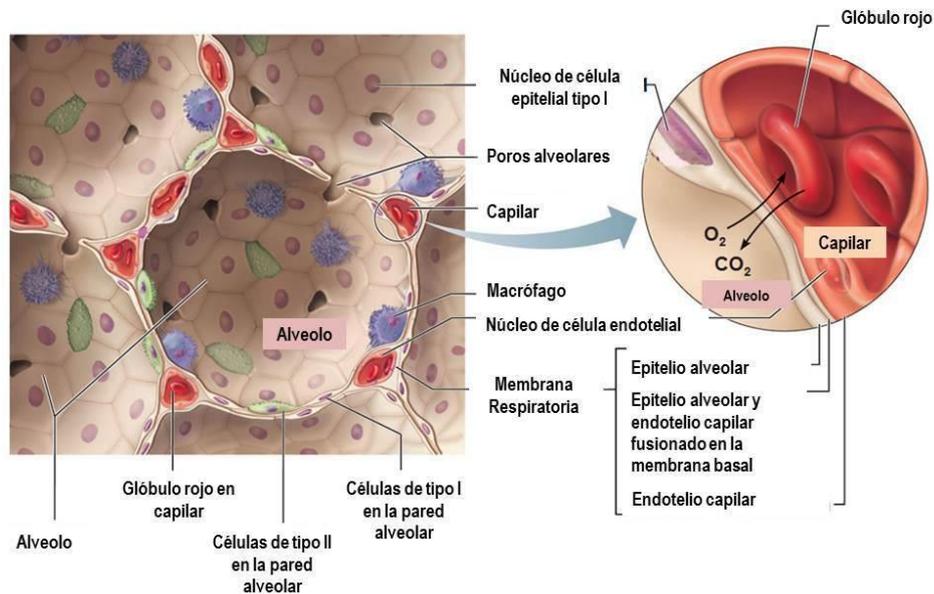


Figura 4: Estructura del acino alveolar.

En condiciones normales, los neumocitos de tipo I contactan con los capilares para fusionarse con el endotelio e intercambiar gases y mantienen la estructura del parénquima pulmonar, mientras que los de tipo II son responsables de las funciones metabólicas del pulmón. Cuando los neumocitos de tipo I son destruidos, son los neumocitos de tipo II los que proliferan para reparar los daños (Escuela.med.puc.cl, 2016).

La fisiopatología de la FPI se cree que subyace como consecuencia de un daño recurrente a las células epiteliales alveolares (Wollin, Bonella and Stowasser, 2015), teniendo lugar una pérdida progresiva de la arquitectura alveolar normal y un reemplazamiento de la misma por tejido fibrótico, lo cual desencadena en una disminución del intercambio gaseoso. El daño inicial se produce en los neumocitos de tipo I, en la superficie de los alveolos, y en respuesta a esto, los neumocitos de tipo II sufren una proliferación hiperplásica para cubrir las membranas basales expuestas (Hutchinson et al., 2014). En un intento por restaurar la función, estas células secretan citoquinas, factores de crecimiento, metaloproteinasas de matriz (MMPs) y mediadores procoagulantes, que promueven el reclutamiento y la activación de fibroblastos resistentes a apoptosis (Wollin, Bonella and Stowasser, 2015).

Entre los factores de crecimiento liberados, se encuentra el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), factor profibrótico cuya presencia en condiciones patológicas conduce a una acumulación de fibroblastos en las áreas dañadas y a su diferenciación a miofibroblastos (Loomis-King, Flaherty and Moore, 2013). Los miofibroblastos son una población de células mesenquimales que expresan α actina de musculo liso (α -SMA) y exhiben un fenotipo celular profibrótico, localizándose en *foci* y con una producción aumentada de colágenos fibrilares (tipos I y III) y otras macromoléculas de matriz extracelular (Piera-Velazquez, Mendoza and Jimenez, 2016). Como consecuencia, una de las principales características de la FPI es una

deposición excesiva de proteínas de matriz extracelular seguida de la pérdida de la estructura alveolar.

La destrucción del parénquima pulmonar en estadios avanzados de FPI se puede apreciar por el remodelado del pulmón a una estructura denominada “panal de abeja” (Figura 5). Este patrón se manifiesta en la tomografía computarizada de alta resolución (TCAR) como numerosos espacios aéreos quísticos rodeados por epitelio bronqueoalveolar, y frecuentemente llenos de mucosa y células inflamatorias (Raghu et al., 2011). Como se ha mencionado anteriormente, el infiltrado inflamatorio (linfocitos y células plasmáticas) se produce como consecuencia de la hiperplasia de las células epiteliales alveolares de tipo II, pero se considera un proceso leve.

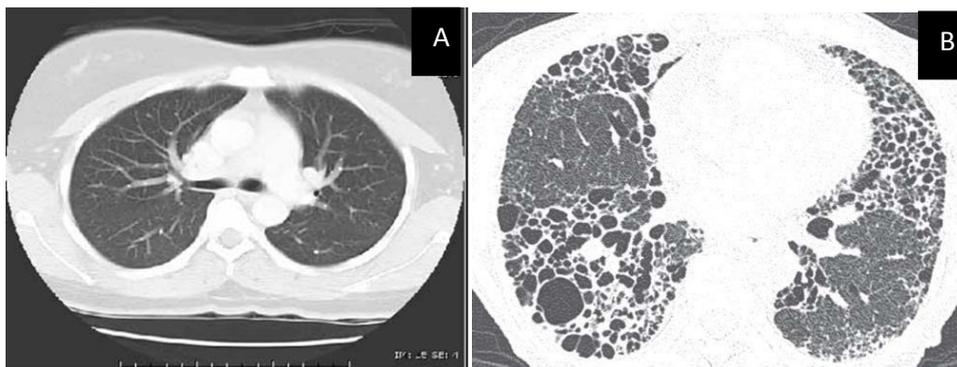


Figura 5: A: Imagen radiológica de pulmón sano. B: Imagen radiológica de pulmón de paciente con FPI y con patrón de panal de abeja (Arakawa and Honma, 2011).

En cuanto al origen de los fibroblastos activados o miofibroblastos acumulados en la FPI, se ha observado una amplia diversidad (Figura 6). Por un lado se encuentra la expansión de las células mesenquimales residentes y la diferenciación de los precursores circulantes llamados fibrocitos (Loomis-King, Flaherty and Moore, 2013). Así pues, también participan en este proceso transiciones celulares como la transición epitelial mesenquimal (TEM), inducida por la activación de factores de crecimiento como TGF- β 1. En este proceso se activan factores de transcripción inductores de TEM, como SLUG y SNAIL, lo que conduce a la sobreexpresión y/o silenciamiento de una serie de genes por parte de las células epiteliales. Debido a esto, las células epiteliales adquieren características moleculares y fisiológicas típicas de las células mesenquimales (Wolters, Collard and Jones, 2014), dando lugar a la pérdida de la polarización celular y la consecuente adquisición de la capacidad migratoria. La TEM se caracteriza principalmente por la pérdida del perfil de marcadores de expresión de las células epiteliales: E-cadherina, factor de transcripción de tiroides-1, aquoporina-5, zonula ocludens-1 (ZO-1) y citoqueratinas, y la adquisición de la morfología mesenquimal asociada a la expresión de marcadores fibroblásticos: fibronectina, α -SMA, colágeno de tipo I y III, factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), vimentina y desmina (Kolahian et al., 2016).

Otra de las causas que puede conducir a la acumulación de miofibroblastos y que se ha descrito recientemente es la transición endotelial mesenquimal (TendM) (Wolters, Collard and Jones, 2014). En este caso, son las células endoteliales las que adquieren el fenotipo característico de célula mesenquimal activada.

Actualmente, se han postulado como posibles fuentes de miofibroblastos en FPI las células mesoteliales pleurales (PMCs) y los pericitos. La pleura es una fina membrana de células mesoteliales que recubre los pulmones. Las células que la constituyen, las PMCs, se han visto

implicadas en procesos migración y de transformación a miofibroblastos, tanto *in vitro* como *in vivo*, a través de un mecanismo dependiente de TGF- β 1 llamado transición mesotelial-mesenquimal (Bagnato and Harari, 2015). Del mismo modo, los pericitos, células derivadas del mesénquima localizadas en la membrana basal del revestimiento perivascular, están involucrados en la cicatrización y la producción de colágeno. Algunos estudios han demostrado que los pericitos son una fuente de miofibroblastos activados en una ruta de señalización mediada por TGF- β 1 (Hung et al., 2013). En consecuencia, ambos tipos celulares podrían tener un papel importante en la patogenia del daño pulmonar.

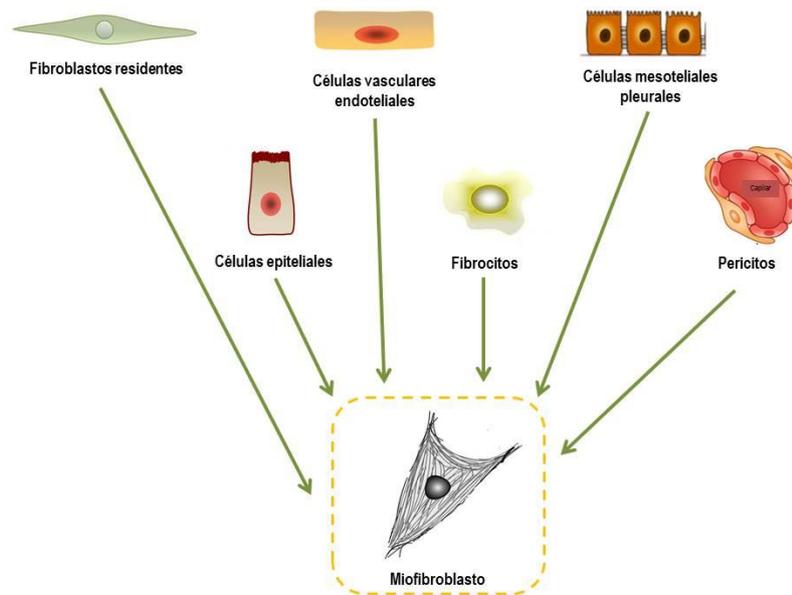


Figura 6: Origen de los miofibroblastos en fibrosis pulmonar idiopática.

1.1.5. Tratamiento

Actualmente no existe ningún tratamiento para la FPI que consiga revertir el avance de la enfermedad. Sin embargo, durante los últimos años, los esfuerzos en la búsqueda de tratamientos efectivos han ido evolucionando de forma simultánea al descubrimiento de las bases moleculares de la enfermedad.

En lo que respecta a los tratamientos destinados a tratar comorbilidades asociadas a la FPI, cabe destacar aquellos dirigidos a tratar la hipertensión pulmonar (HP), una de las principales condiciones comórbidas asociadas. Ésta se produce debido a las anomalías en la vasculatura pulmonar que produce la distorsión del parénquima y que conducen a la alteración de la producción de óxido nítrico, vasoconstricción pulmonar y alteración del intercambio gaseoso (Loomis-King, Flaherty and Moore, 2013). En el ensayo clínico STEP-FPI se trató a los pacientes con FPI severa con Sildenafil, un inhibidor de la fosfodiesterasa tipo 5 específica de GMP cíclico que potencia la producción de óxido nítrico y promueve la vasodilatación de la arteria pulmonar. Con este tratamiento se observó una mejora en la calidad de vida de los pacientes, posiblemente por medio de la disminución de la HP (Han et al., 2013). No obstante, el uso de este tipo de fármacos no está recomendado en FPI ya que pueden conducir a una disminución de la saturación de oxígeno. Del mismo modo, los antagonistas de los receptores

de endotelina-1 (ET-1), aunque eficaces en la HP, no han mostrado resultados positivos en la FPI debido a que producen una disminución severa en la saturación de oxígeno como resultado de su efecto vasodilatador. Esto ha sido demostrado en los ensayos con bosentan (BUILD-1, 2 y 3) (King et al., 2008), ambrisentan (ARTEMIS-IPF) (Raghu et al., 2013) y macicentan (ensayo MUSIC) (Raghu et al., 2013).

En referencia a los tratamientos propiamente antifibróticos, puesto que inicialmente la FPI era considerada una enfermedad inflamatoria crónica, muchos pacientes fueron tratados con terapias basadas en corticosteroides y/o otros agentes inmunomoduladores. Sin embargo, cualquier utilidad terapéutica de tratamiento “antiinflamatorio/ inmunomodulador” ha sido eliminada como consecuencia de los resultados del ensayo clínico llevado a cabo por el consorcio IPF-Net PANTHER, el cual evaluó la efectividad de una triple terapia combinando el corticosteroide prednisona, el inmunomodulador azatioprina y el antioxidante N-acetil L-cisteína (NAC), que se había usado tradicionalmente para enfermedades pulmonares intersticiales. Éste estudio tuvo que ser parado prematuramente en 2011, pues el uso de la terapia combinatoria condujo a un aumento de los ratios de muerte y hospitalización de los pacientes, además de no proporcionar ningún beneficio clínico. Este mismo ensayo continuó con la evaluación de la monoterapia con NAC, la cual tampoco aportó ningún beneficio significativo (Prednisone, Azathioprine, and N -Acetylcysteine for Pulmonary Fibrosis, 2012).

A pesar de éstos y otros numerosos ensayos clínicos fallidos, recientemente han sido aprobadas dos terapias específicas para FPI, pirfenidona y nintedanib, las cuales empiezan a transformar la FPI en una enfermedad tratable.

Por lo que respecta a la pirfenidona, ésta es una piridina con actividad antiinflamatoria, antifibrótica, antioxidante y con efectos antagonistas a los del TGF- β 1 (Raghu et al., 2011) mientras que, el nintedanib es un inhibidor de tirosina quinasa que se une competitivamente al sitio de unión a ATP de los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α), factor de crecimiento fibroblástico (FCFR) y del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR) causando el bloqueo de sus rutas de señalización intracelular (Richeldi et al., 2016). Los ensayos clínicos en los cuales se ha demostrado un efecto beneficioso en cuanto a la ralentización de la progresión de la enfermedad son los ensayos clínicos CAPACITY I y II (Noble et al., 2011) y ASCEND (King et al., 2014) para la pirfenidona, y TOMORROW (Richeldi et al., 2011), INPULSIS I y II (Richeldi et al., 2016) para nintedanib. Actualmente, con estos dos fármacos ya aprobados, se están reclutando pacientes para llevar a cabo ensayos clínicos con la finalidad de ensayar la seguridad y tolerabilidad de un tratamiento combinatorio con pirfenidona y nintedanib (Ogura et al., 2014).

Pese a la existencia de terapias aprobadas para el tratamiento de la FPI, todavía no se ha conseguido mejorar la supervivencia de los pacientes. Por ello, actualmente se siguen investigando posibles dianas terapéuticas, entre las que se encuentran un anticuerpo contra CTGF (Ref.FG3019) y un antagonista del receptor de la interleucina 13 (IL-13) (Ref.QAX576), que limitan la activación de los fibroblastos. También están en ensayo clínico terapias contra la proteína 1 quimioattractante de monocitos al pulmón (CCL2, ref. CNTO888) y una terapia contra la integrina α v β 6 (Ref. STX-100), implicada en la activación de TGF- β 1 (Loomis-King, Flaherty and Moore, 2013).

1.2. Factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) como principal factor profibrótico

1.2.1. Activación y función celular

El factor de crecimiento transformante β es una citoquina multifuncional con la capacidad de modular el crecimiento celular, inflamación, síntesis de matriz extracelular y apoptosis, teniendo un papel importante en numerosos procesos biológicos como la embriogénesis, la cicatrización y reparación tisular (Annes, 2003). Dicho factor se secreta generalmente por las células del parénquima y por células inflamatorias como monocitos, linfocitos, y plaquetas (Branton and Kopp, 1999).

Existen 3 isoformas de TGF- β , pero la 1 (TGF- β 1) es la que presenta un mayor efecto profibrótico (Piera-Velazquez, Mendoza and Jimenez, 2016), razón por la cual en distintas patologías, las cantidades aumentadas de esta citoquina contribuyen al exceso de tejido fibrótico (Branton and Kopp, 1999).

TGF- β 1 se sintetiza en su forma precursora como una proteína homodimérica (Annes, 2003), unida a un péptido asociado a latencia (LAP) en el extremo N-terminal. Éste a su vez interactúa con la proteína de unión a TGF- β 1 latente (LTBP1), formando un complejo que mantiene a TGF- β 1 anclado a la matriz extracelular e inactivo, impidiendo la interacción con los receptores serina treonina quinasa TGFRI y TGFRII (Figura 7). TGF- β 1 se activa cuando el complejo latente es escindido por proteasas como la plasmina o metaloproteinasas de matriz 2 y 9 (Meng, Nikolic-Paterson and Lan, 2016). En el caso del pulmón, esta activación se produce gracias a la integrina α v β 6, que está normalmente expresada a bajos niveles en los epitelios, pero se induce en los procesos de inflamación y cicatrización (LEASK, 2004), reconoce la secuencia tripeptídica de arginina, glicina y ácido aspártico (RGD) de TGF- β 1 y lo libera del complejo LAP-LTBP1 (Puthawala et al., 2008). Una vez activo, el factor de crecimiento transformante β 1 se une al receptor serina treonina quinasa de tipo II, que se fosforila y activa para formar un complejo heterodimérico con el receptor de tipo I, activándolo a su vez. La unión de ambos receptores induce la activación de sus rutas de señalización asociadas.

1.2.2. Vías de señalización celular

La activación de la ruta de TGF- β 1 por la unión de dicho factor a los receptores serina treonina quinasa de tipo I y II en la superficie celular, inicia rutas de señalización dependientes e independientes de las proteínas mediadoras de señal Smads, con la finalidad de regular la expresión génica (Li et al., 2015). En la ruta dependiente de Smads (figura 7), el receptor TGFRI activo fosforila a Smad2 y Smad3, que forman un complejo con Smad4 y se translocan al núcleo. De entre los componentes de este complejo, Smad3 es capaz de unirse a promotores génicos, en las secuencias denominadas “elementos de unión de Smad” (SBE) para inducir la transcripción de moléculas profibróticas como α -SMA, colágeno I y CTGF. Esta ruta también induce el proceso de TEM mediante la activación de factores de transcripción como SNAIL, SLUG, dando lugar a la activación de los miofibroblastos (Ponnusamy et al., 2013).

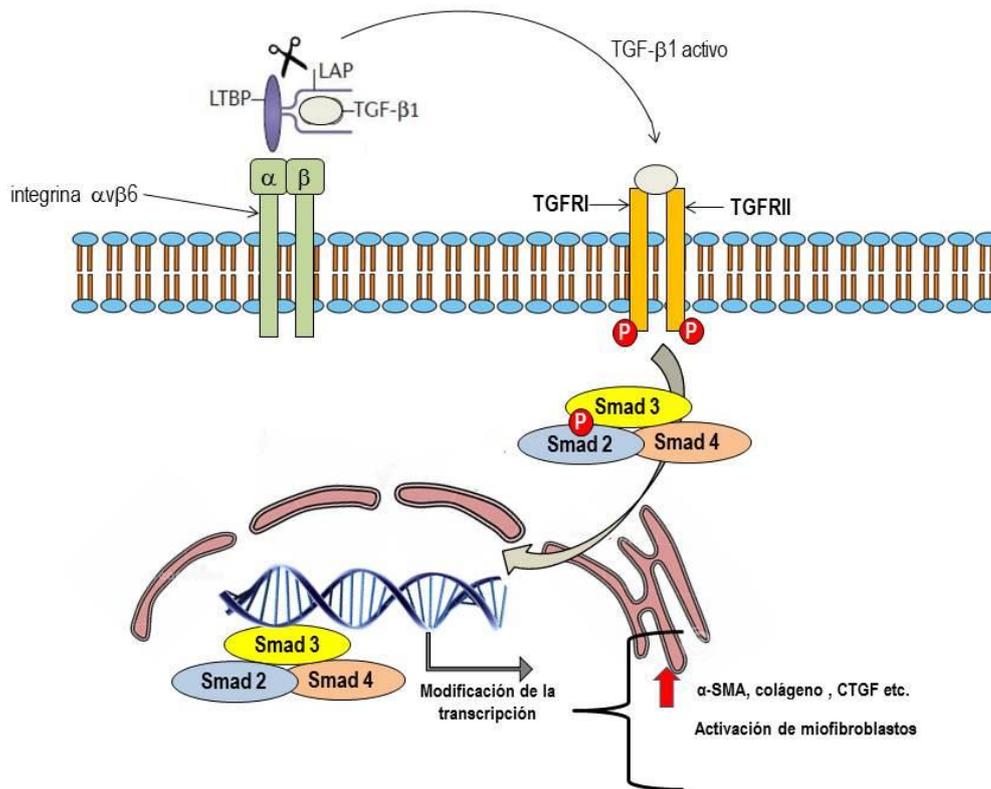


Figura 7: Activación y señalización profibrótica del factor de crecimiento transformante $\beta 1$.

1.3. Marcadores moleculares en Fibrosis Pulmonar Idiopática

Actualmente, el aumento de la incidencia de la FPI a nivel mundial, pone de manifiesto la necesidad de desarrollar marcadores que permitan tanto el diagnóstico, como el manejo de la enfermedad. Los avances en la investigación han permitido detectar distintas moléculas que se ven aumentadas en las EPIs, sin embargo, el principal desafío reside en encontrar un panel de marcadores que permita diferenciar de forma fiable la FPI con respecto al resto de EPIs.

Entre los marcadores más destacados en la FPI, aunque también compartidos con otras EPIs, se encuentran las proteínas surfactantes A y D (PS-A y PS-D), lipoproteínas sintetizadas por las células epiteliales alveolares de tipo II que reducen la tensión superficial en los alveolos; las MMP1 y MMP7, endopeptidasas implicadas en el remodelado de la matriz extracelular, y el ligando de la quimiocina 18 (CCL18), expresada por los macrófagos alveolares para reclutar linfocitos y células dendríticas al sitio de la inflamación (Kass, Flynn and Baker, 2015). No obstante, estas moléculas, aunque aumentadas en el plasma de los pacientes con FPI, se encuentran limitadas para el diagnóstico y solo pueden proporcionar información acerca del pronóstico (Raghu et al., 2011).

Por otra parte, MUC1 también está presente en las EPIs, de hecho, uno de los biomarcadores más fiables para estas patologías es la glicoproteína *krebs von den lungen-6* (KL6). KL6 se expresa por las células epiteliales alveolares de tipo II y forma parte de la región extracelular de MUC1, liberándose al fluido de revestimiento epitelial como resultado de la escisión enzimática por parte del enzima convertidor de TNF- α (TACE) (Ishikawa et al., 2012). KL6 es detectable

en el suero de los pacientes con FPI, y aunque no se conoce su papel patofisiológico, muchos estudios demuestran que promueve la quimiotaxis de los fibroblastos humanos, acelera su proliferación e inhibe la apoptosis, teniendo un efecto proliferativo comparable con el de TGF- β 1 (Ohshimo et al., 2005). Sin embargo, actualmente todavía no hay información en cuanto a biomarcadores de diagnóstico en práctica clínica en Europa, pues no se ha identificado ninguno que sea estrictamente específico de FPI. En el caso de Japón, se emplean los niveles séricos de KL6, PS-A y PS-D combinados como biomarcadores útiles para el diagnóstico y pronóstico de las EPIs (Huang, 2013).

1.4. MUC1

1.4.1. Estructura y localización celular

La homeóstasis de la función respiratoria depende de que las superficies luminales de las vías aéreas de conducción sean capaces de protegerse frente a las amenazas externas a las que están continuamente expuestas (Whitsett and Alenghat, 2014). En esta prevención del acceso de los patógenos a las células epiteliales de las vías respiratorias, las mucinas juegan un papel muy importante actuando a modo de barrera.

Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular cuyas funciones principales son cubrir, lubricar y proteger las superficies epiteliales (Bafna, Kaur and Batra, 2010). En función de su localización subcelular pueden ser proteínas secretadas al espacio extracelular o proteínas transmembrana, que pueden liberarse de la membrana plasmática mediante escisión enzimática (Senapati, Das and Batra, 2010). MUC1 se clasifica como una mucina transmembrana y se expresa principalmente en las células epiteliales alveolares en los pulmones y en los epitelios de otros órganos secretores como esófago, glándulas mamarias, estómago, duodeno, páncreas, útero y próstata (Gendler, 2001).

La estructura de las mucinas se caracteriza por una serie de dominios que les permiten formar interacciones específicas con otras proteínas, activando por tanto distintas rutas de señalización que modulan el crecimiento, proliferación, muerte y autofagia (Bafna, Kaur and Batra, 2010). Concretamente MUC1 es un heterodímero compuesto por dos subunidades, la N terminal y la C terminal (Nath and Mukherjee, 2014). La subunidad N terminal consta de un dominio extracelular de 20 aminoácidos que se caracteriza por tener repeticiones en tándem de número variable (VNTR). Las repeticiones de esta región son ricas en serina treonina y prolina, por lo que la convierten en una subunidad propensa a la glicosilación, razón por la cual está altamente glicosilada (Zhang et al., 2014). Por otra parte, la región C terminal contiene una zona extracelular corta, un dominio transmembrana, y una cola citoplasmática de 72 aminoácidos (Gnemmi et al., 2014) (Figura 8). La cola citoplasmática de MUC1 contiene residuos altamente conservados de tirosina, serina y treonina que son fosforilados y sirven como sitios de unión para distintas proteínas. (Nath and Mukherjee, 2014).

impidiendo su degradación. Esto permite que viaje al núcleo, donde actúa como un coactivador transcripcional, activando rutas que reprimen la expresión de E-cadherina y aumentando la expresión de inductores de la TEM como SNAIL, SLUG y vimentina (Wen et al., 2003). Esta tendencia se ha observado también en líneas celulares de carcinoma renal (Gnemmi et al., 2014), por tanto, como consecuencia de la sobreexpresión de MUC1, las adhesiones celulares se desestabilizan, se reducen los contactos entre las células epiteliales y se facilita la invasión de las membranas basales. Sin embargo, MUC1 no solo participa en estas rutas, sino que se le ha relacionado también con vías de señalización como PI3K/AKT y se ha visto que interacciona con proteínas como c-Src, Grb2/Sos, p53, GSK3 β y NF- κ B (Li et al., 2015). Por lo que se puede afirmar de forma general que la sobreexpresión de MUC1 se asocia con una disminución de la transcripción de genes de arresto de crecimiento celular y una disminución de la transcripción de genes apoptóticos (Bafna, Kaur and Batra, 2010).

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el estudio de la importancia y función de MUC1 a nivel intracelular en la FPI. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Estudio del efecto de TGF- β 1, como principal factor fibrótico, en la activación de MUC1-Ct.
- Estudio de la participación de MUC1 en los procesos de remodelado de tejido mediados por TGF- β 1 y característicos de la FPI.
- Estudio de la implicación directa de MUC1-Ct en la vía de señalización de TGF- β 1 dependiente de Smad.
- Estudio del efecto *in vitro* de la pirfenidona (fármaco actualmente aprobado en FPI) sobre las vías de transducción de señal características de FPI en las que está implicado MUC1-Ct.

3. Material y métodos

3.1. Experimento de silenciamiento de *MUC1* en células epiteliales alveolares tipo II y fibroblastos

Para llevar a cabo esta técnica, se transfectaron células epiteliales alveolares tipo II (línea celular humana A549. Ref.86012804 Sigma-Aldrich Química, S.L. Madrid) y fibroblastos (línea celular humana MRC5. Ref. CCL-171, ATCC, Francia) con sondas de ARN de silenciamiento (siRNA) complementarias al gen *MUC1*. El siRNA para el gen *MUC1* (siRNA-*MUC1*) (Ref. 4392420), así como el siRNA control negativo inespecífico (siRNA(-)) (Ref. AM4611) fueron obtenidos de Ambion (Huntingdon, Cambridge, Reino Unido).

El agente de transfección empleado fue lipofectamina-2000 (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) a una concentración final de 2 µg/ml, y con una concentración de sondas de siRNA de 50µM, en medio Opti-MEM (1X) (Ref. 11058-021, Gibco®-Life Technologies), medio libre de suero y antibióticos. Tras un período de 6 horas, el medio fue reemplazado con nuevo medio DMEM (medio esencial mínimo de Dulbecco. Ref.12-604F. Lonza, Suiza) suplementado con 10% de SFB y libre de antibióticos durante 48 horas.

3.2. Western blot

Esta técnica se empleó, en primer lugar, para determinar si TGF-β1 ejerce un efecto activador sobre *MUC1* a través de la fosforilación de su dominio citoplasmático, para lo cual, se estimularon las líneas celulares A549 y MRC5 con TGF-β1 (10 ng/ml) (Ref. T7039, Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) durante 40 minutos siendo previamente tratadas o no con pirfenidona (200 µM) (Ref. P2116. Sigma-Aldrich Química, S.L. Madrid) durante media hora. Por otra parte, la técnica también se empleó para detectar cambios en la expresión proteica entre las distintas condiciones ensayadas en las líneas celulares A549 y MRC5 con silenciamiento de *MUC1*. En este caso, las células silenciadas se estimularon 48 h tras la transfección con TGF-β1 a una concentración de 10 ng/ml durante 48 horas, habiendo sido tratadas previamente en presencia o ausencia de pirfenidona durante media hora a una concentración de 200 µM.

Posteriormente, se realizó el aislamiento de la proteína en ambos casos. Para ello, las células fueron desprendidas con la ayuda de una espátula a partir de un frasco confluyente de 25 cm² con ayuda del tampón de extracción, conteniendo 1ml HEPES 1M, 5ml NaCl 4M, 100µl EDTA 0,5M, 500µl EGTA 0,1M, 12,6 ml Glicerol 99,5% y 30,8 ml H2O MilliQ; inhibidor de proteasas y PMSF (fluoruro de fenil metil sulfonilo). A continuación, se llevó a cabo la lisis celular tras sucesivos ciclos de choque térmico y tratamiento con el detergente Nonidet P-40 (NP40 Ref. 21-3277 Sigma-Aldrich Química, S.L. Madrid) al 10% durante 15 minutos en hielo.

Para cuantificar el nivel de proteína en cada una de las muestras se utilizó el kit de ensayo BCA (BCA Protein Assay kit. Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EEUU), con albúmina de suero bovino como estándar. Con estos resultados se calcularon los volúmenes necesarios para poder añadir en el gel de electroforesis la misma cantidad de proteína para todas las muestras.

Mediante electroforesis en gel de sodio-dodecil-sulfato poliacrilamida se separaron las proteínas según su peso molecular. Para ello, en dicho gel se añadieron 20 µg de proteína así como un marcador de peso molecular Bio-Rad Kaleidoscope marker (Bio-Rad Laboratories Ltd., Herts, Reino Unido), ambos previamente desnaturalizados mediante choque térmico de

95°C durante 10 minutos y en presencia del tampón de carga, el cual contiene dodecilsulfato sódico (SDS), que desnaturaliza las proteínas, y β -mercaptoetanol, que rompe los puentes disulfuro. El gel de poliacrilamida consistió en un *stacking* gel al 5% de acrilamida sobre un gel de resolución al 10% para el caso de las proteínas Smad3, p-Smad3, ERK, p-ERK $\frac{1}{2}$ y α -SMA, al 15% para MUC1 y al 6% para P-T1224 MUC1, P-Y1229 MUC1, E-cadherina, Colágeno tipo I y β -catenina, y se le aplicó una corriente de 150 V durante 1 hora aproximadamente. Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) mediante transferencia húmeda. La membrana se bloqueó durante dos horas con la solución de bloqueo 5% BSA en PBS 0.1% Tween20 y posteriormente se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios (1:1000).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron, MUC1 (anticuerpo policlonal ref.NBP1-60046, Novus Biologicals, EEUU), P-T1224 MUC1 (anticuerpo policlonal ref.ab79226, Abcam, Inglaterra), P-Y1229 MUC1 (anticuerpo policlonal ref.ab79226, Abcam, Inglaterra), α -SMA (anticuerpo monoclonal ref. A5228, Sigma – Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU), β -catenina (anticuerpo policlonal ref. NBP1-89989, Novus Biologicals, EEUU), colágeno tipo I (anticuerpo policlonal ref. PA1-26204, Affinity BioReagents, Golden, EEUU), E-cadherina (anticuerpo policlonal ref. 610181, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica), Smad3 (anticuerpo policlonal ref. NBP1-19495, Novus Biologicals, EEUU), p-Smad3 (anticuerpo policlonal ref. NBP1-77836, Novus Biologicals, EEUU), ERK $\frac{1}{2}$ (anticuerpo monoclonal ref. SAB1305560, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU) y p-ERK $\frac{1}{2}$ (anticuerpo monoclonal ref. M9692, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU)

Las proteínas marcadas se detectaron a partir de la emisión de quimioluminiscencia que tiene lugar como consecuencia de la reacción del sustrato del kit ECL plus (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) con los anticuerpos secundarios (1:1000) conjugados con peroxidasa de rabano (HRP). Los anticuerpos secundarios empleados en este caso fueron *donkey anti-mouse* (ThermoFisher Scientific, Rockford, EEUU) y *donkey anti-rabbit* (ThermoFisher Scientific, Rockford, EEUU). La señal obtenida se normalizó respecto al anticuerpo *mouse anti-human* β -actina (1:1000) (anticuerpo monoclonal ref. A1978, Sigma – Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU).

3.3. Transcripción Inversa (RT) y Real Time-PCR

Esta técnica se empleó para determinar las diferencias de expresión a nivel de RNA entre las distintas condiciones realizadas en A549 y MRC5, condiciones mencionadas en el anterior subapartado.

Para la extracción de ARN se empleó el kit TriPure® (Roche, Indianapolis, EEUU). La pureza del ARN extraído y la concentración se confirmaron con un espectofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific. Wilmington,USA)

La transcripción inversa se realizó a partir de 300 ng del ARN total con el kit TaqMan reverse transcription reagents (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, EEUU). El cDNA obtenido se amplificó con cebadores específicos prediseñados por Applied Biosystems para distintos marcadores: MUC1 (ref. Hs00159357_m1), α -SMA (ref. Hs00426835_g1), Colágeno tipo I (ref. Hs01028969_m1), y E-Cadherina (ref.Hs00170423_m1), y con los cebadores diseñados por Sigma-Aldrich Química, S.L a partir de la secuencia encargada de SLUG y SNAIL, en un Sistema de PCR a tiempo real 7900HT (Applied Biosystems) usando el

Universal Master Mix (Applied Biosystems). La cuantificación relativa de estos transcritos fue determinada con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ empleando GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) como control interno (ref. 4352339E, Applied Biosystems).

3.4. Monitorización de la actividad de la vía de señalización TGF- β 1/Smad en A549 mediante “*Smad binding element reporter kit (SBE)*”

Con este ensayo se monitorizó la ruta de señalización de TGF- β 1/Smad en la línea celular A549. El kit SBE reporter (BPS Biosciences, San Diego, CA, EEUU) contiene la combinación de un vector reportero constituido por el gen de la luciferasa de luciérnaga (firefly) bajo el control de un promotor inducible por la activación de la ruta de señalización TGF- β 1/Smad, con el vector de la luciferasa de *Renilla*, el cual se expresa constitutivamente y por tanto se emplea como control interno. Además, el kit también incluye como control negativo la combinación de un vector con el gen de la luciferasa de luciérnaga no inducible y el vector de la luciferasa de *Renilla*.

En primer lugar se llevó a cabo el silenciamiento del gen *MUC1* en la línea celular A549 con el método anteriormente comentado. En este caso, 24 h tras efectuar el silenciamiento se llevó a cabo la transfección de las células con los correspondientes vectores del kit SBE reporter siguiendo el mismo procedimiento que el empleado para la técnica de silenciamiento. La cantidad de vector añadida en cada una de las condiciones fue de 1 μ g de ADN. 24 horas tras la transfección se cambió el medio por DMEM suplementado con 0,5% SFB. En este momento las células fueron tratadas con pirfenidona (200 μ M) durante 30 minutos y se estimularon posteriormente con TGF- β 1 (10 ng/ml) durante 24h.

Transcurridas las 24h de incubación, las células fueron lisadas con el Passive lysis buffer 1X (Promega) para poder así liberar el contenido celular y analizar mediante el kit Steady-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA) la luminiscencia de cada una de las muestras en el luminómetro (Wallac Victor². Ref. 1420-012. Perkin Elmer. EEUU). Los resultados de luminiscencia fueron expresados tras haber eliminado el posible *background* detectado y calculando posteriormente el ratio luminiscencia de luciérnaga/ luminiscencia de *Renilla*.

3.5. Co- Inmunofluorescencia en A549 de MUC1 y p-Smad2/3

La co-inmunofluorescencia se llevó a cabo en la línea celular A549, estimulada con TGF- β 1 (10ng/ml) durante 2 horas, tras haber sido tratadas o no previamente con pirfenidona (200 μ M) durante media hora.

Transcurridas las dos horas de estímulo, en primer lugar las células fueron fijadas con 4% de paraformaldehído a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se permeabilizaron con Triton 100 al 0,1% en PBS durante 10 minutos, se bloquearon con SFB al 10% en PBS durante 30 minutos, y se incubaron con los anticuerpos primarios (1:100) durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios empleados fueron *rabbit anti-human* MUC1 (anticuerpo policlonal ref.NBP1-60046, Novus Biologicals, EEUU), *goat anti-human* p-Smad2/3 (anticuerpo policlonal ref. sc-11769, Santa Cruz Biotechnology, Europa). Seguidamente las muestras se marcaron con anticuerpos secundarios *anti-rabbit* Alexa fluor 555 (anticuerpo policlonal ref. A-21429, Thermo Fisher Scientific. Rockford, EEUU) y *anti-goat*

Alexa fluor 488 (anticuerpo policlonal ref. A-11055, Thermo Fisher Scientific. Rockford, EEUU ref life technologies) durante 1 hora en oscuridad. Los núcleos fueron marcados con DAPI en dilución 1:1000. Finalmente los resultados se visualizaron en el microscopio de fluorescencia invertido Nikon eclipse TE200.

3.6. Co-Inmunoprecipitación en A549 de MUC1 y p-Smad2/3

El experimento se realizó en la línea celular epitelial alveolar A549 con la finalidad de detectar la posible interacción entre las proteínas MUC1 y p-Smad2/3. Las células fueron tratadas en presencia o ausencia de pirfenidona (200 μ M) durante media hora y posteriormente estimuladas con TGF- β 1 (10ng/ml) durante 40 minutos.

El aislamiento y cuantificación de proteína total se realizó mediante el mismo procedimiento descrito anteriormente y a continuación, se llevó a cabo la inmunoprecipitación de 20 μ g de proteína total. Para ello, se incubaron las muestras con anticuerpo en exceso durante 1 hora a 4 $^{\circ}$ C y en agitación. El anticuerpo empleado fue MUC1 (anticuerpo policlonal ref.NBP1-60046, Novus Biologicals, EEUU) a una dilución 1:10. Los anticuerpos unidos a la proteína de interés se capturaron con partículas de sefarosa tapizadas con proteína G de la cepa *Streptococcus* G-148 (Ref. P3296, Sigma-Aldrich Química, S.L.), capaz de reconocer la fracción constante de los anticuerpos previamente unidos a nuestra muestra. La proporción de sefarosa empleada fue de 1 μ l por μ g de proteína, y se incubó durante toda la noche a 4 $^{\circ}$ C y en agitación. Tras la incubación se resuspendió la mezcla en tampón de lavado conteniendo 0,31 g Tris-Cl 20mM, 0,58 g NaCl 100mM, 0,03g EDTA 1 mM, 100 μ l Igepal CA-630 0,1% y 100 μ l H₂O MilliQ y se incubó posteriormente en hielo durante 5 minutos para conseguir así la sedimentación de la sefarosa. Este proceso se repitió 5 veces para recuperar la sefarosa unida al anticuerpo y a la proteína. Posteriormente, el anticuerpo y la proteína se eluyeron de la sefarosa mediante la adición del tampón de carga del *western blot*, durante 5 minutos a 95 $^{\circ}$ C. Por último, se centrifugó para recuperar el sobrenadante conteniendo las proteínas liberadas de la sefarosa.

Una vez inmunoprecipitada la proteína, se realizó la técnica de *Western Blot* como se ha descrito anteriormente. En este caso se cargaron 20 μ l de muestra por pocillo y el anticuerpo empleado en este caso fue p-Smad2/3 (anticuerpo policlonal ref. sc-11769, Santa Cruz Biotechnology, Europa) (dilución 1:1000) y el anticuerpo secundario empleado fue *rabbit anti-goat* (anticuerpo policlonal ref. F7367, Sigma-Aldrich Química, S.L., Madrid).

3.7. Análisis estadístico

Los datos fueron presentados como la media \pm error estándar de la media (SEM) de los n experimentos. El análisis estadístico de los datos fue llevado a cabo por análisis de la varianza (ANOVA) seguido por el test de Bonferroni cuando se compararon más de 2 grupos. En el caso de comparar diferencias entre dos grupos se utilizó el análisis τ - student (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EEUU.). La significancia fue aceptada cuando $p < 0.05$.

4. Resultados y discusión

4.1. Expresión de MUC1-Ct en pacientes FPI (estudios realizados previamente)

Como se ha mencionado anteriormente, TGF- β 1 juega un papel muy importante en la fisiopatología de la FPI como principal factor profibrótico. Además, como ya se ha comentado previamente, los niveles de expresión de la fracción extracelular de MUC1 (KL-6), se ven incrementados en la FPI, pero no solo eso sino que análisis previos de expresión génica (figura 9A) y proteica (figura 9B) en sujetos control y pacientes FPI, realizados en nuestro laboratorio, aunque todavía no publicados, indican que los niveles de expresión de la fracción C-terminal de MUC1 se ven también significativamente incrementados ($p < 0,05$) en pacientes FPI con respecto a sujetos control (Figura 9).

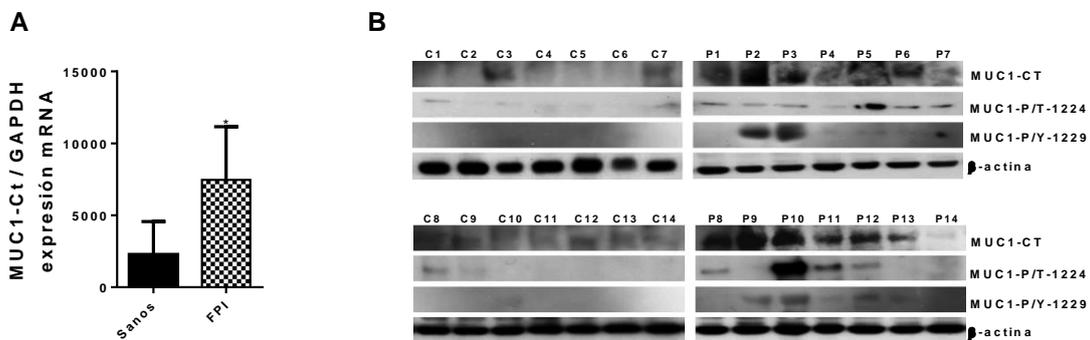


Figura 9: Expresión de MUC1-Ct en sujetos control (n=14) y pacientes FPI (n=14) a nivel de expresión génica (A) y proteica (B).

A: niveles de expresión de mRNA de MUC1-Ct determinados mediante RT-PCR. Los datos se muestran expresados como el ratio de expresión de MUC1-Ct respecto a los niveles de expresión de GAPDH. La representación de los datos se corresponde con la media \pm SEM de n=14. (* $p < 0,05$ respecto control).

B: análisis *Western Blot* de la expresión proteica de MUC1-Ct. Los niveles de expresión de β -actina se emplean como control endógeno.

4.2. Activación *in vitro* de MUC1-Ct mediada por TGF- β 1 a nivel de células epiteliales y fibroblastos

Teniendo en cuenta lo anteriormente comentado, se trató de evaluar la posible relación entre TGF- β 1 y MUC1. Para ello, se estudió mediante *western blot* el efecto de TGF- β 1 sobre la activación de MUC1, basándose en el estudio de los niveles de expresión de dos formas fosforiladas (y en consecuencia activadas) de MUC1, tras la estimulación con TGF- β 1 de los cultivos de células epiteliales alveolares (A549) y fibroblastos (MRC5) durante 40 minutos. Como se puede observar en la figura 10, partiendo de niveles de expresión de MUC1 muy similares para todas las condiciones, en ambas líneas celulares la presencia del factor profibrótico produjo un aumento en la expresión de MUC1 fosforilado en la treonina en posición 1224 del fragmento C-terminal, con respecto a la situación control. Sin embargo, en presencia de pirfenidona el aumento de la expresión se dio, pero de forma menos pronunciada. Por el contrario, no se observó apenas variación en la expresión de MUC1 fosforilado en el aminoácido tirosina en la posición 1229.

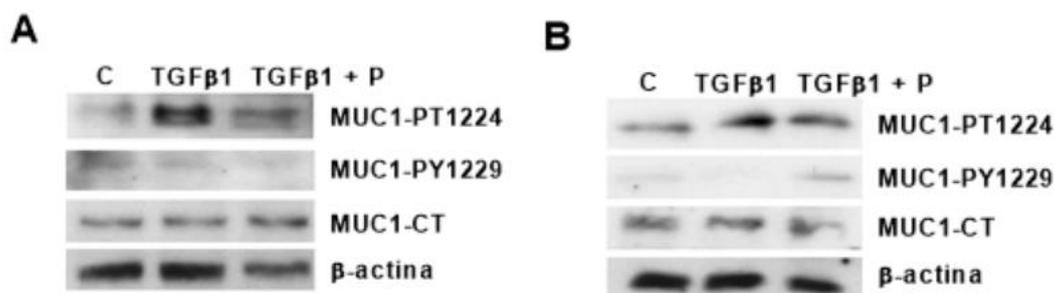


Figura 10: Activación *in vitro* de MUC1-Ct mediada por la estimulación con TGF- β 1 de células epiteliales alveolares tipo II (A549) (A) y fibroblastos (MRC5) (B).

Análisis *Western Blot* de la expresión proteica de MUC1-Ct y dos formas fosforiladas de MUC1-Ct: MUC1-PT1224 y MUC1-PY1229 en A549 (A) y MRC5 (B). Los niveles de expresión de β -actina se emplean como control endógeno.

Con estos resultados, se pudo plantear la hipótesis inicial de que TGF- β 1, a través de su vía de señalización, participa en la activación de MUC1-Ct (figura 15), al menos a nivel de la fosforilación en una posición específica de la región C-terminal (T1224). No obstante, MUC1 presenta otras distintas fosforilaciones y por tanto formas activadas, como por ejemplo la fosforilación en la posición Y1229 estudiada, que no participan seguramente en la vía de señalización de TGF- β 1, sino probablemente en cualquier otra de las múltiples vías de transducción de señal en las que MUC1 se ve implicada.

4.3. Participación de MUC1 en la fisiopatología de la FPI a nivel intracelular de células epiteliales y fibroblastos.

El silenciamiento de MUC1 en las líneas celulares comentadas anteriormente, se empleó con la finalidad de determinar el posible efecto de dicha proteína en la patogenia de la FPI. Para ello, tras la estimulación de los cultivos celulares con TGF- β 1, se realizaron las técnicas de *western blot* y PCR para detectar variaciones en la expresión de distintos marcadores de fibrosis en condiciones de presencia y ausencia de MUC1.

En los resultados obtenidos a partir del *western blot* y de la RT-PCR en las líneas A549 y MRC5, se pudo observar (figuras 11 y 12), que para el marcador de miofibroblastos activados (α -SMA), tanto como para el marcador de matriz extracelular colágeno tipo 1, hubo un aumento de la expresión génica y proteica con respecto a la condición control, tras la estimulación con TGF- β 1, no siendo tan pronunciado generalmente dicho aumento cuando las células habían sido previamente tratadas con pirfenidona. Por el contrario, cuando se ensayaron las mismas condiciones en ausencia de MUC1, los niveles de expresión proteica observados fueron muy similares en las tres condiciones ensayadas y los niveles de expresión génica, aunque sí que sufrieron generalmente un incremento con respecto a la situación control, tras la estimulación con TGF- β 1, éste incremento fue a simple vista inferior que en caso de presencia de MUC1. Para el caso de una estimulación previa con pirfenidona, de nuevo los incrementos

en la expresión génica con respecto a la situación control fueron generalmente menores a los alcanzados en ausencia de pirfenidona.

Simultáneamente, se evaluaron los cambios en la expresión del marcador epitelial E-cadherina en la línea celular A549 (Figura 11A y 11B): los resultados tanto a nivel de proteína como de mRNA en presencia de MUC1, demostraron una disminución en la expresión de E-cadherina en la condición profibrótica, indicando una pérdida de la polarización celular. En este caso, el tratamiento con pirfenidona consiguió revertir en gran parte la pérdida de polarización celular que se produce en condiciones de FPI. Coincidiendo con los resultados comentados previamente, cuando el gen *MUC1* se silenció, no se observaron variaciones detectables en la expresión proteica entre las tres condiciones ensayadas y, los niveles de expresión génica disminuyeron de una forma mucho menos acusada que en presencia de MUC1. La pirfenidona en estas condiciones no fue capaz de revertir la ligera disminución en la expresión de E-cadherina causada por TGF- β 1.

Por otra parte, tanto en la línea celular de fibroblastos como en la de epiteliales alveolares (Figuras 11A y 12A) la forma activa de la proteína Smad3, es decir, su forma fosforilada, aumentó su expresión en presencia de TGF- β 1 con respecto a la condición control, teniendo un aumento más moderado en el caso del pre-tratamiento con pirfenidona. En contraposición, en la condición en la que se silenció *MUC1*, se observaron niveles de expresión proteica muy similares en las tres condiciones ensayadas. También, en ambas líneas celulares, la expresión de β -catenina, proteína implicada en la adhesión celular y la transcripción génica de genes implicados en la FPI, experimentó un aumento tras la acción de TGF- β 1, aumento en parte revertido en caso de tratamiento con pirfenidona. De nuevo, en las condiciones de *MUC1* silenciado, no hubo una diferencia evidente en los niveles de expresión de β -catenina, siendo la misma para las tres condiciones ensayadas.

En el caso de la proteína ERK $\frac{1}{2}$ (Figuras 11A y 12A), marcador de proliferación celular, los niveles de expresión de su forma activa p-ERK $\frac{1}{2}$ aumentaron en ambas líneas celulares en presencia de TGF- β 1, mostrando esta misma variación pero mucho más ligera, en la condición con silenciamiento de *MUC1*. Además, para este marcador, en ninguna de las dos condiciones ensayadas, la pirfenidona fue capaz de revertir a penas el incremento de expresión generado por TGF- β 1, siendo los niveles de expresión similares a los de la condición fibrótica.

Por último, se analizó la expresión a nivel de mRNA de dos factores de transcripción implicados en la FPI: SNAIL y SLUG. En la línea celular A549 (Figura 11B), la expresión génica aumentó de una manera muy notable en presencia de TGF- β 1, con respecto a la situación control. En este caso, la pirfenidona fue capaz de revertir en gran parte este incremento de expresión debido a la estimulación con TGF- β 1. En condiciones de silenciamiento de MUC1, la tendencia observada en lo que refiere a la expresión génica fue la misma que en presencia de MUC1, pero en este caso se alcanzaron niveles de expresión de ambos factores de transcripción bastante inferiores. No obstante, para la línea celular MRC5 (Figura 12B), aunque la respuesta en los niveles de expresión de SNAIL fue similar a la observada en la línea celular epitelial, para el caso concreto de SLUG los resultados obtenidos fueron más bien contrarios, observándose tanto en presencia como en ausencia de MUC1 una ligera disminución en la expresión de SLUG en presencia de TGF- β 1.

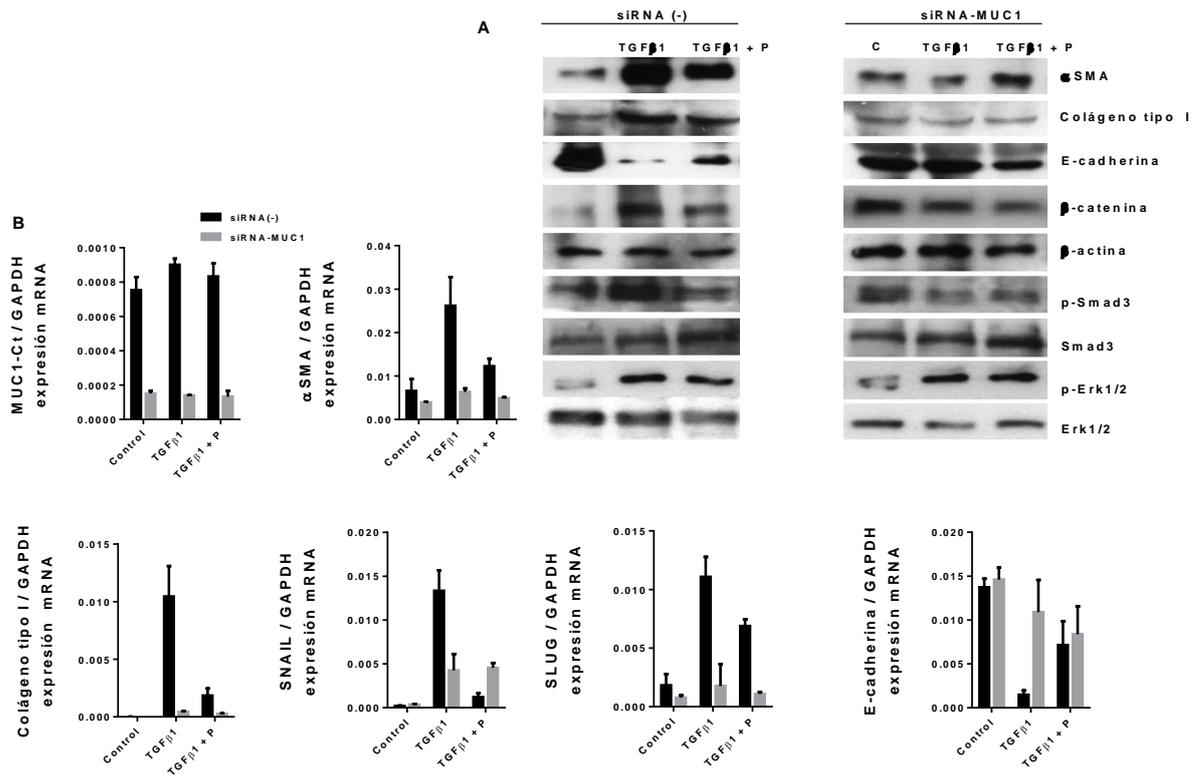


Figura 11: Participación *in vitro* de MUC1-Ct en los procesos celulares de FPI inducidos por TGF-β1 en células epiteliales alveolares tipo II (A549).

A: análisis *Western Blot* de la expresión proteica de distintos marcadores mesenquimales (Colágeno tipo I y α-SMA), marcadores epiteliales (E-Cadherina), factores de transcripción (smad 3 y p-Smad3), MAP quinazas (Erk ½ y p-Erk ½) y β-catenina. Los niveles de expresión de β-actina se emplean como control endógeno en el caso de Colágeno tipo I, α-SMA, β-catenina y E-cadherina. Para los casos de p-Erk ½ y p-Smad3 se emplea sus correspondientes formas no fosforiladas como control endógeno.

B: niveles de expresión de mRNA de MUC1-Ct, marcadores mesenquimales (Colágeno tipo I y α-SMA), marcadores epiteliales (E-Cadherina), y factores de transcripción (SLUG y SNAIL) determinados mediante RT-PCR. Los datos se muestran expresados como el ratio de expresión del gen en cuestión respecto a los niveles de expresión de GAPDH. La representación de los datos se corresponde con la media ± SEM de n=3 por cada una de las condiciones.

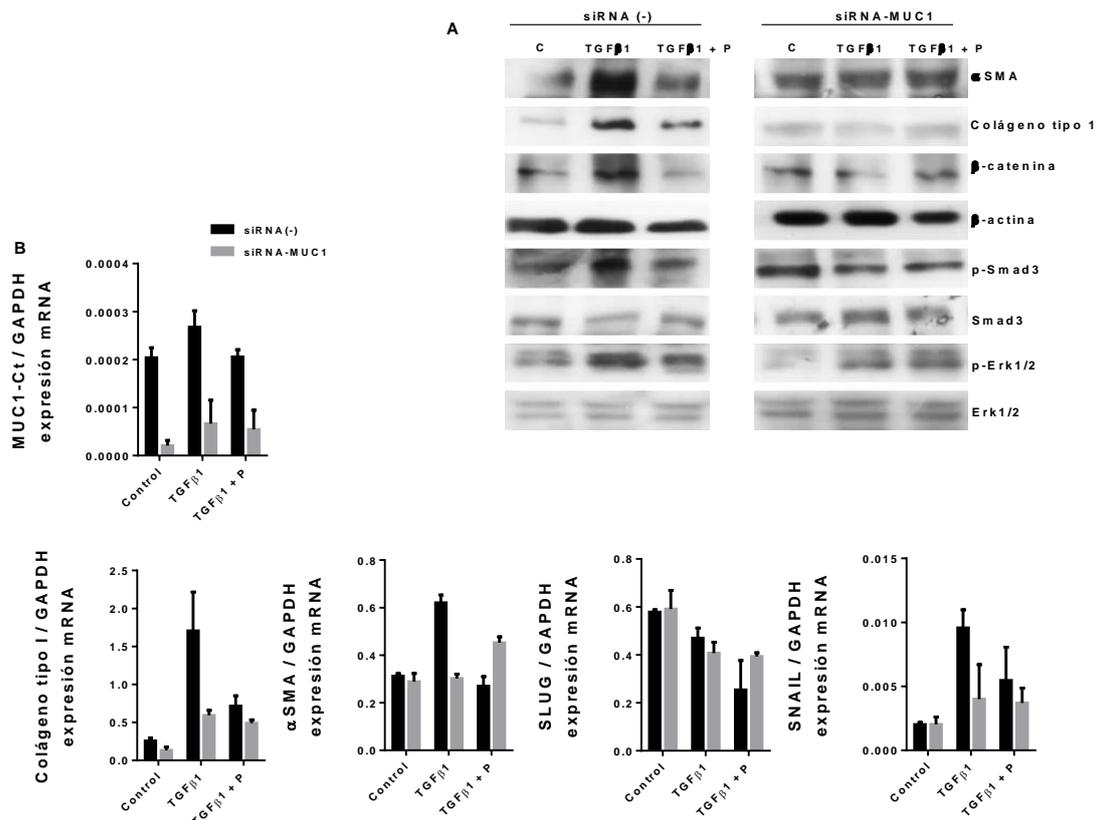


Figura 12: Participación *in vitro* de MUC1-Ct en los procesos celulares de FPI mediados por TGF-β1 en fibroblastos (MRC5).

A: análisis *Western Blot* de la expresión proteica de distintos marcadores mesenquimales (Colágeno tipo I y α-SMA), factores de transcripción (smad 3 y p-Smad3), MAP quinasas (Erk 1/2 y p-Erk 1/2) y β-catenina. Los niveles de expresión de β-actina se emplean como control endógeno en el caso de Colágeno tipo I, α-SMA, β-catenina y E-cadherina. Para los casos de p-Erk 1/2 y p-Smad3 se emplea sus correspondientes formas no fosforiladas como control endógeno.

B: niveles de expresión de mRNA de MUC1-Ct, marcadores mesenquimales (Colágeno tipo I y α-SMA) y factores de transcripción (SLUG y SNAIL) determinados mediante RT-PCR. Los datos se muestran expresados como el ratio de expresión del gen en cuestión respecto a los niveles de expresión de GAPDH. La representación de los datos se corresponde con la media ± SEM de n=3 por cada una de las condiciones.

Los resultados *in vitro* obtenidos en lo que refiere a las diferencias en los niveles de expresión génica y proteica de distintas moléculas implicadas en la FPI, en condiciones profibróticas respecto a condiciones control, tanto en presencia como en ausencia de MUC1, permitieron afirmar que MUC1-Ct, además de incrementar su expresión en pacientes FPI, participa activamente en los distintos procesos celulares que implica la FPI (figura 15).

Por lo que respecta a los marcadores mesenquimales, α-SMA y colágeno tipo I, el hecho de que su expresión en respuesta a TGF-β1, no incrementara de forma tan intensa en condiciones de silenciamiento de MUC1, permite postular que TGF-β1, en algún punto de su vía de señalización, actúa de forma conjunta con MUC1-Ct en el proceso de inducción génica de marcadores característicos de miofibroblastos. Asimismo, cabe destacar que el hecho de que las

células epiteliales alveolares mostraran una expresión aumentada de estos marcadores en presencia de TGF- β 1, indica que se produjo la TEM así como la conversión de los fibroblastos de tejido a miofibroblastos en condiciones profibróticas.

Otro de los fenómenos característicos de la FPI es la disminución de la expresión de la molécula de adhesión E-cadherina por parte de las células epiteliales. Esto implica una pérdida de la organización característica epitelial y una adquisición por parte de las células epiteliales de un fenotipo capaz de migrar, típico de las células mesenquimales, es decir, tiene lugar la TEM. Sin embargo, la ausencia de MUC1 en las células epiteliales atenuó la disminución de expresión de esta molécula, por lo que de nuevo se postula que TGF- β 1 en su vía de señalización establece algún tipo de relación con MUC1-Ct dando lugar a una disminución de la expresión de marcadores de células epiteliales.

Siendo evidente por tanto, la participación de MUC1-Ct en la FPI y su estrecha relación con el principal factor profibrótico, TGF- β 1, cabría estudiar el efecto de MUC1-Ct en la activación de Smad, principal mediador de la vía de transducción de señal de TGF- β 1. Con respecto a dicha activación, el hecho de que los niveles de expresión de p-Smad3 tras la estimulación con TGF- β 1 en condiciones de ausencia de MUC1, no aumentarían prácticamente con respecto a la situación control, indicaron que la activación de Smad3 inducida durante la fibrosis como consecuencia de la acción de TGF- β 1, no se produjo a penas en ausencia de MUC1. Por tanto, se pudo postular que MUC1-Ct establece relación con TGF- β 1 a nivel de la vía de transducción de señal dependiente de Smad.

En referencia a la expresión de ERK $\frac{1}{2}$, este estudio proporcionó evidencias de que, en presencia de TGF- β 1 y por tanto en condiciones de fibrosis, la proteína ERK $\frac{1}{2}$ se activa, es decir, se fosforila. Dicha proteína forma parte de la ruta de transducción Ras-Raf-MEK-ERK, activando distintos factores de transcripción en el núcleo, para la regulación de una gran variedad de procesos entre los cuales se incluyen la adhesión, migración, proliferación, supervivencia, diferenciación y progresión del ciclo celular (Roskoski, 2012). De nuevo, en los resultados obtenidos se observó que en presencia de TGF- β 1, la respuesta de activación de esta proteína fue menor en condiciones de ausencia de MUC1 respecto a condiciones de presencia de MUC1, es decir, de nuevo se afirmó que MUC1-Ct participa en la vía de señalización de TGF- β 1. De hecho, se ha visto anteriormente la hiperactivación de esta ruta en células cancerígenas con sobreexpresión de MUC1 (Nath and Mukherjee, 2014).

Por lo que respecta a la β -catenina, como se ha comentado en apartados anteriores, existe una interacción directa de dicha proteína con el dominio citoplasmático de MUC1 en líneas celulares de cáncer de páncreas y de carcinoma renal. Además, la señalización de β -catenina se ha visto influenciada por la presencia de la galectina-3, una β -galactosidasa que está sobreexpresada en pacientes con FPI. La eliminación de galectina-3, se ha visto que reduce la fosforilación y la translocación nuclear de β -catenina, y reduce la retención del receptor de TGF- β 1 (TGFR II), sugiriendo una interacción entre TGF- β 1 y β -catenina (MacKinnon et al., 2012). De hecho, existe un fármaco inhibidor de galectina-3 para FPI en fase clínica (clinicaltrials.gov identificador NCT02257177), el cual es capaz de bloquear la activación de β -catenina inducida por TGF- β 1 tanto *in vitro* como *in vivo* (MacKinnon et al., 2012). Por otra parte, existen evidencias de que la galectina-3 interacciona con MUC1 en su dominio N-terminal en líneas celulares de fibroblastos (3T3), desencadenando el reclutamiento de β -catenina al dominio C-terminal de MUC1 (Tanida et al., 2014), y de que la transducción de señal mediada por MUC1 en células tumorales ocurre a través de su interacción directa con

galectina-3 (Mori et al., 2015). Por tanto, los resultados obtenidos en este estudio, son consistentes con esta información, pues la expresión de β -catenina en presencia de TGF- β 1 incrementó con respecto a la situación control, pero este incremento no se produjo en condiciones de ausencia de MUC1, por lo que se pudo plantear la estrecha relación entre TGF- β 1 y β -catenina y a su vez la estrecha relación de esta última con MUC1-Ct, haciéndose patente una vez más la estrecha relación entre TGF- β 1 y MUC1-Ct.

Por último, en lo que respecta a los factores de transcripción SLUG y SNAIL, los cuales se activan durante la FPI, y translocan al núcleo para activar procesos característicos de la FPI como la TEM, cabe destacar que, generalmente su incremento de expresión en presencia de TGF- β 1 con respecto a la situación control fue mucho menos pronunciado en caso de ausencia de MUC1 que en caso de presencia de MUC1, volviéndose a evidenciar de nuevo la estrecha relación de MUC1-Ct y TGF- β 1 y su consiguiente participación en FPI.

4.4. Interacción de MUC1-Ct con p-Smad3 en FPI.

Por último, debido a la importancia hasta ahora comentada de la vía de transducción de TGF- β 1 en la fisiopatología de la FPI, así como la estrecha relación observada entre MUC1 y TGF- β 1, se estudió la posible interacción entre el factor de transcripción encargado de la señalización en esta ruta (p-Smad3) y MUC1. Para ello, se llevó a cabo la monitorización de la actividad de la vía de señalización TGF- β /Smad en A549 mediante “Smad binding element reporter kit (SBE)” en condiciones de silenciamiento control y silenciamiento de MUC1, además de experimentos de co-inmunofluorescencia y co-inmunoprecipitación de MUC1 y p-Smad2/3 en A459.

Los resultados obtenidos de la co-inmunoprecipitación se muestran en la Figura 13A, donde se pudo observar la presencia de p-Smad2/3 en todas las condiciones de inmunoprecipitación de MUC1 ensayadas, implicando por tanto, la unión de dicha proteína a MUC1. Además, teniendo en cuenta que como se puede observar en la figura, los niveles de MUC1 inmunoprecipitado son constantes en todas las condiciones ensayadas, se observó un aumento de la interacción de MUC1 con p-Smad2/3 cuando las células fueron estimuladas con TGF- β 1 con respecto a la condición control, viéndose disminuida esta interacción en el caso de una incubación previa con pirfenidona.

La posible interacción entre ambas proteínas también se evaluó mediante ensayos de inmunofluorescencia (Figura 13B) en los cuales se obtuvieron resultados coincidentes con los de la inmunoprecipitación. En este caso, pudo observarse no solo la interacción entre ambas proteínas en todas las condiciones ensayadas, sino que además pudo estudiarse la colocalización celular de ambas proteínas. Como se puede observar en la figura 13B, en condiciones control, ambas proteínas interaccionaron y presentaron una colocalización citoplasmática, mientras que en presencia de TGF- β 1 ambas proteínas interaccionaron también, pero presentaron una colocalización nuclear, es decir, en presencia de TGF- β 1, el complejo de interacción proteica cambia su localización citoplasmática para translocarse al núcleo. La incubación previa con pirfenidona, revirtió en gran parte la situación control, teniendo lugar una colocalización de ambas proteínas principalmente citoplasmática al añadir la pirfenidona.

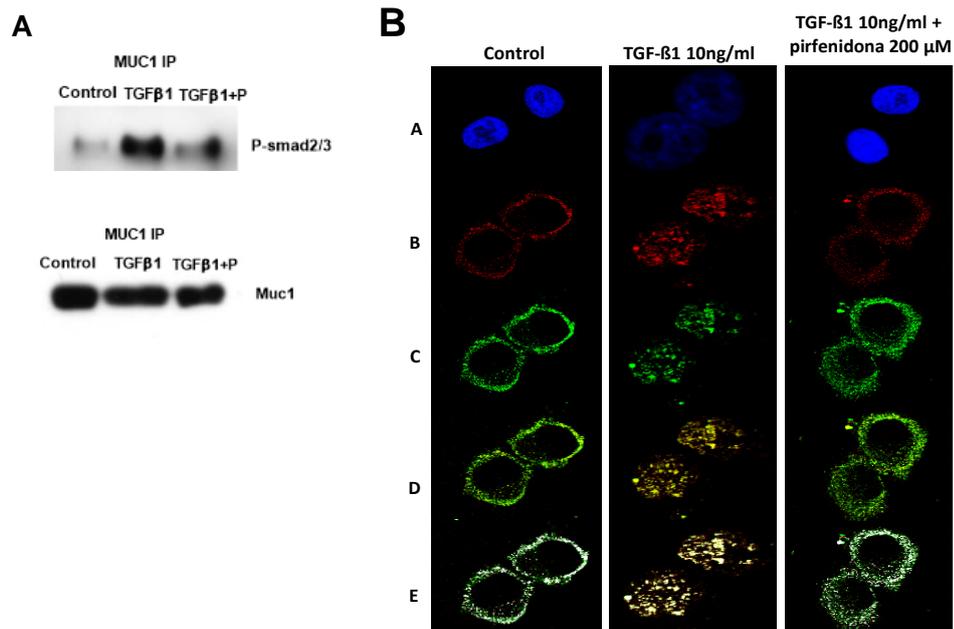


Figura 13: Interacción y colocación celular *in vitro* de MUC1-Ct con p-Smad 2/3 en células epiteliales alveolares tipo II (A549).

A: Inmunoprecipitación de MUC1-Ct y análisis *Western Blot* de p-Smad 2/3 en la proteína inmunoprecipitada. El análisis *Western Blot* de MUC1-Ct se emplea como control endógeno de la cantidad de proteína inmunoprecipitada. *MUC1 IP: MUC1 inmunoprecipitado.

B: Co-inmunofluorescencia de MUC1-Ct y p-Smad 2/3. A: DAPI; B: MUC1-Ct; C: p-Smad 2/3; D: superposición de MUC1-Ct y p-Smad 2/3; E: colocación de MUC1-Ct y p-Smad 2/3.

Por último, en cuanto a la monitorización de la ruta de señalización de TGF- β 1, los resultados obtenidos (Figura 14) demostraron que la adición de TGF- β 1 indujo un aumento significativo ($p < 0,05$) del ratio de luminiscencia de luciérnaga/luminiscencia de *Renilla*, es decir, de la activación de la ruta de transducción de TGF- β 1 mediada por Smad, con respecto a la situación control. Por el contrario, en ausencia de MUC1, este incremento en la activación de la vía de transducción de TGF- β 1 con respecto a la situación control, no fue significativo. La pirfenidona en este caso no ejerció ningún tipo de acción sobre la activación de la vía de señalización de TGF- β 1.

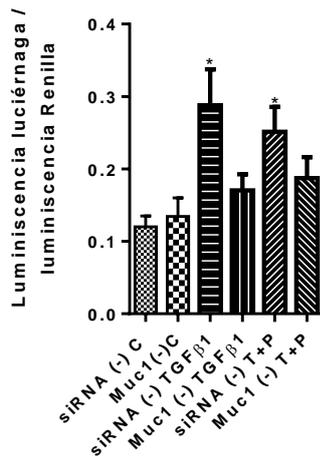


Figura 14: Participación *in vitro* de MUC1 en la vía de señalización TGF-β1/smad en células epiteliales alveolares tipo II (A549).

Monitorización de la actividad de la vía de señalización TGF-β/Smad mediante “Smad binding element reporter kit (SBE)” en condiciones de silenciamiento control y silenciamiento de MUC1. Los resultados vienen expresados como el ratio de la luminiscencia emitida por el gen reportero de la luciferasa de luciérnaga frente a la luminiscencia emitida por el gen de expresión constitutiva de la luciferasa de Renilla (n=3). (*p<0,05 respecto control en condiciones de silenciamiento control).

Teniendo en cuenta la anteriormente comentada estrecha relación entre TGF-β1 y MUC1, estos resultados nos permitieron profundizar en el entendimiento de esta relación, permitiendo hipotetizar que, esta relación tiene lugar a través de la vía de transducción de señal de TGF-β1 dependiente de Smad, concretamente a través de la interacción directa de MUC1-Ct con p-Smad 2/3. Esta interacción se vio aumentada en presencia de TGF-β1, pues como ya se observó previamente, TGF-β1 incrementa los niveles de expresión de Smad 2/3 en su forma activada, es decir, p-Smad 2/3, por tanto, existe también más cantidad del complejo proteico de interacción de MUC1-Ct y p-Smad 2/3. Además, TGF-β1 dio lugar a un cambio de la localización celular del complejo proteico, siendo translocado al núcleo en condiciones profibróticas (figura 15). Por tanto, se plantea la hipótesis de que TGF-β1 pueda ser capaz de inducir la escisión de la parte C-terminal de MUC1, anclada de forma general a la membrana, y que una vez liberada, la región C-terminal migrara al núcleo, unida junto con las proteínas del complejo Smad, donde podría inducir modificaciones transcripcionales. Por tanto, MUC1 actuaría como mediadora en la ruta de señalización de TGF-β1, participando en ella y potenciando su acción profibrótica.

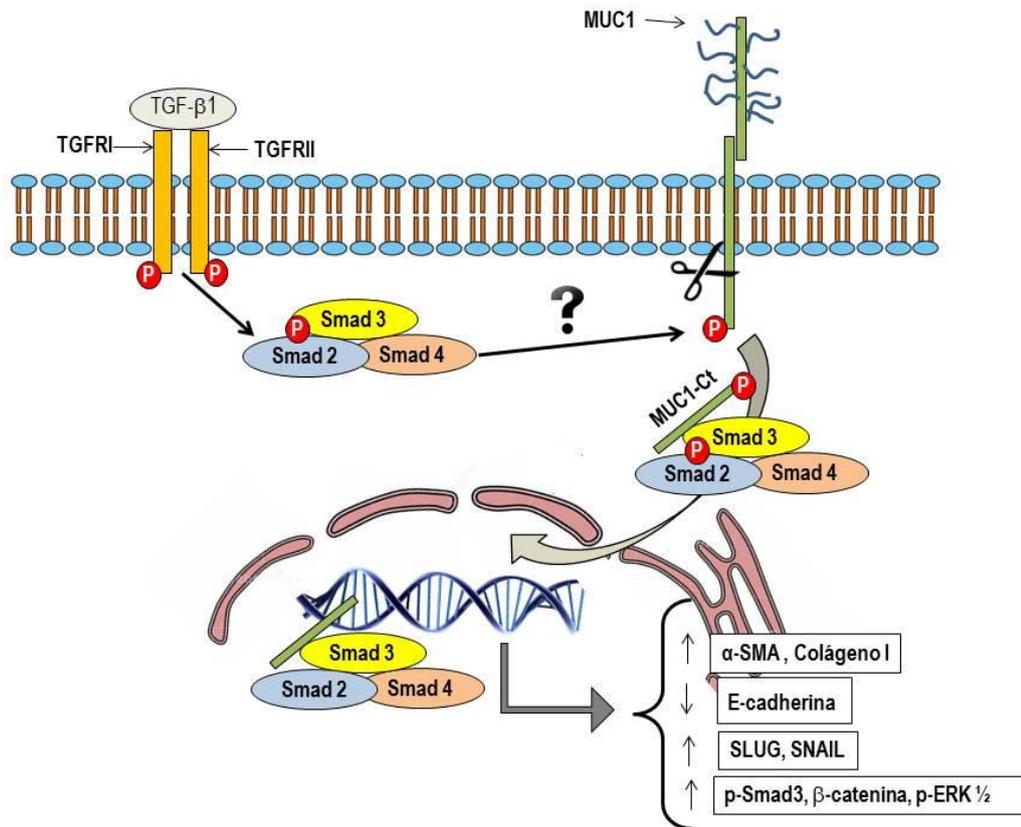


Figura 15. Modelo propuesto en células alveolares tipo II de la vía de transducción de señal en FPI mediada por TGF-β1 y MUC1-Ct

La liberación del mediador profibrótico TGF-β1 y la consecuente activación de su ruta dependiente de Smad son factores clave en el desarrollo de la FPI. En condiciones patológicas, el modulador TGF-β1, que generalmente se encuentra inactivo por la unión al péptido de latencia LAP, se escinde de este gracias a la acción de la integrina $\alpha v \beta 6$, y se activa, siendo capaz de anclarse a sus receptores. Una vez unido a sus receptores, se activa la ruta de transducción de señal, fosforilándose TGFRII y TGFRI respectivamente y reclutándose por parte de éstos el complejo formado por Smad2, Smad3 y Smad4 el cual también es fosforilado y por tanto activado. Este complejo activado se propone como el encargado de la fosforilación del dominio citoplasmático de MUC1-Ct en la posición T1224. En consecuencia, se induce la activación de MUC1-Ct, el cual se plantea que se escinde de la membrana plasmática en condiciones profibróticas y migra al núcleo unido al complejo Smad. De este modo, una vez translocado al núcleo el complejo proteico, se inducen, entre otras cosas, la sobreexpresión de genes relacionados con moléculas de matriz extracelular como Colágeno tipo I y α -SMA, la disminución de expresión de moléculas implicadas en la adhesión celular como E-cadherina y la sobreexpresión de promotores como SNAIL y SLUG encargados de promover la transición epitelial mesenquimal característica de esta patología. Asimismo, la activación de esta ruta de señalización se relaciona con la activación de la proteína ERK y el aumento de expresión de β -catenina.

5. Conclusiones

- El gen *MUC1* está sobreexpresado en pacientes FPI.
- TGF- β 1, principal factor profibrótico en la enfermedad de FPI, participa en la activación de MUC1-Ct en células epiteliales alveolares tipo II y fibroblastos, a través de la fosforilación de la treonina en posición 1224
- MUC1 participa a nivel intracelular de células epiteliales alveolares tipo II y fibroblastos en la regulación de las vías de transducción de señal desencadenadas por TGF- β 1 en FPI.
- MUC1-Ct establece relación directa con la vía de transducción de señal dependiente de Smad desencadenada por TGF- β 1. Esta relación se establece a través de la interacción entre MUC1-Ct y p-Smad2/3.
- TGF- β 1 promueve la escisión, de la membrana plasmática, de la parte C-terminal de MUC1 unida a p-Smad2/3, translocándose dicho complejo proteico al núcleo para producir modificaciones transcripcionales que fomentan la progresión de la FPI.
- Los efectos producidos *in vitro* por la pirfenidona en los procesos celulares estudiados, es decir, procesos característicos de la FPI mediados por la vía de transducción de señal de TGF- β 1 dependiente de Smad, son en algunos casos beneficiosos, pero en otros muchos casos nulos. Esto pone en evidencia que el demostrado potencial farmacológico de la pirfenidona en FPI pueda ser debido a su acción sobre la vía de transducción de señal de TGF- β 1 dependiente de Smad.
- La pirfenidona no ejerce *in vitro* efectos notables sobre los procesos intracelulares mediados por MUC1-Ct y relacionados con la FPI.

6. Bibliografía

- Agabiti, N., Porretta, M., Bauleo, L., Coppola, A., Sergiacomi, G., Fusco, A., Cavalli, F., Zappa, M., Vignarola, R., Carlone, S., Facchini, G., Mariotta, S. and Palange, P. (2014). Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) incidence and prevalence in Italy. *SARCOIDOSIS VASCULITIS AND DIFFUSE LUNG DISEASES*, 31, pp.191-197.
- Annes, J. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of Cell Science*, 116(2), pp.217-224.
- Arakawa, H. and Honma, K. (2011). Honeycomb Lung: History and Current Concepts. *American Journal of Roentgenology*, 196(4), pp.773-782.
- Bafna, S., Kaur, S. and Batra, S. (2010). Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene*, 29(20), pp.2893-2904.
- Bagnato, G. and Harari, S. (2015). Cellular interactions in the pathogenesis of interstitial lung diseases. *Eur Respir Rev*, 24(135), pp.102-114.
- Branton, M. and Kopp, J. (1999). TGF- β and fibrosis. *Microbes and Infection*, 1(15), pp.1349-1365.
- Escuela.med.puc.cl. (2016). *Aparato Respiratorio: Fisiología y Clínica*. [online] Available at: <http://escuela.med.puc.cl/publ/Aparatorespiratorio/01Morfologia.html> [Accessed 4 Feb. 2016].
- Gendler, S.J. (2001) MUC1, the renaissance molecule. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 6, 339–353
- Gnemmi, V., Bouillez, A., Gaudelot, K., Hémon, B., Ringot, B., Pottier, N., Glowacki, F., Villers, A., Vindrieux, D., Cauffiez, C., Seuning, I., Bernard, D., Leroy, X., Aubert, S. and Perrais, M. (2014). MUC1 drives epithelial–mesenchymal transition in renal carcinoma through Wnt/ β -catenin pathway and interaction with SNAIL promoter. *Cancer Letters*, 346(2), pp.225-236.
- Guyton, A. and Hall, J. (2006). *Tratado de fisiología médica*. Madrid: Elsevier España.
- Han, M., Bach, D., Hagan, P., Yow, E., Flaherty, K., Toews, G., Anstrom, K. and Martinez, F. (2013). Sildenafil Preserves Exercise Capacity in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Right-sided Ventricular Dysfunction. *Chest*, 143(6), pp.1699-1708.
- Huang, (2013). Advances in the study of biomarkers of idiopathic pulmonary fibrosis in Japan. *Biosci Trends*.
- Hung, C., Linn, G., Chow, Y., Kobayashi, A., Mittelsteadt, K., Altemeier, W., Gharib, S., Schnapp, L. and Duffield, J. (2013). Role of Lung Pericytes and Resident Fibroblasts in the Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 188(7), pp.820-830.
- Hutchinson, J., McKeever, T., Fogarty, A., Navaratnam, V. and Hubbard, R. (2014). Increasing Global Mortality from Idiopathic Pulmonary Fibrosis in the Twenty-First Century. *Annals ATS*, 11(8), pp.1176-1185.

- Hutchinson, J., Fogarty, A., Hubbard, R. and McKeever, T. (2015). Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *Eur Respir J*, 46(3), pp.795-806.
- Hyldgaard, C., Hilberg, O., Muller, A. and Bendstrup, E. (2014). A cohort study of interstitial lung diseases in central Denmark. *Respiratory Medicine*, 108(5), pp.793-799.
- Ishikawa, N., Hattori, N., Yokoyama, A. and Kohno, N. (2012). Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases. *Respiratory Investigation*, 50(1), pp.3-13.
- Karakatsani, A., Papakosta, D., Rapti, A., Antoniou, K., Dimadi, M., Markopoulou, A., Latsi, P., Polychronopoulos, V., Birba, G., Ch, L. and Bouros, D. (2009). Epidemiology of interstitial lung diseases in Greece. *Respiratory Medicine*, 103(8), pp.1122-1129.
- Kass, D., Flynn, M. and Baker, E. (2015). Idiopathic pulmonary fibrosis biomarkers: clinical utility and a way of understanding disease pathogenesis. *CBF*, p.21.
- Kawano, T., Ahmad, R., Nogi, H., Agata, N., Anderson, K. and Kufe, D. (2008). MUC1 oncoprotein promotes growth and survival of human multiple myeloma cells. *Int J Oncol*.
- King, T., Behr, J., Brown, K., du Bois, R., Lancaster, L., de Andrade, J., Stähler, G., Leconte, I., Roux, S. and Raghu, G. (2008). BUILD-1: A Randomized Placebo-controlled Trial of Bosentan in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 177(1), pp.75-81.
- King, T., Bradford, W., Castro-Bernardini, S., Fagan, E., Glaspole, I., Glassberg, M., Gorina, E., Hopkins, P., Kardatzke, D., Lancaster, L., Lederer, D., Nathan, S., Pereira, C., Sahn, S., Sussman, R., Swigris, J. and Noble, P. (2014). A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 370(22), pp.2083-2092.
- Kolahian, S., Fernandez, I., Eickelberg, O. and Hartl, D. (2016). Immune Mechanisms in Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*.
- Kufe, D. (2012). MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene*, 32(9), pp.1073-1081.
- LEASK, A. (2004). TGF- signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal*, 18(7), pp.816-827.
- Li, Q., Liu, G., Shao, D., Wang, J., Yuan, H., Chen, T., Zhai, R., Ni, W. and Tai, G. (2015). Mucin1 mediates autocrine transforming growth factor beta signaling through activating the c-Jun N-terminal kinase/activator protein 1 pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 59, pp.116-125.
- Li, Q., Liu, G., Yuan, H., Wang, J., Guo, Y., Chen, T., Zhai, R., Shao, D., Ni, W. and Tai, G. (2015). Mucin1 shifts Smad3 signaling from the tumor-suppressive pSmad3C/p21^{WAF1} pathway to the oncogenic pSmad3L/c-Myc pathway by activating JNK in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*, 6(6), pp.4253-4265.
- Loomis-King, H., Flaherty, K. and Moore, B. (2013). Pathogenesis, current treatments and future directions for idiopathic pulmonary fibrosis. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(3), pp.377-385.

- MacKinnon, A., Gibbons, M., Farnworth, S., Leffler, H., Nilsson, U., Delaine, T., Simpson, A., Forbes, S., Hirani, N., Gauldie, J. and Sethi, T. (2012). Regulation of Transforming Growth Factor- β 1-driven Lung Fibrosis by Galectin-3. *Am J Respir Crit Care Med*, 185(5), pp.537-546.
- Maher, T., Strongman, H., Boggon, R. and Kausar, I. (2013). P18 Idiopathic pulmonary fibrosis survival has not improved in the 21st century; analysis of CPRD gold primary care data. *Thorax*, 68(Suppl 3), pp.A82-A83.
- Meng, X., Nikolic-Paterson, D. and Lan, H. (2016). TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*, 12(6), pp.325-338.
- Mori, Y., Akita, K., Yashiro, M., Sawada, T., Hirakawa, K., Murata, T. and Nakada, H. (2015). Binding of Galectin-3, a β -Galactoside-binding Lectin, to MUC1 Protein Enhances Phosphorylation of Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) and Akt, Promoting Tumor Cell Malignancy. *Journal of Biological Chemistry*, 290(43), pp.26125-26140.
- Nalysnyk, L., Cid-Ruzafa, J., Rotella, P. and Esser, D. (2012). Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *European Respiratory Review*, 21(126), pp.355-361.
- Nath, S. and Mukherjee, P. (2014). MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends in Molecular Medicine*, 20(6), pp.332-342.
- Noble, PW., Albera, C., Bradford, WZ., Costabel, U., Glassberg, MK., Kardatzke, D., King, TE., Jr., Lancaster, L., Sahn, SA., Szwarzberg, J., Valeyre, D., du Bois, RM (2011). Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet*; 377: 1760-9.
- Ogura, T., Taniguchi, H., Azuma, A., Inoue, Y., Kondoh, Y., Hasegawa, Y., Bando, M., Abe, S., Mochizuki, Y., Chida, K., Klüglich, M., Fujimoto, T., Okazaki, K., Tadayasu, Y., Sakamoto, W. and Sugiyama, Y. (2014). Safety and pharmacokinetics of nintedanib and pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 45(5), pp.1382-1392.
- Ohshimo, S., Yokoyama, A., Hattori, N., Ishikawa, N., Hirasawa, Y. and Kohno, N. (2005). KL-6, a human MUC1 mucin, promotes proliferation and survival of lung fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(4), pp.1845-1852.
- Piera-Velazquez, S., Mendoza, F. and Jimenez, S. (2016). Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases. *Journal of Clinical Medicine*, 5(4), p.45.
- Pochampalli, M., Bejjani, R. and Schroeder, J. (2006). MUC1 is a novel regulator of ErbB1 receptor trafficking. *Oncogene*, 26(12), pp.1693-1701.
- Ponnusamy, M., Seshacharyulu, P., Lakshmanan, I., Vaz, A., Chugh, S. and Batra, S. (2013). Emerging Role of Mucins in Epithelial to Mesenchymal Transition. *Current Cancer Drug Targets*, 13(9), pp.945-956.
- Prednisone, Azathioprine, and N -Acetylcysteine for Pulmonary Fibrosis. (2012). *New England Journal of Medicine*, 366(21), pp.1968-1977.

Puthawala, K., Hadjiangelis, N., Jacoby, S., Bayongan, E., Zhao, Z., Yang, Z., Devitt, M., Horan, G., Weinreb, P., Lukashov, M., Violette, S., Grant, K., Colarossi, C., Formenti, S. and Munger, J. (2008). Inhibition of Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{6}$, an Activator of Latent Transforming Growth Factor- β , Prevents Radiation-induced Lung Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 177(1), pp.82-90.

Raghu, G., Weycker, D., Edelsberg, J., Bradford, W. and Oster, G. (2006). Incidence and Prevalence of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 174(7), pp.810-816.

Raghu, G., Collard, H., Egan, J., Martinez, F., Behr, J., Brown, K., Colby, T., Cordier, J., Flaherty, K., Lasky, J., Lynch, D., Ryu, J., Swigris, J., Wells, A., Ancochea, J., Bouros, D., Carvalho, C., Costabel, U., Ebina, M., Hansell, D., Johkoh, T., Kim, D., King, T., Kondoh, Y., Myers, J., Müller, N., Nicholson, A., Richeldi, L., Selman, M., Dudden, R., Griss, B., Protzko, S. and Schünemann, H. (2011). An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. *Am J Respir Crit Care Med*, 183(6), pp.788-824.

Raghu G., Million-Rousseau R., Morganti A., Perchenet L., Behr J. (2013). Macitentan for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: the randomised controlled MUSIC trial. *Eur Respir J*, 42(6):1622-32.

Raghu, G., Behr J., Brown KK., Egan JJ., Kawut SM., Flaherty KR, et al. (2013). Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis With Ambrisentan: a parallel, randomized trial.. *Annals of Internal Medicine*, 158(9), p.641.

Raghu, G., Chen, S., Yeh, W., Maroni, B., Li, Q., Lee, Y. and Collard, H. (2014). Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001–11. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2(7), pp.566-572.

Richeldi L, Costabel U, Selman M, Kim DS, Hansell DM, Nicholson AG, Brown KK, Flaherty KR, Noble PW, Raghu G, Brun M, Gupta A, Juhel N, Kluglich M, du Bois RM. (2011) Efficacy of a tyrosine kinase inhibitor in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*; 365: 1079-87.

Richeldi, L., Cottin, V., du Bois, R., Selman, M., Kimura, T., Bailes, Z., Schlenker-Herceg, R., Stowasser, S. and Brown, K. (2016). Nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: Combined evidence from the TOMORROW and INPULSIS® trials. *Respiratory Medicine*, 113, pp.74-79.

Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2), pp.105-143.

Senapati, S., Das, S. and Batra, S. (2010). Mucin-interacting proteins: from function to therapeutics. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(4), pp.236-245.

Tanida, S., Mori, Y., Ishida, A., Akita, K. and Nakada, H. (2014). Galectin-3 binds to MUC1-N-terminal domain and triggers recruitment of β -catenin in MUC1-expressing mouse 3T3 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(6), pp.1790-1797.

VON PLESSEN, C., GRINDE, Ø. and GULSVIK, A. (2003). Incidence and prevalence of cryptogenic fibrosing alveolitis in a Norwegian community. *Respiratory Medicine*, 97(4), pp.428-435.

Wang, H., Lillehoj, E. and Kim, K. (2003). Identification of four sites of stimulated tyrosine phosphorylation in the MUC1 cytoplasmic tail. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310(2), pp.341-346.

Wen, Y., Caffrey, T., Wheelock, M., Johnson, K. and Hollingsworth, M. (2003). Nuclear Association of the Cytoplasmic Tail of MUC1 and β -Catenin. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), pp.38029-38039.

Whitsett, J. and Alenghat, T. (2014). Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nature Immunology*, 16(1), pp.27-35.

Wollin, S., Bonella, F. and Stowasser, S. (2015). Idiopathic pulmonary fibrosis: current treatment options and critical appraisal of nintedanib. *DDDT*, p.6407.

Wolters, P., Collard, H. and Jones, K. (2014). Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 9(1), pp.157-179.

Zhang, L., Gallup, M., Zlock, L., Chen, Y., Finkbeiner, W. and McNamara, N. (2014). Pivotal role of MUC1 glycosylation by cigarette smoke in modulating disruption of airway adherens junctions in vitro. *J. Pathol.*, 234(1), pp.60-73.