



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMA BIOLÓGICOS
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO
INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

“Biomarcadores Séricos para el Diagnóstico Diferencial de Fibrosis Pulmonar Idiopática “

Nombre del Alumno:

Deysi María de Jesús Frías Ramírez

Matricula: 205368023

Asesores

Asesor (a) externo (a): Dr. Víctor Manuel Ruiz López, Cedula: 4197532

Asesor (a) interno (a): M. en C. Felipe Mendoza Pérez, No. Económico: 07183

Lugar de Realización:

Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)
Calzada de Tlalpan No. 502, col Sección XVI, Alcaldía Tlalpan, México, CDMX., C.P 14080

Fecha de Inicio: 16 de Julio del 2012

Fecha de terminación: 16 de Marzo del 2013

ÍNDICE.....	2
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 NEUMOPATÍAS INTERSTICIALES DIFUSAS.....	4
1.2 FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA.....	5
1.3 EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO.....	6
1.4 NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD (ALVEOLITIS ALÉRGICA EXTRÍNSECA)	8
1.5 Epidemiología.....	10
1.6 Antígenos responsables.....	10
1.7 Patogenia.....	10
1.8 Diagnóstico.....	12
1.9 NEUMOPATÍAS INTERSTICIALES SECUNDARIAS O ENFERMEDADES COLÁGENOVASCULARES.....	12
1.9.1 Patogenia.....	14
2. OBJETIVO.....	15
2.1 OBJETIVO GENERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. MARCO TEÓRICO.....	16
3.1 BIOMARCADORES SÉRICOS.....	16
3.2 PROTEÍNA D DEL SURFACTANTE.....	17
3.3 miRNAs.....	20
3.4 miR21 EN LA FIBROSIS PULMONAR.....	24
3.5 miR155 EN LA FIBROSIS PULMONAR.....	25
3.6 INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO.....	26
3.7 PCR.....	26
3.8 PCR EN TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-PCR.....	27
3.9 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	28
3.9.1 PCR EN TIEMPO REAL (qPCR).....	29

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	30
4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	30
4.2 Obtención de suero.....	32
4.3 Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima. (ELISA).....	32
4.4 Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima. (ELISA) para SP-D.....	32
4.5 PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE miRNAs, miRNease Serum/ Plasma Kit (CAT. NO. 217184)	34
4.6 Protocolo de RT	36
4.7 Protocolo para-PCR.....	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1 GRAFICAS.....	38
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	41
7. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS.....	42
8. CONCLUSIONES.....	43
9. ANEXOS	44
10. REFERENCIAS	46

BIOMARCADORES SÉRICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

1. INTRODUCCIÓN

1.1 NEUMOPATÍAS INTERSTICIALES DIFUSAS

Bajo el término de neumopatías intersticiales difusas (NID) también denominadas enfermedades pulmonares intersticiales difusas o enfermedades fibrosantes del pulmón, se agrupan un gran número de padecimientos respiratorios subagudos y crónicos que se caracterizan, como su nombre lo indica por comprometer el parénquima pulmonar, afectando primordialmente al intersticio y los espacios alveolares, aunque muchas de ellas también producen lesión de las vías aéreas periféricas.

Existen más de 150 diferentes padecimientos y/o agentes agresores que son capaces de producir NID, que incluyen infecciones virales, bacterianas, micóticas, neoplasias pulmonares primarias (carcinoma bronquioloalveolar) o metastásicas y una enorme variedad de enfermedad genéticas y adquiridas (Tabla 1), pueden separarse en seis grupos principales constituidos por las NID no infecciosas ni neoplásicas (fig. 1).

A pesar de su gran heterogeneidad, las NID no infecciosas no neoplásicas pueden agruparse juntas porque presentan rasgos clínicos, radiológicos y funcionales similares y morfológicamente comparten el hecho de responder, después de un daño inicial, con un proceso inflamatorio intersticial e intraalveolar difuso (cuyas características varían de enfermedad a enfermedad), el cual es seguido por fibrosis y destrucción de las unidades alvéolo-capilares.

Algunas NID son muy agresivas, generalmente progresan y ocasionan la muerte en unos pocos años, el prototipo más agresivo de estas es Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI), cuyas causas son desconocidas, de ahí su nombre. Otras tienen un mejor pronóstico.

La incidencia y prevalencia de las NID no se conocen con precisión. En esta problemática destacan los siguientes puntos: a) Las NID constituyen un grupo extraordinariamente heterogéneo de padecimientos que incluyen enfermedades relativamente frecuentes como la sarcoidosis, las neumopatías por hipersensibilidad y otras poco frecuentes o francamente raras como microlitiasis y la proteinosis alveolar b) Para hacer un diagnóstico se requiere de un buen grado de sospecha clínica porque muchas veces se diagnostican erróneamente c) Algunas NID no se clasifican como tales están bajo el diagnóstico de la enfermedad de base, esto ocurre en las neumopatías intersticiales secundarias o enfermedades colágeno-vasculares como la esclerosis sistémica progresiva o el lupus ⁽⁷⁾.

1.2 FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

La FPI representa probablemente el prototipo más agresivo de las neumopatías intersticiales difusas, es crónica, de causa desconocida generalmente progresiva, no responde al tratamiento con esteroides e inmunosupresores, es letal en un plazo relativamente breve. El promedio de supervivencia es habitualmente de 2 a 4 años después de realizado el diagnóstico, aunque su historia natural es altamente variable e imprescindible ⁽⁷⁾.

La FPI dificulta la capacidad de asimilar el oxígeno, ocasionando la falta de aire y a menudo se asocia con tos seca, los pacientes con FPI usualmente solicitan atención médica porque sufren una complicación crónica de disnea, esfuerzo progresivo al toser, inspiración bibasilar (se oyen crepitaciones cuando se ausculta el pecho).

1.3 EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

La prevalencia e incidencia anual en los Estados Unidos son estimadas de 14 a 42.7 personas por 100,000 y de 6.8 a 16.3 personas por 100,000 respectivamente ⁽³⁾. Esta enfermedad tiene mayor predominio en los hombres que en las mujeres y la frecuencia aumenta con la edad. Este padecimiento suele ser una de las neumopatías intersticiales difusas crónicas más frecuentemente diagnosticadas en los centros hospitalarios. Los factores de riesgo son el hábito tabáquico y antecedentes familiares de fibrosis pulmonar.

La FPI ocurre principalmente en adultos mayores (la media de la edad diagnosticada es de 66 años y tiene un alcance de 55-75 años) es limitado a los pulmones y es asociada a la histopatología o modelo de radiografía típico de la neumonía intersticial usual. ⁽⁸⁾ ^(4,7)

Sin embargo, los últimos hallazgos indican que la FPI es una enfermedad heterogénea y hay nuevos fenotipos clínicos con distintos patrones que no están claros. El ciclo crónico de la lesión de la FPI causa una respuesta exagerada y no controlada de la reparación que produce cicatriz fibrosa del tejido. Esta cicatrización a su vez ocasiona que los pequeños sacos de aire pulmonares, llamados alvéolos, se ensanchen y se hagan rígidos, de modo que no pueden cumplir correctamente sus funciones y proveer el oxígeno que el cuerpo necesita, un creciente cuerpo de evidencia indica que la enfermedad es el resultado de un comportamiento anormal de las células alveolares epiteliales que provocan la migración, proliferaciones, y la activación de las células mesenquimales, con la formación de focos de fibroblastos y miofibroblastos. Los miofibroblastos secretan cantidades exageradas de moléculas de la matriz extracelular con la destrucción subsecuente de la arquitectura pulmonar ^(4,7).

A la fecha el diagnóstico de la FPI, es un proceso a base de estudios radiológicos, tomografía, pruebas de función respiratoria, espirometría, pletismografía, ecocardiografía, capacidad de difusión de CO₂ y conteo diferencial de células procedentes de los Lavados Bronquio-Alveolares (LBA); en algunos casos, para el diagnóstico se requiere de efectuar lo que se ha considerado el estándar de oro en el diagnóstico de la FPI, que es la biopsia a cielo abierto, sin embargo existen muchos pacientes que por la gravedad de su condición, no pueden someterse a este procedimiento⁽⁷⁾. Después de lograr un adecuado diagnóstico de la enfermedad existe un problema adicional, no existen pruebas que indiquen adecuadamente el pronóstico de la enfermedad, ya que se ha observado que en algunos pacientes la enfermedad progresa más rápido que otras. Adicionalmente, el costo de las pruebas tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de estos pacientes es elevado. Por lo anterior, es fundamental la búsqueda de biomarcadores que diagnostiquen y además hagan predicciones de la evolución de la enfermedad de manera eficiente, con un menor costo y con menores pruebas invasivas para el paciente. A la fecha existen trabajos en los cuales se han analizado de manera aislada, posibles biomarcadores para la FPI, tanto para el diagnóstico como para el pronóstico, utilizando suero o LBA. Por ejemplo, Brent et al en el 2009, analizaron la utilidad de la cuantificación de los niveles de las proteínas del surfactante A y D, en suero y encontraron que los niveles altos de estas proteínas se correlacionan con una temprana mortalidad en los pacientes con FPI.

En un estudio en donde se midieron los niveles de miRNAs, se demostró que 10% de los micro RNA eran significativamente diferentes entre los pulmones con FPI y pulmones control⁽³²⁾ y posteriormente muchos de ellos mostraron tener un papel potencial en la patogénesis de la fibrosis pulmonar, de tal manera que la comprensión de su papel en la FPI puede tener un efecto significativo en el diagnóstico y tratamiento del paciente en el futuro.⁽³⁾ **Tabla 1**

Los cambios en la expresión de miRNAs en el pulmón FPI, la evidencia de su papel en la fibrosis y los hallazgos de los miRNAs extracelulares estables en plasma y otros fluidos corporales, sugiere la posibilidad de que están involucrados en la comunicación celular y que puedan ser utilizados como Biomarcadores en la fibrosis pulmonar.

1.4 NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD (ALVEOLITIS ALÉRGICA EXTRÍNSECA)

Podemos definir la neumonitis por hipersensibilidad como enfermedad una que se produce por la inflamación secundaria a la inhalación repetida de una variedad de antígenos por un huésped susceptible. Puede decirse que es una enfermedad subdiagnosticada y sólo un alto grado de sospecha clínica y una historia detallada de la exposición pueden llevar a un diagnóstico precoz y un tratamiento satisfactorio. Una combinación entre los hallazgos clínico-radiológicos, funcionales, citológicos o anatomopatológicos, en algunos casos, nos llevarán al diagnóstico.

La neumonitis por hipersensibilidad, también denominada alveolitis alérgica extrínseca, está constituida por un complejo grupo de enfermedades de variada intensidad, presentación clínica e historia natural, más que por una sola entidad uniforme. Clásicamente, la presentación clínica se ha dividido en 3 formas: aguda, subaguda y crónica con relación a la intensidad y la frecuencia de exposición al agente causal. Aunque en la actualidad se han propuesto nuevas clasificaciones, como la más reciente de Selman ⁽⁴⁰⁾, que divide a la enfermedad en activa no progresiva e intermitente, aguda progresiva intermitente y crónica tanto progresiva como no progresiva, dada la gran variabilidad de presentaciones y de curso, ninguna de ellas ha sido del todo satisfactoria.

La forma aguda se produce tras inhalaciones masivas del antígeno en un corto período de tiempo. Los síntomas se producen al cabo de 4 a 8 horas de la inhalación y desaparecen en un período de 12 horas a pocos días si no hay nuevo contacto. Es la forma más fácil de identificar, pero los síntomas pueden confundirse con una infección bacteriana o viral. La sintomatología consiste en sensación de mal estado general, tos seca, disnea de grado variable sin sibilancias, fiebre que puede llegar a ser elevada, escalofríos y dolor torácico en forma de tirantez. Se pueden escuchar crepitaciones finas en las bases y detectar taquipnea. Los síntomas pueden repetirse si hay reexposición. La forma subaguda generalmente ocurre tras inhalaciones continuas, pero no masivas del agente causal. Los síntomas aparecen de forma insidiosa durante unas semanas y consisten en malestar general, astenia, pérdida de peso, tos seca, pero a veces también productiva, la disnea puede llegar a ser severa con cianosis e incluso requerir hospitalización. En la exploración física podemos encontrar los mismos hallazgos que en la forma aguda. Tanto las formas agudas como las subagudas pueden evolucionar en un porcentaje variable a la forma crónica si el paciente sigue teniendo contacto con el antígeno. Se caracteriza por un curso, en ausencia de episodios agudos, de tos, disnea, fatiga y pérdida de peso. En esta fase, la enfermedad es clínicamente indistinguible de la de una fibrosis pulmonar o de cualquier otra etiología. La exploración física puede revelar dedos en palillo de tambor, en el caso de enfermedad avanzada, en ocasiones es un signo predictor del grado de deterioro clínico. Esta forma de presentación puede evolucionar desfavorablemente llegando a precisar tratamiento con oxigenoterapia domiciliaria, produciendo hipertensión pulmonar y fallecimiento del paciente por fallo respiratorio. En este estadio la retirada de la exposición al agente causal sólo producirá una discreta mejoría sintomática.

1.5 Epidemiología

La prevalencia e incidencia de la neumonitis por hipersensibilidad es baja, aunque con toda seguridad una de las razones es el subdiagnóstico. Además, los datos varían en función de las características del caso, la presencia de ciertas industrias en las cercanías y los factores de riesgo del huésped ^(41,42). Sólo unos pocos individuos de toda la población expuesta desarrollan la enfermedad y en ello influyen factores genéticos, ambientales y las características del propio antígeno.

El pulmón del granjero es una de las formas más comunes y afecta al 0,4-7% de todos los granjeros. ⁽⁴³⁾ La prevalencia cambia mucho por regiones, dependiendo claramente de la humedad de la zona.

1.6 Antígenos responsables

Se han descrito más de 50 antígenos diferentes causantes de neumonitis por hipersensibilidad. Estos agentes etiológicos se pueden clasificar en tres categorías: microorganismos (bacterias, hongos y amebas), proteínas animales y compuestos químicos de bajo peso molecular (ej. isocianatos y anhídridos ácidos). La exposición a dichos antígenos por vía inhalatoria tiene lugar en una gran variedad de trabajos y aficiones, e incluso de forma accidental por contaminación de sistemas de acondicionamiento de aire o humidificadores.

1.7 Patogenia

La neumonitis por hipersensibilidad es una enfermedad inflamatoria crónica causada por antígenos inhalados que inducen el desarrollo de una respuesta inflamatoria linfocitaria en las vías aéreas periféricas e intersticio circundante. No todos los antígenos inhalados tienen

capacidad para desencadenar la enfermedad. Aquellos que inducen neumonitis por hipersensibilidad tienen algunas características que los diferencian de los capaces de inducir otras enfermedades como el asma, tales como su tamaño, solubilidad, naturaleza particulada y su capacidad de producir, además de la respuesta inmunológica, una respuesta inflamatoria inespecífica. Desde el punto de vista aerodinámico deben tener un tamaño entre 1 y 3 μm de diámetro, con el fin de alcanzar el alvéolo, a diferencia de los antígenos causantes de asma, que son mayores (diámetro de aproximadamente 30 μm). Además, son antígenos que se comportan como potentes adyuvantes en la respuesta inmunológica, pueden activar la cascada del complemento por la vía alterna, estimular a los macrófagos (ej. glucano de la pared celular de hongos) y la respuesta celular retardada. Por último, suelen ser resistentes a la degradación enzimática (ej. mucina intestinal de la paloma). ^(46,48)

Además del antígeno en sí mismo, el grado de exposición también es un factor importante en el desarrollo de la enfermedad. Se ha demostrado cómo una concentración elevada de antígeno aumenta la prevalencia de la enfermedad en el caso del pulmón de cuidador de aves y en el del pulmón de granjero. ⁽⁴⁹⁾

La respuesta inmunológica se caracteriza por la proliferación de linfocitos citotóxicos CD8⁺ y por la producción de anticuerpos específicos, principalmente de isotipo IgG, debida a la proliferación de células plasmáticas estimuladas por los linfocitos CD4⁺ Th2. Todo ello ocurre después de que las partículas antigénicas han sido procesadas por los macrófagos. No sólo los individuos enfermos sino también la mayoría de individuos expuestos asintomáticos desarrollan lo que parece una respuesta inocua productora de IgG. La respuesta de anticuerpos no es suficiente para causar la enfermedad y se requiere también una respuesta citotóxica de linfocitos CD8⁺. Además, para el desarrollo de la neumonitis parecen necesarios otros factores. Los

agentes infecciosos o sus productos (p ej. endotoxinas bacterianas) pueden actuar como inmunomoduladores. Por otro lado, la existencia de una respuesta inflamatoria inespecífica parece ser el factor que en muchos casos de individuos sensibilizados pero sanos precipita el desarrollo de la enfermedad. Así, en algunos individuos expuestos durante varios años el inicio de los síntomas de la enfermedad puede ser producido por una infección respiratoria concurrente.⁽⁴⁷⁾

1.8 Diagnóstico

Como se ha comentado antes la neumonitis por hipersensibilidad es una enfermedad subdiagnosticada por lo que el primer paso para su detección será la sospecha clínica ante un paciente con cuadros repetidos de síntomas respiratorios y afectación sistémica, por lo que se debe interrogar al individuo sobre su trabajo actual y pasado y sus aficiones así como los productos que maneja.

1.9 NEUMOPATÍAS INTERSTICIALES SECUNDARIAS O ENFERMEDADES COLÁGENO-VASCULARES

La colágena, proteína constituyente de los tejidos conjuntivos, como la piel, los tendones y el hueso, es la proteína más abundante del organismo. Se caracteriza principalmente por su notable resistencia: es una fibra de 1 mm de diámetro y puede soportar una carga de 10 a 40 kg. La colágena está constituida por un conjunto de tres cadenas polipeptídicas (1.000 aminoácidos por cadena), agrupadas en una estructura helicoidal. La glicina constituye la tercera parte de los aminoácidos de cada cadena, hecho único entre todas las proteínas del organismo. La repetición de 333 tripletes de forma Gli-X-y preside la estructura de cada una de las cadenas. En la posición

X se encuentra, en la mayoría de los casos prolina hidroxilada, dos aminoácidos que no abundan en la constitución de las otras proteínas del organismo.

Existen como mínimo cuatro tipos de colágena genéticamente distintos (existen muchas más), en función de la estructura de las cadenas polipeptídicas o cadenas alfa. La estructura helicoidal, responsable de la rigidez y la resistencia de las fibras, es específica de la molécula de colágena.

La palabra colágena viene de la raíz griega "Kolla" que significa gelatina, goma o sustancia de unión; el término pues, caracteriza al tejido conjuntivo de origen mesenquimatoso. En este tejido se encuentran: a) La sustancia fundamental que es rica en albúmina y que tiene una materia viscosa y coloidal de las reacciones propias de los mucoides o glucoproteínas. En esta sustancia se encuentra el plasma nutritivo que no tiene una composición propia definida, pues es un medio metabólico activo que contiene agua, electrolitos, proteínas, fermentos y otros productos de intercambio celular, b) Las fibras son de dos clases, elásticas y las colágenas, que se presentan agrupadas. Su nombre viene de la transformación que sufren por la coacción. Además, hay fibras reticulares, c) Las células del tejido son los fibroцитos, pero se encuentran también células endoteliales, histiocitos, linfocitos, granulocitos, monocitos, esteatocitos, células plasmáticas, mastocitos y cromocitos, que pueden tener un origen en el mismo tejido o ser llevados a él por la circulación.

El tejido conjuntivo tiene funciones especiales, tales como de protección, de sostén, relleno, metabólicas y de defensa. No hay que olvidar que a veces se le encuentra con diferentes aspectos y es debido a que adquiere variantes cuando su disposición en el organismo lo requiere, para llevar a cabo funciones especiales.

Las enfermedades del tejido conjuntivo representan un grupo de enfermedades inflamatorias mediadas inmunológicamente, en las que pueden estar implicados distintos órganos y sistemas, entre ellos el aparato respiratorio a distintos niveles: vías aéreas, parénquima pulmonar, vasos pulmonares, pleura y tejido músculo-esquelético del tórax. La afectación pulmonar en la patología del tejido conectivo complica su manejo y en muchos casos empeora su evolución, siendo causa importante de morbilidad y mortalidad.

En ocasiones los síntomas respiratorios son la primera manifestación de la enfermedad, dificultando su diagnóstico. Se estima que aproximadamente en el 15% de pacientes que presentan NID subyace una enfermedad del tejido conectivo (ETC).⁽⁶⁰⁾

Las ETC más relevantes son: Artritis Reumatoide (AR), Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Esclerosis Sistémica (ES), Polimiositis/Dermatomiositis (PM/DM), Síndrome de Sjögren (SS), neumonitis por hipersensibilidad (NH) y Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo (EMTC).

1.9.1 Patogenia

Se ha descrito a la NH como causa probable, aunque no única de la progresión a la fibrosis. Las alteraciones observadas en la NH tienen gran parecido con las observadas en las enfermedades del colágeno-vasculares: aumento capilar, proliferación derivada del retículo, proliferación endotelial y acumulación de histiocitos, células plasmáticas y linfocitos durante los primeros períodos de la enfermedad y proliferación de neutrófilos y eosinófilos en los procesos más crónicos, y por fin, degeneración fibrinoide y necrosis. La hipersensibilidad es descrita como un factor patológico común, aunque no se conozcan bien los factores etiológicos. Patológicamente las alteraciones morfológicas del tejido conjuntivo, así como los cambios químicos en la sangre tiene un significado importante. Las manifestaciones morfológicas son:

degeneración mucoide por función fibroblástica alterada, lo cual va seguida de degeneración fibrinoide y necrosis, debido a la precipitación de los mucopolisacáridos ácidos con fibrinógeno y otras proteínas posiblemente de origen local. Posteriormente se desarrollaría una proliferación de fibroblastos, células plasmáticas y otros elementos mesenquimatosos. Asimismo, los cambios químicos que ocurren en la sangre reflejan las alteraciones que anteriormente hemos señalado. Están disminuidos La albúmina plasmática y el inhibidor de la colagenasa están disminuidos mientras que el fibrinógeno, la globulina alfa, la proteína reactiva C, mucopolisacáridos y el inhibidor inespecífico de la hialuronidasa se encuentran aumentados. Generalmente este aumento ocurre en las fases agudas y se normaliza durante las remisiones. Es un hecho comprobado también en las enfermedades del colágeno el aumento de las células plasmáticas en el tejido enfermo, así como en la médula ósea y en la sangre, y es sabido que estas últimas son las fuentes celulares de anticuerpos y de gamma globulinas. Las gamma globulinas anormales determinarían la lesión difusa de la mesénquima.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo general

Determinar si los niveles séricos de SPD, mir-21 y mir-155, pueden servir como Biomarcadores para diagnóstico diferencial de la FPI con respecto a la Neumonitis por hipersensibilidad y enfermedades colágeno-vasculares.

2.2 Objetivos específicos:

- Determinar los niveles séricos de SPD en suero de pacientes con FPI y NH, por ELISA.

- Determinar los niveles séricos de miR-21 y miR-155 en suero de pacientes con FPI y NH, por PCR en tiempo real.
- Analizar si existen diferencias significativas entre miR-21 y miR-155 con respecto a FPI

3. MARCO TEÓRICO

3.1 BIOMARCADORES SÉRICOS

Los biomarcadores son definidos como marcadores de un proceso o estado biológico, es una característica que es cuantificable de manera objetiva y sirve como indicador de un proceso biológico normal, patológico o de una respuesta a una intervención farmacológica ¹⁶. Los biomarcadores son utilizados para ayudar en el diagnóstico de una enfermedad y posteriormente podrían ser usados para monitorear si la terapia está siendo efectiva. Más tarde, estos pueden ser usados para el monitoreo de enfermedades recurrentes. Identificando los Biomarcadores se pueden incluir como pruebas diagnósticas, y el estado de salud de la persona.¹⁶

Las normativas publicadas sobre el diagnóstico y tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) son establecidas, para conceptualizar la evolución de la enfermedad y juzgar las respuestas al tratamiento, 3 categorías definidas como mejoría, estabilización y empeoramiento, que se basan en el conocimiento de la intensidad de las variaciones porcentuales que experimenta la capacidad vital forzada o la capacidad de difusión de monóxido de carbono, la variación absoluta que sufre la diferencia alveolo arterial de oxígeno y la apreciación de la evolución clínica (concretamente el grado de disnea) y radiológica, a lo largo del tiempo. ^{33,34}

Si bien se sabe que el determinante más sólido que marca el pronóstico y la supervivencia de los pacientes con neumonías intersticiales idiopáticas es el patrón histológico de la enfermedad en el pulmón ³⁵, el porcentaje de pacientes que se someten a una biopsia pulmonar no suele ser superior a un 30%. Con independencia de si el diagnóstico se alcanza por medio del análisis histológico o por criterios clínico-radiológicos, el seguimiento de estos pacientes, en general, se ha venido realizando mediante un conjunto de análisis del comportamiento de las variables clínicas, funcionales y radiológicas a las que hemos aludido. Sin embargo, en las últimas décadas, en consonancia con un mayor conocimiento de los mecanismos patogénicos de la enfermedad ^{36,37} ha habido una acelerada búsqueda de marcadores séricos que puedan estimar la eventual respuesta terapéutica, servir como marcadores de actividad útiles en el seguimiento de los pacientes y predecir la supervivencia.

3.2 PROTEÍNA D DEL SURFACTANTE

El epitelio pulmonar secreta muchas proteínas entre las que destacan el surfactante y varias proteínas importantes para la inmunidad protectora y la función pulmonar. Algunas de estas proteínas están presentes en pequeñas cantidades en la sangre, así como el fluido bronquiolo-alveolar. A medida que estas proteínas son principalmente, si no exclusivamente, secretadas dentro de las vías respiratorias su aparición en el compartimento vascular en el cual se supone es el resultado de salida de fluidos de los pulmones en el torrente sanguíneo, los cuales se pueden utilizar como Biomarcadores de lesión pulmonar y la presencia de estas proteínas en la sangre refleja la extensión de la disfunción alveolar en la barrera alveolo-capilar. ⁽¹¹⁾

Diversos estudios han relacionado los componentes del surfactante alveolar, con la regulación de la síntesis, degradación y depósito de las proteínas de la matriz extracelular y con

la proliferación y actividad de fibroblastos. Takahashi et al⁽¹³⁾ encontraron que los valores séricos elevados de SP-D predecían un deterioro acelerado de la función pulmonar y los valores séricos elevados de las proteínas A y D del surfactante (SP-A Y SP-D) eran indicadores de una menor supervivencia. Otros estudios han corroborado esta relación entre concentraciones séricas elevadas de estos marcadores y la supervivencia. ⁽¹⁾

Las proteínas pulmonares endógenas específicas, como proteínas del surfactante A y B (SP-A Y SP-B) se detectaron por primera vez en la sangre de los niños con síndrome de dificultad respiratoria, desde entonces el interés ha crecido considerablemente, lo que refleja los aspectos científicos y clínicos y la importancia de la identificación de Biomarcadores en la patofisiología respiratoria.

De entre los biomarcadores más importantes de lesiones pulmonares, que pueden ser detectados en el plasma, son el SP-A y el SP-D⁽¹¹⁾

Las SP-A y SP-D son proteínas hidrofílicas de bajo peso molecular pertenecientes a la superfamilia de la lectina tipo C y producidas por los neumocitos tipo II y las células de clara.

El surfactante D (SP-D) es una proteína homotrimérica que es secretada por lectinas solubles tipo C con dominios de colágeno pertenecientes a este grupo denominados colectinas, estas se componen de unidades estructurales compuestas de tres cadenas polipeptídicas de 43 kDa, cada cadena tiene dodecámeros predominantemente con (cuatro subunidades triméricas) cuatro dominios :

1) una región N-terminal con residuos de cisteína implicados en la oligomerización de la molécula madura de SP-D

- 2) una región de colágeno con hidroxilados de lisina y residuos de prolina.
- 3) una región de cuello enrollado α -helicoidal donde se inicia la formación de la unidad trimérica inicial
- 4) carbohidratos dependientes de calcio con un dominio de reconocimiento (CRD) en el extremo C-terminal que son conservadas en todas las especies ^[12].

La proteína madura SP-D es oligomerizada en una molécula dodecamérica con cuatro unidades triméricas que intervienen juntas en la región N-terminal y dos residuos de cisteína en cada cadena de polipéptido. Estas familias de colectinas incluyen otros miembros como el surfactante de la proteína A (SP-A) y la unión de manosa vinculada con lectina (MLB). La afinidad de un CDR a un solo carbohidrato de un único epítipo que se encuentra en la superficie de un microorganismo patógeno es baja. Sin embargo, a través de la formación de la unidad trimérica y la oligomerización adicional de la molécula está, madura, las colectinas tienen una alta avididad por estructuras de carbohidratos repetidos como se ve en microorganismos. SP-D promueve la aglutinación y la fagocitosis de los microorganismos, tiene un efecto quimiotáctico sobre los fagocitos, modula la respuesta inflamatoria y tiene un efecto directo antimicrobiano. Algunos estudios han demostrado que la expresión de SP-D puede estar relacionada con una serie de enfermedades humanas: la fibrosis quística, neumonía intersticial aguda (SDRA), asma, displasia broncopulmonar, proteinosis alveolar etc. ⁽⁶⁾¹³.

La SP-D juega un papel en la defensa inmune, actuando como una opsonina mejora la fagocitosis y parece ser que la concentración de la proteína se relaciona mejor con la extensión del daño del parénquima pulmonar ⁽¹⁹⁾. SP-D fue aislada originalmente del surfactante del pulmón, pero se ha sido demostrado que se expresa en todas las superficies mucosas incluyendo el aparato genitourinario y el gastrointestinal. SP-D puede ser aislada a partir de diversos fluidos

corporales, incluyendo el líquido amniótico, lavado broncoalveolar (BAL), la saliva y el fluido lagrimal ⁽¹²⁾

3.3 miRNAs

A pesar de los progresos significativos y la comprensión de la fibrosis en ratones la patogenia de esta en humanos no está completamente entendida. La lesión de la célula epitelial alveolar y la deficiente reparación es el principal proceso patológico observado en pacientes con FPI, una característica distintiva es el desarrollo de áreas con focos de fibroblastos que representa la actividad de la fibrosis, dentro de estos focos la mayoría de las células son miofibroblastos que son la fuente principal de producción anormal de la matriz extracelular. El fenotipo de un pulmón con FPI es muy diferente al de un pulmón normal y se refleja en la participación de múltiples vías como la coagulación, apoptosis, transición epitelial mesenquimal y el desarrollo de procesos.³

Los patrones globales de expresión de RNAm también son dramáticamente diferentes (16-24) En conjunto estas observaciones sugieren que el mecanismo que afecta a las propiedades fundamentales de una célula o de un órgano puede estar asociado en la patogénesis de la FPI.³

Los microRNA (miRNA) son cadenas de 19-23 nucleótidos (nt), son RNAs que pueden desempeñar importantes funciones reguladoras en los animales y plantas y están dirigidos contra los RNAm para la represión de la traducción, los miRNAs comprenden una de las clases más abundantes de moléculas reguladoras de genes en organismos multicelulares y pueden participar en la salida de muchos genes codificadores de proteínas.^{22,23} Los miRNAs, son pequeñas moléculas de RNA que juegan un papel crítico en varios procesos fisiológicos tales como el desarrollo del tejido, la diferenciación, la proliferación celular, y la reparación del tejido ^{25, 26},

han surgido en la última década en órganos clave reguladores de los fenotipos y son blancos potenciales para las intervenciones terapéuticas en múltiples enfermedades.²⁷⁻³¹

Los miRNAs son cadenas sencillas de ARNm no codificante conservadas evolutivamente. Se ha demostrado que los miRNAs afectan la estabilidad del ARN mensajero y en algunos casos influye en la traducción de las proteínas a través de la secuencia parcial complementaria con la función de interactuar con el RNAm.

Los miRNAs Son reguladores post-transcripcionales que se unen a secuencias específicas bloqueando la traducción o causando la degradación del RNA mensajero, cosa que resulta en el silenciamiento de genes, los miRNA probablemente controlan las vías biológicas. Durante el envejecimiento la expresión desregulada de miRNAs se produce generalmente en grupos, lo que sugiere que sus acciones podrían ser funcionalmente coordinadas entre sí por reguladores transcripcionales comunes. Con la edad la disrupción de esta función coordinada contribuye al desarrollo de enfermedad ²¹

El descubrimiento de microRNAs son una nueva clase de reguladores en la expresión de genes y se sigue a la búsqueda de más actividades. Son numerosos los miRNAs que son encontrados presentes en suero, plasma y otros fluidos de humanos y ratones en altas concentraciones (15-20). Estas observaciones causan expectativas en dos aspectos; 1) Son moléculas encontradas fuera de la célula en altas concentraciones y 2), Estas moléculas son estables fuera de la célula.

Los miRNAs se han visto implicados en cáncer, en enfermedades cardíacas y enfermedades neurodegenerativas, la diabetes e inflamación [³⁸]. Por otra parte, los miRNAs han sido involucrados en muchas formas en la fibrosis del tejido (³⁹). Sin embargo, se siguen haciendo

determinaciones de la expresión diferencial de los miRNAs para ver si contribuyen a las variaciones en la progresión clínica de la fibrosis pulmonar. ⁽¹⁵⁾.

Los miRNAs se ajustan al tiempo de la expresión génica por numerosos procesos celulares en varios organismos eucarióticos. En organismos multicelulares esto afecta el desarrollo de la traducción y funciones específicas de la célula. Los miRNAs son más de 500 en humanos y 450 en ratones, Los métodos computacionales predicen que los miRNAs podrían regular más de un tercio de genes que codifican las proteínas, esto implica que regulan muchos procesos fisiológicos. Adicionalmente, muchos mediadores pro fibróticos, tales como TGFB regulan la expresión de miRNAs. ²⁰

Aunque se han realizado varios estudios en genética, epigenética y proteómica, recientemente los estudios de la regulación de los miRNA en la fibrosis pulmonar idiopática recientemente han atraído mucha la atención. Nuevos estudios demuestran que los miRNAs están modulando la fibrosis en varios órganos incluyendo el pulmón, en lugar de trabajar a través de una vía los miRNAs regulan la expresión en el conjunto completos de genes ²

TABLA 2 Niveles de microRNAs en pulmones con FPI vs pulmones sanos.

Table 1. List of increased and decreased miRNA in rapidly progressive IPF biopsies (n = 9) when compared to normal lung samples (n = 10) with p < 0.05.

miRNA	p-value	Fold increase/decrease
miR-423-5p	0.0003	14.08
miR-155	0.0005	12.02
miR-128	0.0007	8.92
miR-374b	0.0062	7.87
miR-21	0.0325	6.75
miR-100	0.0052	6.40
miR-125b	0.0023	5.23
miR-140-3p	0.0047	3.97
miR-125a-5p	0.0330	3.94
miR-92a	0.0392	3.23
let-7c	0.0181	3.03
miR-181b	0.0379	-2.13
let-7d	0.0225	-2.42
miR-30c	0.0340	-2.80
miR-27b	0.0392	-3.16
miR-103	0.0055	-3.33
miR-30a	0.0305	-3.43
miR-424	0.0223	-3.91
miR-22	0.0091	-3.95
miR-186, miR-29a	0.0014	-4.22
miR-126	0.0115	-4.71
miR-27a	0.0215	-5.33
miR-20a	0.0094	-6.56
miR-143	0.0009	-6.69
miR-223	0.0021	-6.93
miR-17	0.0043	-7.46
miR-106b	0.0002	-7.52
miR-96	0.0111	-7.96
miR-140-5p	0.0033	-8.05
miR-15a	0.0003	-8.32
miR-30b	0.0003	-9.73
miR-130a	0.0003	-9.92
miR-222, miR-30e	0.0004	-10.54
miR-29c	0.00003	-11.87
miR-18a	0.0001	-14.58
miR-29b	0.0002	-15.81
miR-142-5p	0.0014	-17.92
miR-144	0.0202	-20.07
miR-423-3p	0.0024	-22.50
miR-142-3p	0.0003	-27.70
miR-19b	0.0001	-28.47
miR-19a	0.00003	-32.63
miR-32	0.0012	-35.70
miR-101	0.000001	-45.83
miR-141	0.00001	-136.81

doi:10.1371/journal.pone.0021253.t001

TABLA 3 Efectos de algunos microRNAs involucrados en el desarrollo de FPI.

MicroRNA	Effect	Organism	Organ	Reference
miR-155	Profibrotic	Human, mouse	Lung	52,32
let-7d	Antifibrotic	Human, mouse	Lung	32
miR-21	Profibrotic	Human, mouse	Lung, heart	41,73,32
miR-29	Antifibrotic	Human, mouse, rat	Lung, liver, heart	59,74,32,58
miR-30	Antifibrotic	Human, rat	Heart, lung	75,32
miR-133a	Antifibrotic	Mouse, human, rat	Liver, heart	75,76
miR-192	Profibrotic	Rat, mouse	Kidney	77,78
miR-215	Profibrotic	Mouse	Kidney	79
miR-216, miR-217	Profibrotic	Mouse	Kidney	80
miR-377	Profibrotic	Mouse	Kidney	81
miR-132	Antifibrotic	Mouse	Liver	82
miR-150, miR-194	Antifibrotic	Rat	Liver	83
miR-15b, miR-16	Antifibrotic	Rat	Liver	84
miR-27a, miR-27b	Profibrotic	Rat	Liver	86
miR-208	Profibrotic	Mouse	Heart	87

Aproximadamente 10% de los microRNAs muestran cambios significativos en el pulmón con FPI. Entre los microRNAs que son más significativos son miembros de la familia de let-7, mir-29 y mir-30 o bien los miR17~92 entre los grupos de regulados up stream son mir-155 y mir-21.

3.4 miR21 EN LA FIBROSIS PULMONAR

Liu et al estudiaron el papel de miR-21 en FPI.⁵⁹ Ellos mostraron que la expresión de miR-21 se incrementa en los pulmones de ratones tratados con bleomicina, así como en los de los pacientes con FPI donde se localizan miofibroblastos. La inhibición de miR-21 en los pulmones tratados con bleomicina reduce la gravedad de la fibrosis y la diferenciación de miofibroblastos. TGF β induce la expresión de miR21 y miR21 los cuales vuelven a incrementar los niveles de TGF β 1 y la activación fibrogénica de fibroblastos pulmonares inhibidos por la inhibición Smad y Smad7 y por la reducción Smad 2 por la fosforilación.

Estudios previos prueban que miR21 está involucrado en las vías de señalización de TGF β 1 y está estimula la expresión corriente arriba de miR21, el cual es un mediador del efecto de TGF β 1 en células humanas del músculo vascular liso.⁷⁰ Una correlación significativa entre la expresión de miR21 son los niveles TGFB1 fundamentados en el cáncer de seno⁷¹, miR21 está sobre-expresado en muchos tipos de cáncer y se dirige a varios genes supresores de tumores incluyendo la tropo miosina.^{1,62}

La primera observación es que miR21 aumenta los niveles de miofibroblastos en pulmones con FPI y es probable que su inhibición pueda limitar la fibrosis o estimularla El concepto de que los microRNAs son una clave reguladora de la fibrosis y que estas

intervenciones afectan la expresión y a su vez la modulación de la fibrosis. Más específicamente, los resultados sugieren que la modulación de miR21 y sus objetivos deben ser evaluados como una probable estrategia terapéutica futura en FPI.

3.5 miR155 EN LA FIBROSIS PULMONAR

Pottier et al⁵³ han demostrado que hay un aumento en la expresión de miR-155 después del tratamiento con TNF- α e IL-1 β , así como reducción de la expresión después de tratamiento con TGF β 1 en fibroblastos de pulmón humanos. Estudios funcionales han demostrado que el factor de crecimiento de queratinocitos (FGF-7) fue un objetivo directo de miR-155 y que la transfección causa la migración de fibroblastos. La regulación corriente arriba de miR-155 se correlacionó con el grado de fibrosis pulmonar en ratones C57BL/6 y ratones BALB/c después de la administración de bleomicina.

Aunque los autores no determinaron si miR-155 es efectivamente un regulador up stream en los pulmones de los pacientes con FPI, se observó la regulación positiva de mir-155 en la FPI, miR-155 se procesa a partir de un exón de un ARN no codificante transcrito a partir de la célula B integrado en un grupo localizado en el cromosoma 21. miR-155 está implicado en la diferenciación y la regulación de las células hematopoyéticas originales⁶⁴ y es altamente sobreexpresado en los linfomas de células B de origen activo. Los ratones transgénicos sobreexpresan miR-155 en las células en el desarrollo de células pre-B con desórdenes linfoproliferativos, que más tarde progresan hasta completar linfomas de células B.⁶⁵

Uno de los primeros descubrimientos de los miRNAs 155 que es relevante en la fibrosis es el receptor de la angiotensina II tipo I (AT la globulina alfa, la proteína reactiva C,

mucopolisacáridos y el inhibidor inespecífico de la hialuronidasa 1R) ⁶⁷. Un aumento en los niveles del receptor AT1R parece contribuir al proceso fibrótico en la síntesis de colágeno y la actividad de los fibroblastos se ve reforzada en respuesta a la estimulación de AT1R, ⁶⁷ esta última se incrementa en ratones tratados con bleomicina y en pulmones del FPI donde se puede localizar fibroblastos intersticiales. ⁶⁸

Aunque, no está claro si la modulación de mir-155 afectará el fenotipo del pulmón con fibrosis, los resultados publicados sugieren que miR-155 debe incluirse en los miRNA dirigidos a la intervención con fines terapéuticos en la fibrosis pulmonar.

3.6 INMUNOENSAYO ENZIMATICO

Los inmunoensayos desempeñan funciones vitales en el diagnóstico de enfermedades, la vigilancia del grado de respuesta inmune humoral y la identificación de moléculas de interés biológico o médico. Estas valoraciones difieren en su rapidez y sensibilidad; algunas son estrictamente cualitativas, otras son cuantitativas.

El Inmunoensayo enzimático es una técnica en la cual uno de los reactantes, el anticuerpo o el antígeno, se fija a un soporte sólido previamente a su interacción con el reactante complementario. Debido a esta característica de la técnica y al uso de anticuerpos acoplados a enzimas la técnica se describe como ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

3.7 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, ¹ cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN

particular, partiendo de un fragmento; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas.

Termociclador: aparato en el que se efectúa la PCR convencional, todo el proceso de la PCR está automatizado mediante este aparato, este permite calentar y enfriar

3.8 PCR EN TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) es una de las tecnologías de apoyo de la era genómica y se ha convertido en el método de elección para la detección de ARNm, (Bustin 2000).⁽¹³⁾ Varios factores han contribuido a la transformación de esta tecnología en una herramienta de investigación principal.⁽⁵⁾

El molde inicial es ARN y se requiere de una transcriptasa inversa, para realizar la conversión del ARN a un tipo de DNA llamado cDNA (ADN complementario).

Es una de las herramientas principales de investigación: (i) como un ensayo homogéneo que evita la necesidad de un procesamiento posterior a la PCR, (ii) un amplio rango dinámico (10⁷ veces) que permite la comparación directa entre los ARN que difieren ampliamente en su abundancia, y el ensayo tiene el potencial cuantitativo de la PCR, así como un ensayo cualitativo (Ginzinger 2002).¹⁰

La Transcripción inversa es el pequeño paso de conversión de RNA en un cDNA, existe una importante contribución a la variabilidad y falta de reproducibilidad frecuentemente

observado en experimentos de RT-PCR. En primer lugar, el estado dinámico de las células hace que sea inevitable que exista una variación inherente en el ARN preparado a partir de muestras biológicas. En segundo lugar, la purificación del ARN puede ser de calidad variable y, una vez extraído, es inestable. En tercer lugar, la eficiencia de la ARN-a cDNA en la conversión es dependiente sobre su abundancia en la muestra. Es significativamente más bajo cuando las plantillas de destino son raras (Karrer et al. 1995) y se ve afectada negativamente por ser no específica o de poco ácido nucleico presente en la Reacción de RT (Curry et al. 2002, Stahlberg et al. 2004b).

3.9 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El objetivo es aumentar el número de copias de un fragmento dado de ADN. Para lograrlo existen tres pasos esenciales que se repiten de 25-35 ciclos en el termociclador la cual aumenta o disminuye la T° de los tubos que contiene la reacción de PCR en periodos cortos de tiempo ⁽⁵⁾

Desnaturalización:

Consiste en separar la doble cadena de DNA separando los enlaces entre las hebras dobles convirtiéndolas en hebra sencilla 94-95°/ 45 seg.

Alineamiento:

Los iniciadores se unen a las hebras guías mediante complementariedad de bases. Los mismos se hibridan en regiones específicos de la hebra sencilla de ADN (depende de los T_M de iniciadores)

T_m Se define como la T° a la cual el 50% de los oligonucleótidos presentes en la reacción se han hibridado con su hebra complementaria.

Extensión:

La unión del primer y la hebra guía es reconocida por la DNA polimerasa la cual va colocando nuevos nucleótidos de acuerdo a la secuencia de la hebra guía. la polimerasa reconoce esta secuencia que por complementariedad forma DNA de hebra doble y comienza a colocar bases nitrogenadas. La polimerasa va colocando los dinucleótidos trifosfatos (dNTP's) de 5'-3' leyendo el DNA DE 3'-5' la T° que se utiliza para la extensión es de 72°. (8)

3.9.1 PCR EN TIEMPO REAL (qPCR)

La principal característica de la reacción de qPCR es que permite cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra original. Se puede dividir en las técnicas basadas en fluorocromos no específicos y en técnicas basadas con sondas específicas.

En las técnicas basadas en fluorocromos, el ADN, se multiplica su cantidad con cada ciclo este se une al fluorocromo (generalmente SYBR Green) produciendo fluorescencia que es medida por el termociclador apto para RealTime PCR. Permite cuantificar sólo una secuencia por reacción, pero tiene la ventaja de utilizar primers normales para su realización. Es mucho más económica que la realización de PCR Tiempo real con sondas específicas.

Las técnicas basadas con sondas específicas utilizan una *sonda* unida a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (*forward*) y el inverso (*reverse*), cuando la sonda está intacta, presentan una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se produce cuando la sonda está dañada y los dos fluorocromos están distantes, producto de la actividad 5'-3' exonucleasa del ADN polimerasa. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen.

La mayoría de estos inconvenientes se han solucionado con la introducción de la PCR realizada en tiempo real (q-PCR), que elimina cualquier proceso post-PCR puesto que monitoriza la progresión de la amplificación en el momento en que ocurre. A diferencia de la PCR convencional (en punto final), que mide la acumulación ADN al final de un número predeterminado de ciclos, con q-PCR esto se hace durante el proceso de amplificación usando fluorescencia, de forma que su aumento es proporcional a la cantidad de ADN formada. El proceso se puede automatizar fácilmente usando un sistema que realice la amplificación (termociclador) y que a su vez sea capaz de leer fluorescencia.

Estos métodos permiten que el recipiente de reacción deba permanecer sellado durante todo el proceso. A diferencia de los métodos de punto final en una concentración final de amplificación tiene poca relación con la concentración inicial de plantilla, los métodos en tiempo real muestran una buena correlación entre el termociclador y las claras señales medibles (normalmente se conoce como el ciclo umbral o CT) y la concentración de la plantilla de partida. Por lo tanto, los métodos en tiempo real son enfoques eficaces de la cuantificación de la plantilla. Como resultado, estos métodos se conocen como métodos de PCR cuantitativa (qPCR) a menudo.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Población de estudio

Se van a incluir en el estudio 52 pacientes con FPI, 54 pacientes con enfermedad pulmonar intersticial no relacionada con FPI, 56 pacientes con enfermedad pulmonar no intersticial y 36 controles pareados por edad para poder ser estudiados por la técnica de ELISA. Los pacientes que se van a incluir en el estudio de miRNAs son 10 pacientes con FPI, 10 pacientes

con enfermedad pulmonar intersticial no relacionada con FPI, 10 pacientes con enfermedad no intersticial y controles

Criterios de Inclusión para pacientes

1) Pacientes del INER con diagnóstico documentado de FPI, Neumonitis por hipersensibilidad o neumopatía secundaria a enfermedad colágeno-vascular según las guías de ATS/ERS/JRS/ALAT.

2) Hombres o mujeres de 30 años de edad o mayores.

3) Que hayan firmado el consentimiento informado por escrito.

4) Disponibles para las visitas del estudio

Criterios de Exclusión para pacientes

1) Cualquier signo de enfermedad aguda (exacerbación aguda) en los 30 días anteriores a la visita 1.

2) Diagnóstico conocido de otros trastornos respiratorios importantes (tuberculosis, sarcoidosis, aspergilosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica)

3) No dispuesto o incapaz de efectuar las pruebas de función respiratoria.

Criterios de Inclusión para sujetos sanos

1) Hombres o mujeres de mayores de 40 años

2) Que hayan firmado el consentimiento informado

3) Que no se conozcan portadores de enfermedad pulmonar

Criterios de Exclusión para sujetos sanos

1) Cualquier signo de enfermedad aguda en los 30 días anteriores a la visita 1

2) Diagnóstico conocido de otros trastornos respiratorios importantes (tuberculosis, sarcoidosis, aspergilosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica)

3) Patrón obstructivo o sugerente de restricción pulmonar posterior a la espirometría

4.2 Obtención de sueros

Se obtuvieron 15 ml. de sangre de vena periférica tanto en pacientes como en controles la cual se centrifugó a 2500 rpm para separar el suero, el cual será almacenado a -70°C, hasta su uso.

Alícuotas de suero

Se tomará una alícuota de 250µl de suero y de plasma para su posterior uso por la técnica de ELISA.

4.3 Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima. (ELISA)

Las determinaciones de las proteínas se harán de acuerdo a las instrucciones del fabricante de los estuches de BIOVENDOR ELISA. Este procedimiento se llevará a cabo de acuerdo al inserto proporcionado en el catálogo del bioVendor Research and Diagnostic Products. Human Surfactant Protein D Elisa Cat. No. RD 19405910. La concentración de proteínas en suero es muy alta por lo que se tuvieron que hacer diluciones 1/20 en el buffer del estuche. En este caso las diluciones se hicieron con el buffer de dilución que viene en el estuche de biovendor específicamente para SP-D y la dilución que se hizo fue 1/20.

4.4 Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima. (ELISA) para SP-D.

Protocolo para ELISA Proteína D del surfactante humano Biovendor Research and Diagnostic Products cat. No.: RD194059101

Procedimiento de Ensayo:

1. Pipetear 100µL (de estándares, controles de calidad, buffer de dilución (= blanco) y las muestras de suero diluido 1 en 20, por duplicado, en los pozos adecuados.
2. Incubar la placa entre 23 a 27°C durante 2 horas, agitando a 300 rpm en un agitador de microplacas.
3. Los pozos se lavaron 5 veces con solución de lavado (0,35 ml por pozo). Después del lavado final, se invirtió y sacudió la placa firmemente contra el papel absorbente. Se añadieron 100µl de la solución con el anticuerpo marcado con biotina en cada pozo.
4. La placa se incubó a 23 a 27°C durante 1 hora, agitando a 300 rpm en un agitador de microplacas
5. Los pozos se lavaron 5 veces con solución de lavado (0,35 ml por pocillo). Después del lavado final, se invirtió y sacudió la placa firmemente contra el papel absorbente.
6. Se añadió 100µl de estreptavidina-HRP conjugado en cada pozo.
7. Se incubó la placa a 23 a 27 ° C durante 1 hora, agitando a 300 rpm en un agitador de microplacas
8. Los pozos se lavaron 5 veces con solución de lavado (0,35 ml por pocillo). Después del lavado final, invertir y sacudir la placa firmemente contra el papel absorbente.
9. Se añadieron 100µl de solución de sustrato en cada pocillo. Evitando la exposición de las microplacas a la luz solar directa, cubriendo la placa con aluminio.
10. Se Incubo la placa durante 15 minutos a 23-27°C. No agitar la placa durante esta incubación.
11. Se detuvo el desarrollo del color mediante la adición de 100 µl de solución de stop.
12. Se determinó la absorbancia de cada pocillo utilizando un lector de microplacas ajustado a 450 nm, preferiblemente con la longitud de onda de referencia fijado a 630 nm (rango

aceptable: 550 - 650 nm). La absorbancia debe ser leída dentro de los 5 minutos después del paso 12.

Cálculos la lectura de absorbancia de las microplacas:

La mayoría de los lectores de microplacas realizan cálculos automáticos de la concentración del analito. La curva estándar se construye trazando la absorbancia media (Y) de los estándares frente a la concentración conocida (X) de los estándares en escala logarítmica, utilizando el algoritmo de cuatro parámetros. Los resultados se informan como la concentración de Proteína Surfactante D (ng/ml) en las muestras.

Alternativamente, se puede utilizar la función logit log para linealizar la curva estándar, es decir el logit de la absorbancia media (Y) se representa frente al log de la concentración conocida (X) de los estándares.

La concentración medida de las muestras y los controles de calidad calculados a partir de la curva estándar debe multiplicarse por su respectivo factor de dilución, porque las muestras y los controles se han diluido antes del ensayo, ejem. 13,5 ng/ml (de la curva estándar) x 11 (factor de dilución) = 148,5 ng/ml.

4.5 PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE miRNAs, miRNease Serum/

Plasma Kit (CAT. NO. 217184)

Este protocolo es para el ARN total, incluyendo pequeños RNAs, a partir de pequeños volúmenes (hasta 200µl) de suero, plasma, u otros fluidos corporales.

1-. Se descongelaron las muestras de suero y plasma.

2.- Se Añadieron los volúmenes de reactivo de lisis Qiazol a la muestra (por ejemplo, por 200µL de la muestra, añadir 1 ml de reactivo de lisis Qiazol). Mezclando mediante agitación o pipeteando arriba y abajo.

3.- Se incubó el tubo ya homogeneizado a temperatura ambiente (15-25°C) durante 5 min.

4.- Se añadieron 3,5 µl miRNeasy Suero / plasma Spike-En el control (de $1,6 \times 10^8$ copias / µL)

5.- Se añadió cloroformo volumen a volumen a la muestra de partida y el tubo se tapa de forma segura (por ejemplo, para la muestra 20µL, añadir 20µL de cloroformo). Agitando vigorosamente durante 15 s

6.-Se Incubó a temperatura ambiente durante 2-3 min

7.- Se centrifugó la muestra durante 15 min a 12.000 xg a 4 ° C

8.-Se transfirió la fase acuosa superior a un nuevo tubo de colección, después se transfirió la interfaz adicionando 1.5 volúmenes de etanol al 100% (por ejemplo, para 600µL de fase acuosa, añadir 900µL de etanol) Mezclando con pipeta.

9.- Se pipetearon 700µL de la muestra, incluyendo cualquier precipitado, en una columna de colección de MinElute RNeasy y colocándolo en un tubo de colección de 2ml, cerrando la tapa y centrifugando a $> 8000 \times g$. el 15s a temperatura ambiente. Descartando el sobrenadante

10.- Repetir el paso 9 usando el remanente de las muestras.

11.- Se añadieron 700µL de buffer para la columna de centrifugación MinElute RNeasy. Cerrando la tapa y centrifugando durante 15 s en $> 8000 \times g$. Descartando el sobrenadante

12.- Se pipetearon 500 μ L de buffer RPE en la columna de centrifugación MinElute RNeasy. Cerrar la tapa, y se centrifugar durante 15 segundos a 8000 xg. Descartar el sobrenadante.

13.- Se añadieron 500 μ L de etanol 80% a TGE para la columna de centrifugación MinElute RNeasy. Cerrar la tapa y centrifugar durante 2 minutos a > 8000 x g. Descartar el sobrenadante.

14 - . Se colocó la columna de centrifugación MinElute RNeasy en un nuevo tubo de recolección de 2 ml (Abriendo la tapa de la columna de centrifugación y centrifugando a máxima velocidad durante 5 minutos para secar la membrana. Descartando el sobrenadante.

15.- Se colocó de columna centrifugación MinElute RNeasy en un nuevo tubo colección de 1.5 ml. Adicionar 14 μ L de agua libre RNasa directamente en el centro de la membrana de la columna de centrifugación, cerrando la tapa suavemente y centrifugando durante 1 minuto a velocidad máxima para diluir el RNA.

16.- Reportar la concentración de Ácidos Nucleicos midiendo la absorbancia 260/280

4.6 Protocolo de RT

1.- Cuantificación del RNA por espectrofotómetro

2.- Dependiendo de la concentración del RNA que está en ng/ μ L sacar el cálculo para obtener 1 μ g/ μ L de muestra y ponerlo en un tubo para PCR

3.- Llevar la muestra a 8 μ L con agua DePC.

4.- En un tubo preparar 1 μ L de Buffer de DNAsa 10x y 1 μ L de DNAsa I esto por cada una de las muestras que se obtengan

5.- Incubar en un termociclador a 37° por 30 min

6.- Sacar del termociclador y agregar 1µL de EDTA (tiocianato de guanidina, urea, 2,- mercaptoetanol) para inactivar las RNAsas por cada tubo de muestra que se obtenga. Los miRNA son susceptibles de degradación por lo que no se añade EDTA y se pasa directo al paso 8.

7.- Incubar 10 min a 65°C en el termociclador

8.- Se prepara en un tubo la siguiente mezcla:

	µl
Muestra	2 µl
DNTP'S	0.15 µl
MASTER MIX	1 µl
10X BUFFER	1.5 µl
RNASAS INHIBITHOR	0.19 µl
AGUA	7.16 µl
PRIMER miR155- miR-21	3 µl

9.- Meter a termociclador con el siguiente protocolo:

25°C	55°	55°	00:10°	4°C
00:10	60:00	60:00	00: 05	α

10.- Guardar muestras a -20°C para su posterior uso en PCR

4.7 Protocolo para PCR

1.- Preparar la siguiente mezcla con las proporciones indicadas en la placa de PCR de un termociclador Icycler, las muestras se prepararon por triplicado, junto con los blancos.

pg de Sp-D	abs
100	3.4925
50	2.651
25	1.5355
12.5	0.7925
6.25	0.3735
3.13	0.1355
1.56	0.036

2.-Programar el termociclador ICYCLER dependiendo de la sonda que se va a usar, el tiempo y el tipo de PCR que se va a usar.

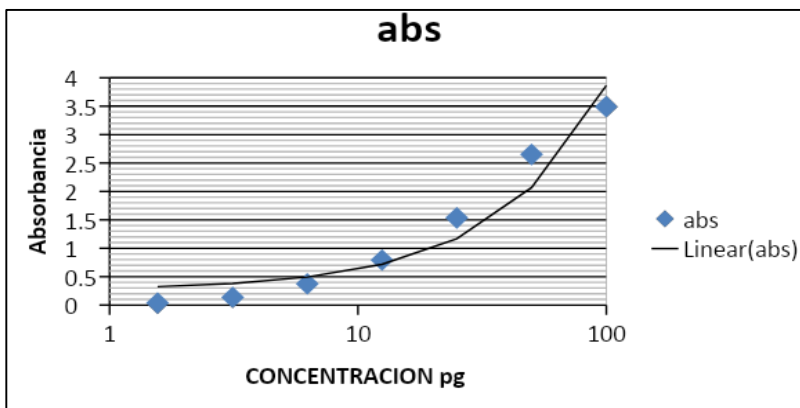
16 /30 min	42°/30 min	85/5 min	4°/∞
---------------	---------------	-------------	------

5. RESULTADOS

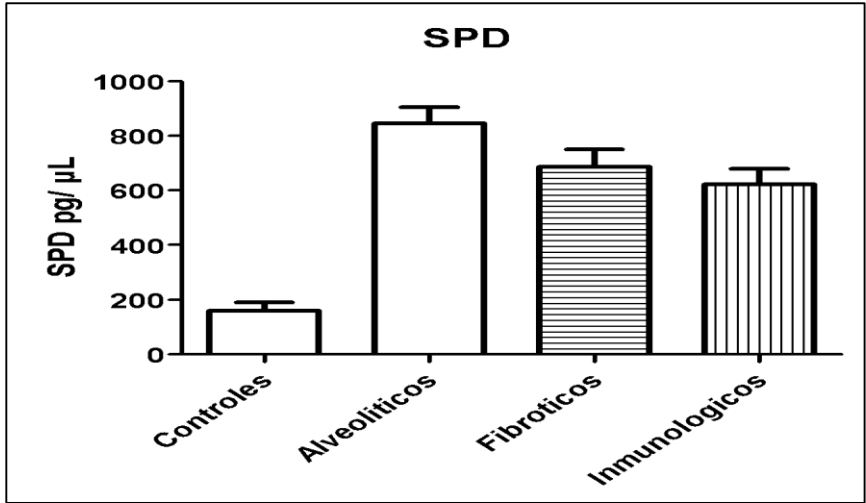
5.1 GRAFICAS

Gráficas de resultados de las absorbancias obtenidas del ELISA realizado para SP-D

Datos obtenidos para la curva estándar SP-D

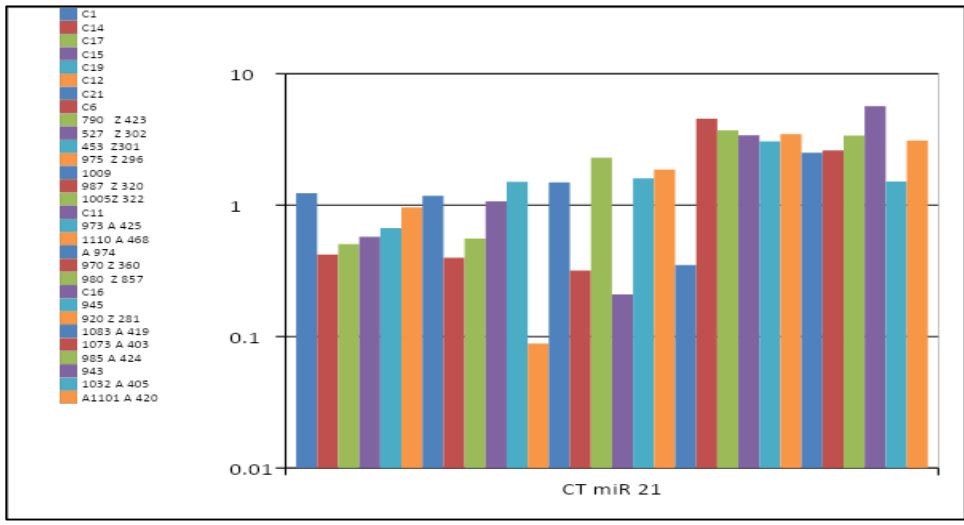


Gráfica 1.- Curva estándar (logarítmica)

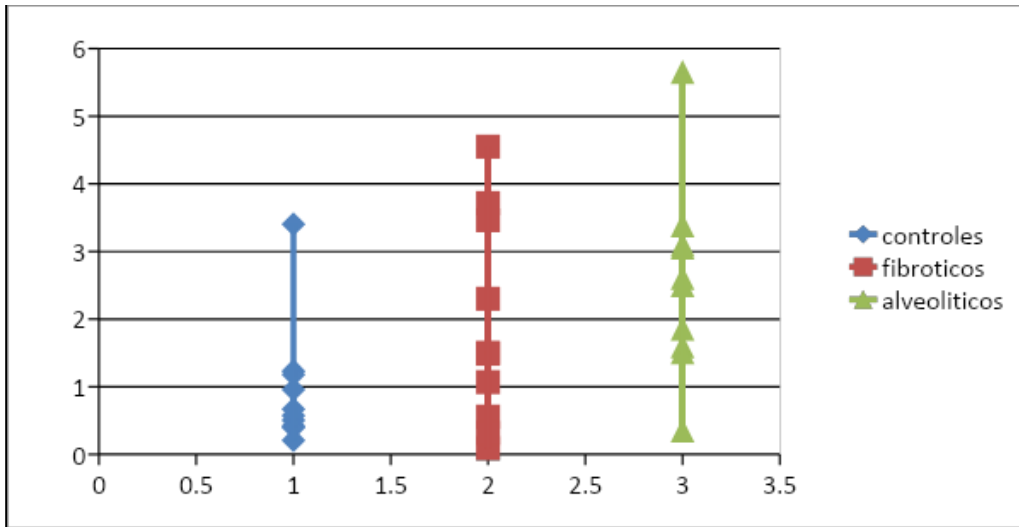


Gráfica 2.- comparación de los resultados de las absorbancias obtenidas de SP-D por grupo de enfermedades ELISA SPD

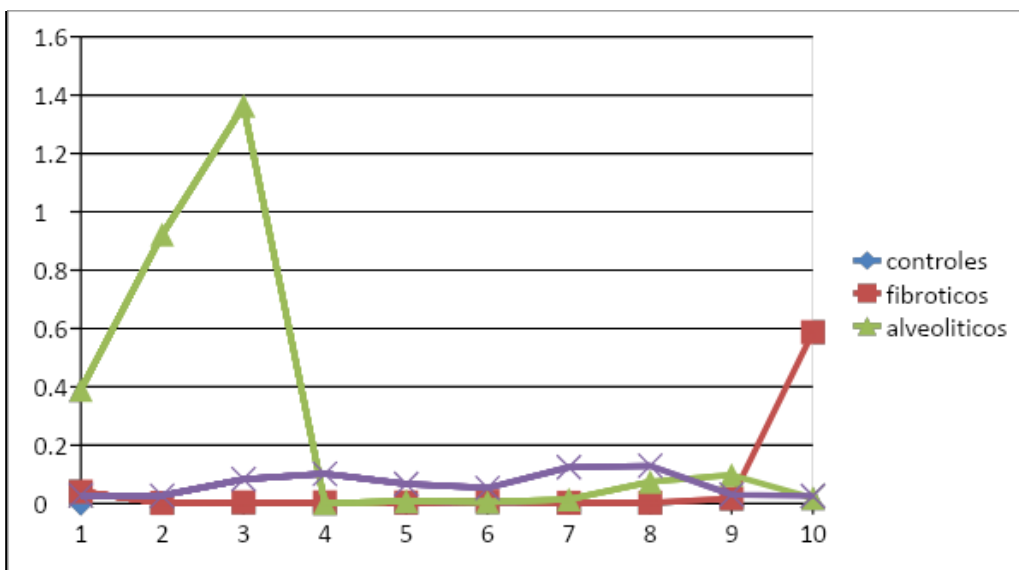
RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN DE miRNAS



Gráfica 1. Datos obtenidos en cada una de las muestras para miR155



Gráfica 4.- Datos obtenidos de mir-21 en cada uno de los grupos de pacientes.



Gráfica 5.- Datos obtenidos en cada uno de los grupos para mir155

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Análisis estadístico. La comparación de los datos de los distintos grupos a partir de las concentraciones obtenidas Sp-D se realizaron mediante ANOVA y las pruebas post hoc para

comparación múltiple con Análisis respectivamente Tukey. Se realizó después de la transformación logarítmica. En todos los análisis se adoptó un nivel de significancia $<0,05$. De acuerdo con otros estudios se realizaron con GRAD PAD VERSIÓN, SPSS 19.0 software Estadísticas

Los datos obtenidos de las concentraciones de miRNAs se graficaron en Excel

7. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS

El objetivo de este trabajo fue demostrar si existe una relación significativa en la expresión de algunos de los Biomarcadores detectados en suero que puedan servir como una forma de diagnóstico de las siguientes enfermedades: FPI, Alveolitis Alérgica y enfermedades colágeno- vasculares. No se alcanzó el objetivo deseado debido que no se contaban con suficientes muestras para poder llevar a cabo el estudio, Sin embargo, con respecto a los resultados, estos fueron obtenidos en el tiempo sugerido para este trabajo.

La cuantificación de la proteína SP-D por la técnica de ELISA para cada grupo demostró que no hay una diferencia significativa que demuestre que esta proteína se exprese en mayor concentración en alguno de los grupos Se encontró que en comparación con los controles se observó mayor expresión de esta proteína en cada uno de los grupos tanto en FPI, Alveolíticos, e Inmunológicos. Se encontró que existe una mayor expresión de la concentración de SP-D en el grupo con pacientes que presentan un diagnóstico con alveolitis alérgica.

En los resultados que se obtuvieron de los pacientes en los que se quería encontrar la expresión de alguno de los miRNAs (miR155-miR21) se encontró que hay una mayor expresión de miR-21 en las muestras, analizadas. Por grupo se encontró que existe una mayor expresión en

las muestras con Alveolitis alérgica y en el análisis de miR155 en el grupo de fibróticos, hay una mayor expresión de miR21.

En las dos técnicas usadas para determinar la expresión de estos Biomarcadores no se pueden tomar como confiables los resultados obtenidos por el tamaño de muestra.

8. CONCLUSIONES

Como conclusión debemos señalar que se han encontrado múltiples Biomarcadores séricos que han sido de gran ayuda para poder caracterizar el proceso fibrosante de la FPI y poder llevar a cabo un buen tratamiento. En este estudio no se encontraron resultados favorables que nos indiquen que sí existe una relación entre concentración del SP-D y miRNAs con relación al desarrollo de la enfermedad probablemente por el número limitado de muestras que se obtuvieron, Sin embargo, los artículos revisados para este demuestran que si existe una correlación

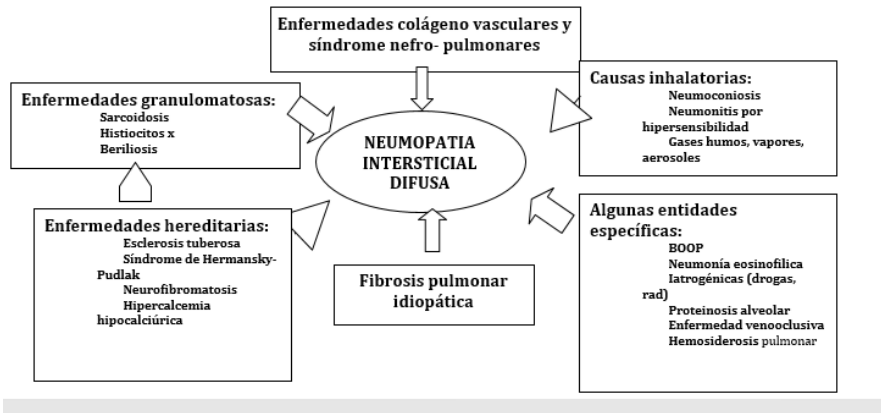
9. ANEXOS

Tabla 1: Clasificación de las neumopatías intersticiales difusas

PRIMARIA	Fibrosis Pulmonar Idiopática (neumonía intersticial usual; alveolitis fibrosante criptogénica)
SECUNDARIA	<p>Agentes agresores conocidos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Inhalación de partículas inorgánicas (neumoconiosis) ● Inhalación de partículas orgánicas (neumonitis por hipersensibilidad) ● Inhalación de gases, humos, vapores y aerosoles ● Medicamentos ● Radiaciones ● Venenos Aspiración crónica de reflujo gastroesofágico ● Infecciones ● Edema pulmonar crónico ● Uremia crónica ● Neoplasias
	<p>Agentes agresores o enfermedades de etiología desconocidos</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Enfermedades colágeno vasculares ● Sarcoidosis ● Histiocitosis x ● Síndromes Pulmonares hemorrágicos ● Enfermedades hereditarias ● Vasculitis pulmonares ● Espondilitis anquilosante ● Neumonía intersticial linfoide o linfocítica ● Neumonía intersticial de células gigantes ● Neumonía intersticial descamativa ● Neumonía organizada con bronquiolitis oblilaterante (BOOP) ● Linfagioleiomiomatosis

Figura 1: Esquema que resume las principales causas de una neumopatía intersticial

difusa



ANALIS EN GRADPHAD

Table Analyzed	Data 1				
One-way analysis of variance					
ANALISIS DE RESULTADOS					
P value	< 0.0001				
P valuesummary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	4				
F	25.61				
R squared	0.3343				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	22.24				
P value	< 0.0001				
P valuesummary	***				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table					
Treatment (between columns)	SS	df	MS		
Residual (within columns)	9788000	3	3262000		
Total	19490000	153	127400		
	29280000	156			
Tukey's Multiple Comparison Test					
Control vs Alveolíticos	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Control vs Fibroticos	-888.2	12.00	Yes	***	-898.8 to -475.6
Control vs Inmunológicos	-528.0	9.142	Yes	***	-740.8 to -315.2
Alveolíticos vs Fibroticos	-482.4	7.719	Yes	***	-683.1 to -241.7
Alveolíticos vs Inmunológicos	158.1	2.904	No	ns	-42.47 to 358.7
Fibroticos vs Inmunológicos	223.7	3.945	Yes	*	14.78 to 432.7
	65.62	1.145	No	ns	-145.6 to 276.8

10. REFERENCIAS

- 1.-Marcadores séricos en la fibrosis pulmonar idiopática. Implicación pronóstica Orlando Acosta Fernández, Servicio de Neumología. Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria. Santa Cruz de Tenerife. España.
- 3.-MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis KUSUM V. PANDIT, JADRANKA MILOSEVIC, and NAFTALI KAMINSKI PITTSBURGH, PA, 2011
- 4.-La fibrosis pulmonar idiopática Departamento de Medicina de la Universidad de California en San Francisco, CA, EE.UU.: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México (Prof. A. Pardo PhD), y el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Tlalpan. México (M Selman MD)
- 5.- genes Chapter 3 Methods in Molecular Biology and Genetic Engineering
- 6.- Human Surfactant Protein D Elisa Cat No 194059101
- 7.-Fibrosis Pulmonar Idiopática Moisés Selman Lama Neumopatías intersticiales difusas 1ª edición Editorial Medica Panamericana S.A. De CV Calzada de Tlalpan 5022. Col. La Joya 14090 México D.F.
- 8.- Bhargava M., and Wendt C. Biomarkers in acute lung injury. translational Research 2012; 159:205–217
- 9.- Antoniou KM, Alexandrakis MG, Siafakas NM, Bouros D. Cytokine network in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. Sarcoidosis Vase Diffuse lungs Dis.205; 22:91-104
- 10.- Quantitative real-time RT-PCR- a perspective S.A Bustin, V Benes, T Nolan and MW Pfaffl Journal of Molecular Endocrinology (2005) 34,597-601)

11. The sitting position during neurosurgical procedures does not influence serum biomarkers of pulmonary parenchymal injury OoIzabela Duda^{1*}, Konstancja Grzybowska¹, Halina Jędrzejowska-Szypułka² and Joanna Lewin-Kowalik²
- 12.- Surfactant Protein D Modulates HIV Infection of Both T Cells and Dendritic Cells Jens Madsen^{1,2*}, Gaurav D. Gaiha³, Nades Palaniyar⁴, Tao Dong⁵, Daniel A. Mitchell⁶, Howard W. Clark^{1,21}, Department of Child Health, Sir Henry Wellcome Laboratories, Clinical and Experimental Sciences, Faculty of Medicine, University of Southampton, Southampton General Hospital, Southampton, United Kingdom, 2 Institute for Life Sciences, University of Southampton, Southampton, United Kingdom, 3 Ragon Institute of Massachusetts General Hospital, Massachusetts Institute of Technology and Harvard, Charlestown, Massachusetts, United States of America, 4 SickKids Research Institute, University of Toronto, Toronto, Canada, 5 Medical Research Council Human Immunology Unit, Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, Oxford, United Kingdom, 6 Clinical Sciences Research Institute, Warwick Medical School, University of Warwick, Coventry, United Kingdom
- 13.- Bustin SA 2000 Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25 169–193
- 14.- Takahashi H. Fujishima T. Koba H. Uramaki S. Kurokawa K. Shibuya Y, et al Serum surfactant proteins A and D as prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis and their relationship to disease extent *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162: 1109-14
- 15.- Micro RNA Processing Defect in Rapidly Progressing Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Oak SR. Murray L. Herath A. Sleeman M, Anderson L, et al (2011) June 21
- 16.- Biomarkers of disease in medicine, Manoj Kumar and Shiv K Sarin Department de Hepatología, G.B Pant and Institute of liver and Biliary

17. Rojas-Espinosa, inmunología 3a edición editorial médica panamericana 2006
- 18.- Interacciones antígeno- anticuerpo principios y aplicaciones capítulo 6 pag 146-168
- 19.- Herman's C, Bernard A: Lung epithelium-specific proteins. Characteristics and potential applications as markers. Am J Respir Crit Care Med 1999,159:646–678.
- 20.- INTERSTITIAL Lung Disease1 New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. Isis E Fernandez, Oliver Eickelberg Lancet 2012;380:680-88
- 21.- Idiopathic pulmonary fibrosis Talmadge E. King Jr, Annie Pardo, Moises Selman Lancet 2011;378:1949-61
- 22.- MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function David P. Bartel^{1,2}, *1 Whitehead Institute for Biomedical Research
- 23.- Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells kai Wan –Shile Zhang, Jessica Weber, David Baxter and David j. Galas Institute for System Biology usa 7 July 2010
- 24.- Pandit KV Corcoran D, Youself H, et al. inhibition a role of led7d in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2010; 182:220-9
- 25.- Idiopathic pulmonary fibrosis, International Consensus Statement Am J Respir Crit Care Med 2000; 161 646-64
- 26.- Xaubert A, Ancochea J, Blanquer R Montero C, Morell F, Rodriguez – Becerra f. et al. Diagnostico y tratamiento de las enfermedades intersticiales difusas, Arch Bronconeumol. 2003; 39:580-600
- 27.- Flaherty K, Toews G, Travis W. Colby T. Kazerooni E. Gross B. et al Clinical significance of histological classification of idiopathic instircial pneumonia. Eur Respir j. 2002:19:275-83

- 28.- Noble P, Homer R. Idiopathic pulmonary fibrosis; new insights into pathogenesis. *Clin Chest Med.*2004;25:749-58
- 29.-Tsai LM, Yu D (2009) MicroRNAs in common diseases and potential therapeutic applications *Clin Exp Pharmacologic Physiol*
- 30.- Jiang X, Tsitsiou E, Herryk SE, Lyndsay MA (2010) MicroRNAs and the regulation of fibrosis *FEBS J*277;2015-2021
- 31.- Selman M. Hypersensitivity pneumonitis, En: *Interstitial lung disease*. 4th ed King, TE Jr, Schwarz MI (eds), B.C. Decker, Hamilton ON, Canada 2003: 452.
- 32.- Rose C, King TE. Controversies in hypersensitivity pneumonitis. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 1-2.
- 33.- López M, Salvaggio JE. Epidemiology of hypersensitivity pneumonitis/allergic alveolitis. *Monogr Allergy* 1987; 21: 70-86.
- 34.- Salvaggio JE. The identification of hypersensitivity pneumonitis. *HospPract* 1995; 30: 57-62.
- 35.- Terho EO, Husmank K, Vohlonen I. Prevalence e incidence of chronic bronchitis and farmer's lung with respect to age, sex, atopy and smoking. *Eur J Respir Dis Suppl* 1987; 152: 19-28.
- 36.- Ohtsuka Y, Munakata M, Tanimura K, Ukita H, Kusaka H, Masakiy et al. Smoking promotes insidious and chronic farmer's lung disease, and deterirates the clinical outcome. *Intern Med* 1995; 34: 966-971.
- 37.- Fink JN, Zacharisen MC. Hypersensitivity pneumonitis. En: Middleton E, Reed ChE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, editors. *Allergy: principles and practice*. St Louis: Mosby 1998: 994-1004.

- 38.- Patel AM, Ryu JH, Reed CE. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts and future questions. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 661-670.
- 39.- Bourke SJ, Dalphin JC, Boyd G, McSharry C, Baldwin CI, Calvert JE. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts. *Eur Respir J* 2001; 18 (Suppl. 32): 81s-92s.
- 40.- Malmberg P, Rask-Andersen A, Rosenhall L. Exposure to microorganisms associated with allergic alveolitis and febrile reactions to mold dust in farmers. *Chest* 1993; 103: 1202-1209.
- 41.- Adler BD, Padley SP, Muller NH, Remy Jardín M. Chronic hypersensitivity pneumonitis: high-resolution CT and radiographic features in 16 patients. *Radiology* 1992; 185: 91-95.
- 42.- Murayama J, Yoshizawa Y, Ohtsuka M, Hasegawa S. Lung fibrosis in hypersensitivity pneumonitis. Association with CD4+ but not CD8+ cell dominant alveolitis and insidious onset. *Chest* 1993; 104: 38-43.
- 43.- Kletch HH, Pohl WW. Use of bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. In *Pulmonary and critical care medicine*, Bone, RC, (ed), Mosby, St. Louis, Port M. Chapter 2, 1997; 1.
- 44.- Satake N, Nagai S, Kawatani A, Kaneshima H, Tanaka S, Kakeuchi M Et al. Density of phenotypic markers on BAL T-lymphocytes in hypersensitivity pneumonitis, pulmonary sarcoidosis and bronchitis obliterans with organizing pneumonia. *Eur Respir J* 1993; 6: 477-482. [54. Schuyler M, Cormier Y. The diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 1997; 111: 134-136.
- 45.- Morell F, Orriols R, Molina C. Usefulness of skin tests in farmer's lung. *Chest* 1985; 87: 202-205.

- 46.- Hisauchi-Kojima K, Sumi Y, Miyashita Y, Miyake S, Toyoda H, Kurup VP et al.
Purification of the antigenic components of pigeon dropping extract, the responsible agent for the cellular immunity in pigeon breeder's disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 11158-11165.
- 47.- Ramirez-Venegas A, Sansores RH, Perez-Padilla R, Carrillo G, Selman M. Utility of a provocation test for diagnosis of chronic pigeon Breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 862-869.
- 48.- Laccase Y, Selman M, Costabel V, Dalphin VC, Ando M, Morell F Et al. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 852-858.
- 49.- Hypersensitivity Pneumonitis (extrinsic allergic alveolitis, P. Cebollero¹, S. Echechipía², A. Echegoyen³, M. P. Lorente⁴, P. Fanlo⁵
- 50.-Demikhov VP. Experimental transplantation of vital organs. Authorized translation from the Russian by Basil Haigh. New York: Consultant's Bureau; 1962.
- 51.-Metras H. Preliminary note on lung transplants in dogs. *Compte Rendue Acad Sci.* 1950; 231: 1176.
- 52.- Hardy JD, Webb WR, Dalton ML Jr, Walker GR Jr. Lung homotransplantations in man. *JAMA.* 1963; 186: 1065-74.
- 53.- Pottier N, Maurin T, Chevalier B, et al. Identification of keratino-cyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibro-blasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions. *PLoS One* 2009;4: e6718.
- 54.- Masaki S, Ohtsuka R, Abe Y, Muta K, Umemura T. Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human eryth-ropoiesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;364:509–14.

- 55.- Costinean S, Zaneni N, Pekarsky Y, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103: 7024–9.
- 56.- Martin MM, Lee EJ, Buckenberger JA, Schmittgen TD, Elton TS. MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts. *J Biol Chem* 2006;281: 18277–84.
- 57.- Marshall RP, Gohlke P, Chambers RC, et al. Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286: L156–64.
- 58.- Konigshoff M, Wilhelm A, Jahn A, et al. The angiotensin II re-ceptor 2 is expressed and mediates angiotensin II signaling in
- 59.- Liu G, Friggeri A, Yang Y, et al. miR-21 mediates fibrogenic ac-tivation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med* 2010; 207:1589–97.
- 60.- Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins con-trol DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 2008; 454:56–61.
- 61.- Qian B, Katsaros D, Lu L, et al. High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF-beta1. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 117:131–40.
- 62.- Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 2007; 282:14328–36.



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA**
Unidad Xochimilco



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA**
Unidad Xochimilco



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco