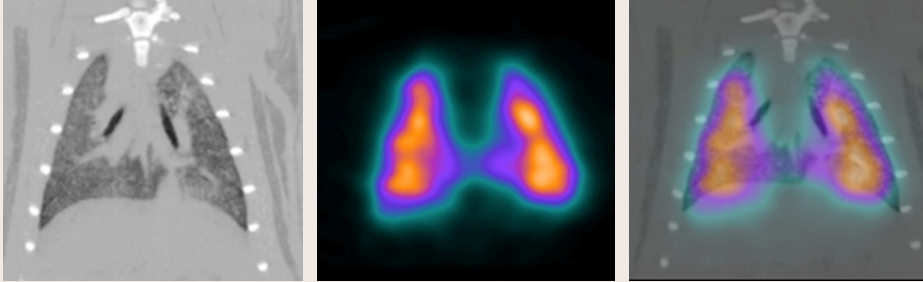


ESTUDIO DE LA RUTA CELULAR JAK₂/STAT₃ COMO POTENCIAL INHIBIDOR EN EL MODELO DE FIBROSIS PULMONAR



PRESENTADA POR GRACIA HERNÁNDEZ RIBES

DIRIGIDA POR DR. JULIO CORTIJO GIMENO
DR. JAVIER MILARA PAYÁ
DRA. ADELA SERRANO GIMENO

TESIS DOCTORAL DICIEMBRE 2015



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

2015

GRACIA HERNÁNDEZ RIBES

TESIS DOCTORAL

DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO

Catedrático Numerario de Universidad
Departamento de Farmacología
Universidad de Valencia

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Gracia Hernández Ribes, con el título:

**“ESTUDIO DE LA RUTA CELULAR JAK2/STAT3 COMO POTENCIAL
INHIBIDOR EN EL MODELO DE FIBROSIS PULMONAR”**

ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En Valencia, 2015.

Dr. Julio Cortijo Gimeno



FUNDACIÓ
INVESTIGACIÓ
HOSPITAL GENERAL
UNIVERSITARI
VALÈNCIA

DR. D. JAVIER MILARA PAYÁ

Doctor por la Universidad de Valencia

Investigador Miguel Servet

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Gracia Hernández Ribes, con el título:

**“ESTUDIO DE LA RUTA CELULAR JAK2/STAT3 COMO POTENCIAL
INHIBIDOR EN EL MODELO DE FIBROSIS PULMONAR”**

ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En Valencia, 2015.

Dr. Javier Milara Payá.



DRA. D. ADELA SERRANO GIMENO

Doctor por la Universidad de Valencia

Investigador Miguel Servet

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Gracia Hernández Ribes, con el título:

**“ESTUDIO DE LA RUTA CELULAR JAK2/STAT3 COMO POTENCIAL
INHIBIDOR EN EL MODELO DE FIBROSIS PULMONAR”**

ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En Valencia, 2015.

Dr. Adela Serrano Gimeno.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido a que esta tesis doctoral haya sido posible.

En primer lugar, a mis directores:

Al Dr. Julio Cortijo, por permitirme formar parte de su gran equipo de trabajo, por su experiencia, sus consejos y su exigencia que me han hecho superarme día a día.

Al Dr. Javier Milara, por todo su tiempo, dedicación y profesionalidad, por ser un ejemplo de trabajo y esfuerzo, y por todo lo que he aprendido junto a él.

A la Dra. Adela Serrano, amiga, compañera, la combinación perfecta de inteligencia, empeño, constancia y lealtad. Me gustaría destacar el cariño y la paciencia que ha tenido conmigo, así como todos los conocimientos que me ha transmitido, con una enorme sonrisa y dedicación a partes iguales.

A mis compañer@s de laboratorio. Todo mi cariño y respeto al motor de la fundación. En mi corazón me llevo innumerables risas, lágrimas, complicidad e hilarantes teorías conspirativas. Sin duda, el trabajo más divertido que jamás tendré. Pilar, Sonia sois excepcionales. Gracias por vuestra ayuda incondicional. Teresa y Patricia, ejemplos de calidad y potencial investigador. Lucy, lo que la radiación nos ha unido, que no lo separe el hombre. Anselm, Bea, Sonia, Leticia, Teresa vuestro apoyo y nuestras risas siempre estarán conmigo. Nerea, gracias por confiar siempre en mí. Hablar contigo es siempre una inyección de autoestima. Gracias por respetar y admirar mi trabajo.

A los investigadores de la Fundación de Investigación del Hospital General de Valencia (FIHGUV). Gracias por el buen ambiente de trabajo y porque siempre que lo he necesitado, me habéis prestado vuestra ayuda.

A mis compañeros de la UPV. Vuestro ejemplo ha sido un aliento para mí. He sentido el calor de vuestro cariño y el entusiasmo en vuestros ánimos. Contar con vuestro apoyo en lo personal y lo profesional, hace más liviano el camino.

A mis sponsors. Encabezando la lista, Maria José Esplugues, ¿por dónde empiezo? Confiaste en mí hace 8 años iniciándome en el mundo laboral. Desde el primer día luchaste por hacerme un sitio y has continuado peleando por mí hasta el final. No solo te debo mi trayectoria profesional, sino que además eres responsable de que esta tesis haya llegado a su fin. Gracias por no dejarme morir de inanición, por animarme en mis días débiles, por asegurarte que el cansancio, el estrés y el insomnio no iban a poder conmigo. Nuria, no hay palabras para describirte. Compañera, amiga y madre ejemplar. Gracias por tu cariño, tus consejos, y tu excelencia. Es un placer trabajar a tu lado. Isabel, ¡no sé qué hubiese sido de mi sin tus dos

soletes!. Maria José, Nuria, Isabel, gracias por consentírmelo todo, por vuestro apoyo laboral y por hacer que TODO haya sido viable. A la familia Llopis-Torrero. Empezaron como sponsors y me conquistaron con su amabilidad, simpatía y respeto. Gracias por vuestra paciencia y consejos.

A mis amig@s, que desde el desconocimiento y la incomprensión, siempre han admirado mi trabajo. Sin vuestro WiFi esta tesis tampoco habría sido posible. Especial mención a Anita, Javivi, Ray, Angie, Helio, que no solo me habéis apoyado con palabras. Estuvisteis conmigo cuando estaba sola. Marga, gracias por compartir en voz alta esos tabús impronunciables; tu haz de sinceridad es mi paz en este mundo de hipocresía. Esther, el “bocao” se queda corto en el cómputo global de apoyo incondicional. Eternamente agradecida. *My turn now*, espero estar a la altura. Sin olvidarme de Matias, Menxu, Cris, Lidia, Chu, Elvi, Mario, Maijo, Xavi, Paula y Saray. Gracias por escucharme y animarme a seguir adelante. Habéis sido un apoyo incondicional a lo largo de esta carrera de fondo. Sí he podido con todo es porque no podía fallaros. A Marc, porque llegaste el último pero llegaste a tiempo. Gracias por devolverme al mundo de los vivos.

A mi familia. A mis hermanos Javi, Belén y Beatriz por el apoyo y la confianza depositada en mí. Me gustaría expresar un agradecimiento muy especial a mis padres. Todo lo que soy es el reflejo de vuestra excelencia como padres. En vuestros genes llevo el sacrificio y la constancia que ha supuesto esta tesis. Gracias por no pedirme nada y dármelo todo.

Gracias a todos por hacer que tanto esfuerzo haya merecido la pena.

RESUMEN

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la enfermedad pulmonar con mayor incidencia y peor pronóstico. Estudios recientes sugieren que la familia de las *cucurbitaceae*, inhibidores selectivos de la ruta JAK2/STAT3, pueden mejorar la patogénesis de la enfermedad, al haberse confirmado sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes en otras enfermedades. Sin embargo se desconoce su papel en FPI.

El propósito de este estudio es evaluar el efecto de la Cucurbitacina I (Cul) en un modelo murino de fibrosis pulmonar inducida con bleomicina.

En el presente trabajo se estudiaron dos modelos farmacológicos. En el modelo preventivo las ratas Wistar fueron instiladas con una dosis única de bleomicina intratraqueal (BLM)(3.75 U/kg; n=12) para inducir la lesión pulmonar. Durante 21 días se administró Cul (1mg/kg/día; n=6) o vehículo de Cul (control y grupo FPI) por vía intraperitoneal. El modelo curativo se diferencia del preventivo en el comienzo de la administración farmacológica a los 7 días de inducir la enfermedad. El seguimiento de la evolución animal y el ratio de ventilación-perfusión se realizó mediante las técnicas de imagen TC/SPECT. 24 horas después de la última dosificación, las ratas se sacrificaron y se procedió a la extracción pulmonar de los sujetos así como del corazón con el fin de determinar la hipertrofia del ventrículo derecho. Se realizó el recuento y caracterización de las células totales extravasadas en lavado broncoalveolar (LBA) así como el contenido de proteína total y la concentración de IL-6 e IL-13 en LBA y tejido pulmonar. El LBA también se empleó para la determinación de los niveles de propéptido amino terminal intacto de procolágeno tipo III (PIIINP) por radioinmunoanálisis.

Las tinciones de hematoxilina-eosina y masson tricrómico permitieron el estudio de la histología del tejido pulmonar. Se determinó la expresión génica y proteica de TGF- β 1, CTGF, COL1A y ET-1 mediante las técnicas de real time PCR y WB como marcadores de remodelado vascular. Las proteínas P-STAT3, P-SMAD3 y P-JAK2, fueron determinadas mediante cuantificación proteica e inmunohistoquímica. Por último se estudió la expresión y distribución de JAK2 y STAT3 en tejido de pacientes con fibrosis pulmonar e hipertensión pulmonar.

La cuantificación de las imágenes TC/SPECT mostraron una reducción de las áreas fibróticas en el grupo tratado con Cul. El tratamiento farmacológico permitió el restablecimiento del espacio aéreo pulmonar hasta valores control en ambos modelos estudiados. El grupo con tratamiento farmacológico restauró el ratio de ventilación/perfusión tras administrar Cul durante 14 días. La concentración de proteína total en homogenado pulmonar y en lavado broncoalveolar disminuyó con el tratamiento de Cul 1mg/kg/día reduciendo los niveles de células inflamatorias e inhibiendo la expresión de IL-6 e IL-13.

Las tinciones de hematoxilina eosina revelaron como el grupo animal tratado farmacológicamente presenta una mejora de la histología pulmonar, revirtiendo el remodelado vascular y la hipertrofia del ventrículo derecho. La tinción de masson tricrómico mostró una disminución de los depósitos de colágeno. Se determinó el valor de Ashcroft, evaluador del grado de fibrosis pulmonar, que descendió significativamente en el grupo tratado con Cul.

Los resultados presentan una sobreexpresión génica y proteica de TGF- β 1, CTGF, COL1A y ET-1 en los grupos de bleomicina frente a las ratas control. Dicha condición fue revertida mediante el tratamiento con Cul que restableció los valores a niveles control. A nivel inmunohistoquímico los resultados muestran una disminución de los depósitos de Col1A en el grupo tratado frente al grupo sin tratamiento. Los análisis proteicos e inmunohistoquímicos de JAK2, STAT3 y SMAD3 revelaron una sobreexpresión en las ratas con bleomicina mientras que la expresión proteica fue inhibida en el grupo tratado con Cul. En consonancia con los resultados obtenidos, el análisis inmunohistoquímico del parénquima pulmonar de pacientes con FPI e HP asociada muestran una sobreexpresión de las formas fosforiladas de JAK2 y STAT3 frente a la ausencia de expresión en tejido pulmonar sano. Por último, se determinaron de los niveles de PIIINP liberados al medio extracelular, siendo los niveles inexistentes tanto en el grupo control como el tratado farmacológicamente.

Los resultados demuestran la relevancia de la ruta celular JAK2/STAT3 en la instauración y progresión de la FPI. La administración curativa y preventiva de un inhibidor de la ruta JAK2/STAT3 puede ser un potencial tratamiento para la fibrosis pulmonar, ya que mejora parámetros indicativos de la patología.

SUMMARY

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is the pulmonary disease with higher incidence and worse prognosis. Recent evidence suggests that *cucurbitaceae*, selective inhibitors of the JAK2/STAT3 pathway, may improve the pathogenesis of IPF, as anti-inflammatory and antioxidative properties have been confirmed in other diseases. However the role in IPF is unknown.

The purpose of this study was to evaluate the effect of Cucurbitacin I (Cul) in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis.

Two pharmacological models were investigated in the present study. In the preventive model, Wistar rats were instilled intratracheally with a single dose of bleomycin (BLM)(3.75 U/kg; n=12) to induce lung injury. Cul (1mg/kg/day; n=6) or Cul vehicle (control and IPF group) was administered intraperitoneally daily for 21 days. The therapeutic model was exactly the same starting Cul administration on day 7 until day 21.

Animal evolution together with the ventilation-perfusion ratio was controlled through CT/SPECT imaging. 24h after the last dosage, rats were sacrificed and lungs were extracted as well as the heart to determine right heart hypertrophy. Cellular count and characterization was performed in bronchoalveolar lavage (BAL) together with the total protein content and the IL-6 and IL-13 concentration in BAL and lung tissue. BAL was also used to determine the levels of procollagen type III amino terminal intact propeptide (PIIINP) through radioimmunoanalysis.

Hematoxylin-eosin and masson trichrome stains allowed the study of the lung's tissue histology. TGF- β 1, CTGF, COL1A and ET-1 gene and protein expression were both measured by real time PCR and WB as pulmonary vascular remodeling markers. P-STAT3, P-SMAD3 and P-JAK2 proteins were determined by protein and immunohistochemistry quantification. Finally, JAK2 and STAT3 expression and distribution was studied in lung tissue of fibrotic patients with pulmonary hypertension.

CT/SPECT quantification showed reduction of the fibrotic areas in the Cul treated group by reestablishing the air space in the lungs back to day 0 levels for the preventive and the therapeutic model. Furthermore, ventilation/perfusion correlation was restored in the therapeutic model after administrating Cul during 14 days. The total protein concentration both in pulmonary tissue and in BAL decreased when treated with Cul 1mg/kg/day, reducing the amount of inflammatory cells and inhibiting the expression of IL-6 and IL-13.

Hematoxylin-eosine stains demonstrated how the group treated pharmacologically presented an improvement in the lung tissue architecture, reversing vascular remodeling and right heart hypertrophy. Masson trichrome stain revealed a reduction of the collagen deposits. Ashcroft

score, used to determine the severity of pulmonary fibrosis, was measured and diminished significantly in the Cul treated group.

The results showed a gene and protein overexpression of TGF- β 1, CTGF, COL1A and ET-1 in BLM relative to Control rats. This was counteracted with Cul treatment which reduced the expression back to control. In terms of immunohistochemistry, the results demonstrated a decrease in the COL1A deposits in the treated group versus the absence of treatment group. Protein and immunohistochemistry analysis of JAK2, STAT3 and SMAD3 demonstrated an overexpression in bleomycin rats while the protein expression was inhibited in the Cul treated group. In accordance to the results obtained, the immunohistochemistry analysis of the lung parenchyma in patients with pulmonary hypertension related to pulmonary fibrosis showed and overexpression of the phosphorylated forms of JAK2 and STAT3, lacking its expression in healthy lung tissue. The levels of PIIINP released to the extracellular media were measured, and null expression was measured both in the control and the pharmacological group.

The results obtained demonstrate the relevance of JAK2/STAT3 cellular pathway in the instauration and progression of IPF. The preventive and therapeutic administration of JAK2/STAT3 inhibitor can be a potential treatment for pulmonary fibrosis, as it improves the parameters related to the disease. Cul could be used as a pharmacological target to attenuate IPF.

RESUM

La fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) és la enfermetat pulmonar amb major incidència i pitjor pronostic. Estudis recents suggereixen que la família de les cucurbitàcies, Inhibidors selectius de la ruta JAK2 / STAT3, poden millorar la patogènesi de la malaltia, en haver-se confirmat les seues propietats antiinflamatòries i antioxidants En altres patologies. No obstant això es desconeix el seu paper en FPI.

El propòsit d'aquest estudi és avaluar l'efecte de la Cucurbitacina I (Cul) en un model murí de fibrosi pulmonar induïda amb bleomicina.

En el present treball es van estudiar 2 models farmacològics. En el model preventiu les rates Wistar foren instilades amb una dosi única de bleomicina intratraqueal (BLM) (3,75 U / kg; n = 12) per a induir les lesions pulmonars. Durant 21 dies es va administrar Cul (1 mg / kg / dia, n = 6) o Vehicle de Cul (control i grup FPI) per via intraperitoneal. El model curatiu es diferencia del preventiu en el començament de l'administració farmacològica als 7 dies d'induir l'enfermetat. El seguiment de l'evolució dels animals i el ratio de Ventilació-perfusió es va realitzar mitjançant tècniques d'imatge TC/SPECT. 24 hores després de l'última dosificació, les rates es van sacrificar i es va procedir a l'extracció pulmonar i de cor per tal de determinar la hipertrofia del ventricle dret. Es realitzà el recompte i caracterització de les cèl·lules totals extravasades en el llavat broncoalveolar (LBA). Així com el contingut de proteïna total i la concentració d'IL-6 i IL-13 en LBA i teixit pulmonar. El LBA també es va emplear per la determinació dels nivells de propèptido aminoterminal intacte d'procolàgeno tipus III (PIIINP) per radioimmunoanàlisi.

Les tincions d'hematoxilina-eosina i tricròmic de Masson van permetre l'estudi de la histologia del teixit pulmonar. Es va determinar l'expressió gènica i proteica de TGF- β 1, CTGF, COL1A i Et-1 mitjançant tècniques de PCR en temps real i WB com marcadors de remodelat vascular. Les proteïnes P-STAT3, P-SMAD3 i P-JAK2, varen ser determinades mitjançant quantificació proteica i immunohistoquímica. Per últim se estudià l'expressió i distribució de JAK2 i STAT3 en teixit de pacients amb fibrosi pulmonar e hipertensió pulmonar.

La quantificació de les imatges TC/SPECT mostraren una reducció de les àrees fibròtiques en el grup tractat amb Cul. El tractament farmacològic permet el restabliment de l'espai aeri pulmonar fins valors de control en els dos models estudiats. El grup amb tractament farmacològic va restaurar el ratio de ventilació/perfusió tras administrar Cul durant 14 dies. La concentració de proteïna totals en homogenat pulmonar i en llavat broncoalveolar va

disminuir amb el tractament de Cul 1 mg / kg / dia reduint els nivells de cèl·lules inflamatòries i inhibint l'expressió de IL-6 i IL-13.

Les tincions d'hematoxilina eosina van revelar com el grup animal tractat farmacològicament presenta una millora de la histologia pulmonar, revertint el remodelat vascular i la hipertròfia del ventricle dret. La tinció de tricròmic de Masson va mostrar una disminució dels dipòsits de col·lagen. Es va determinar el valor d'Ashcroft, avaluador del grau de fibrosi pulmonar, que va baixar significativament a el grup tractat amb Cul. Els resultats presenten una sobreexpressió gènica i proteica de TGF- β 1, CTGF, COL1A i Et-1 en els grups de bleomicina en comparació les rates control. Aquesta condició va ser revertida mitjançant el tractament amb Cul que va restablir els valors fins a nivell dels control. A nivell immunohistoquímic els resultats mostren una disminució dels dipòsits de COL1A en el grup tractat comparativament al grup sense tractament. Els anàlisi proteics i immunohistoquímics de JAK2, STAT3 i SMAD3 van revelar una sobreexpressió en les rates amb bleomicina mentre que l'expressió proteica va ser inhibida en el grup tractat amb Cul.

D'acord amb els resultats obtinguts, l'anàlisi immunohistoquímic del parènquima pulmonar de pacients amb FPI i HP associada mostren sobreexpressió de les formes fosforilades de JAK2 i STAT3 davant l'absència d'expressió en teixit pulmonar sa. Per últim, es van determinar els nivells de PIIINP alliberats al medi extracel·lular, sent els nivells inexistents tant al grup control com al grup tractat farmacològicament.

Els resultats demostren la rellevància de la ruta cel·lular JAK2 / STAT3 en la instauració i progressió de la FPI. La administració curativa i preventiva d'un inhibidor de la ruta JAK2 / STAT3 pot ser un potencial tractament per la fibrosi pulmonar, ja que millora paràmetres indicatius de la patologia.

ÍNDICE

1.1	FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA.....	7
1.1.1	DEFINICIÓN	7
1.1.2	EPIDEMIOLOGÍA.....	8
1.1.3	PREVALENCIA E INCIDENCIA.....	9
1.1.4	MORTALIDAD.....	11
1.1.5	FACTORES ETIOLÓGICOS	12
1.2	FISIOPATOLOGÍA DE FPI	16
1.2.1	SISTEMA RESPIRATORIO.....	16
1.2.2	ASPECTOS MACROSCÓPICOS DE FPI	19
1.2.3	COMPLICACIONES ASOCIADAS A LA FPI (comorbilidades)	23
1.2.4	ASPECTOS MICROSCÓPICOS.....	24
1.2.5	MARCADORES MOLECULARES	26
1.3	PAPEL DE LA RUTA METABÓLICA JAK2/STAT3 EN FPI.....	30
1.3.1	TIROSINA QUINASAS	30
1.3.2	ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LAS JANUS QUINASAS (JAK)	33
1.3.3	RUTA METABÓLICA JAK2/STAT3.....	34
1.4	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	39
1.4.1	DIAGNÓSTICO POR IMÁGENES	39
1.4.2	MARCADORES MOLECULARES	43
1.4.3	MARCADORES GENÉTICOS	44
1.5	APROXIMACIONES FARMACOLÓGICAS	45
1.5.1	TRATAMIENTOS CONVENCIONALES	46
1.5.2	NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS.....	50
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	55
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	61
3.1	MATERIAL.....	61
3.1.1	FÁRMACOS ENSAYADOS	61
3.1.2	REACTIVOS	62
3.1.3	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	64
3.2	MÉTODOS.....	65
3.2.1	ESTUDIO I: EFECTO DE LA CUCURBITACINA I HYDRATE EN MODELO DE FIBROSIS PULMONAR ANIMAL	65
3.2.1.1	MODELO ANIMAL	65

3.2.1.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	67
3.2.1.3	PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS Y RADIOFÁRMACOS	70
3.2.1.4	ENSAYOS DE PERFUSIÓN Y VENTILACIÓN PULMONAR.....	70
3.2.1.5	ADQUISICIÓN Y RECONSTRUCCIÓN DE IMÁGENES	73
3.2.1.6	ANÁLISIS DE IMÁGENES.....	73
3.2.1.7	EXTRACCIÓN DE MUESTRAS.....	75
3.2.1.8	ENSAYOS DE INFLAMACIÓN PULMONAR	75
3.2.1.9	RECuento DE CÉLULAS TOTALES EN EL LBA	76
3.2.1.10	DIFERENCIACIÓN CELULAR.....	76
3.2.1.11	PROTEÍNAS TOTALES EN LBA.....	76
3.2.1.12	ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOTT	76
3.2.1.13	HISTOLOGÍA	79
3.2.1.14	ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL.....	79
1.	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN TOTAL.....	79
2.	RETROTRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT)	80
3.	RT-PCR A TIEMPO REAL	80
3.2.1.15	ENSAYOS ELISA PARA IL-6 E IL-13 EN LBA Y TEJIDO PULMONAR.....	83
3.2.1.16	DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PROPÉPTIDO AMINO TERMINAL INTACTO DE PROCOLÁGENO TIPO III (PIIINP) POR RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)	84
3.2.2	ESTUDIO II: EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE JAK2 Y STAT3 EN TEJIDO DE PACIENTES CON FIBROSIS PULMONAR E HIPERTENSIÓN PULMONAR.	86
3.2.2.1	TEJIDO PULMONAR HUMANO	86
3.2.3	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	88
4.	RESULTADOS.....	91
4.1	ESTUDIO I: EFECTO DE LA CUCURBITACINA I HYDRATE EN MODELO DE FIBROSIS PULMONAR ANIMAL	91
4.1.1	VALIDACIÓN DEL MODELO MURINO DE FIBROSIS PULMONAR INDUCIDA CON BLEOMICINA	91
4.1.2	MODELO PREVENTIVO	92
4.1.2.1	Efecto farmacológico de la Cucurbitacina I Hydrate 1mg/Kg/día vía intraperitoneal, en fibrosis pulmonar inducida con bleomicina en rata wistar.....	92
4.1.2.2	La concentración de proteína total en homogenado pulmonar y en lavado broncoalveolar disminuye con el tratamiento de Cul 1mg/kg/día.	92
4.1.2.3	Incremento del recuento total de células en LBA y distribución de células inflamatorias en el grupo sin tratamiento. La cucurbitacina reduce los niveles de células inflamatorias.....	93

4.1.2.4	Progresión de Fibrosis Pulmonar: Cuantificación de tejido fibrótico con la técnica de SPECT/CT. La Cucurbitacina reduce el área fibrótica aumentando la captación pulmonar de aire y de Tc99m frente al grupo de FPI inducido con BLM sin tratamiento.	95
4.1.2.5	Histología	99
I.	La administración intraperitoneal de Cul 1mg/kg/día, mejora la histología pulmonar, revierte el remodelado vascular y la hipertrofia del ventrículo derecho.....	99
II.	El tratamiento farmacológico con Cul 1mg/kg/día reduce los depósitos de colágeno y el valor de Ashcroft, evaluador del grado de fibrosis pulmonar.	101
4.1.2.6	La administración intraperitoneal de Cul 1mg/kg/día reduce la expresión proteica, expresión génica e inmunohistoquímica de Col1A, ET-1, TGF-β1 y CTGF, marcadores implicados en la formación y progresión de FPI.....	104
4.1.2.7	La expresión proteica e inmunohistoquímica de P-JAK2 y P-STAT3, posibles marcadores implicados en la formación y progresión de FPI, son inhibidos mediante la administración de Cul 1mg/kg/día.	106
4.1.2.8	La administración intraperitoneal de Cul 1mg/kg/día inhibe la expresión de IL-6 e IL-13.	108
4.1.2.9	Determinación de los niveles de tropocolágeno III (PIIINP) en LBA como marcador molecular de Fibrosis Pulmonar. La Cul 1mg/kg/día inhibe los niveles de PIIINP liberados al medio extracelular.	110
4.1.3	MODELO CURATIVO	111
4.1.3.1	Efecto farmacológico de la Cucurbitacina I 1 mg/Kg/día vía intraperitoneal, a los 7 días de la inducción de fibrosis pulmonar con bleomicina en rata Wistar.....	111
4.1.3.2	La administración de Cul 1mg/kg/día a los 7 días de inducción de FPI reduce la concentración de proteína total en homogenado pulmonar y en lavado broncoalveolar....	111
4.1.3.3	El modelo curativo disminuye el número de células inflamatorias liberadas al medio extracelular.....	112
4.1.3.4	La cucurbitacina I hydrate reduce el área fibrótica aumentando la captación pulmonar de aire y de Tc99m frente al grupo de FPI en el modelo curativo.	114
4.1.3.5	La cucurbitacina mejora el ratio de ventilación/perfusión pulmonar en el modelo de fibrosis pulmonar inducida con bleomicina.	117
4.1.3.6	Histología	119
I.	La administración intraperitoneal de Cul 1mg/kg/día reduce de áreas fibróticas, el remodelado vascular y la hipertrofia del ventrículo derecho.	119
II.	El tratamiento farmacológico con Cul 1mg/kg/día reduce los depósitos de colágeno y el valor de Ashcroft del modelo curativo.	121
4.1.3.7	La administración intraperitoneal de Cul 1mg/kg/día en el modelo curativo reduce la expresión proteica, expresión génica de COL1A, ET-1, CTGF y TGF-β1, marcadores implicados en la formación y progresión de FPI.....	122

4.1.3.8	La expresión proteica e inmunohistoquímica de P-JAK2 y P-STAT3, posibles marcadores implicados en la formación y progresión de FPI, son inhibidos mediante la administración intraperitoneal de Cul 1mg/kg/día.	125
4.1.3.9	En el modelo curativo la sobreexpresión de IL-6 e IL-13 es inhibida mediante la administración intraperitoneal de Cul 1mg/kg/día.	127
4.1.3.10	Determinación de los niveles de tropocolágeno III (PIIINP) en LBA como marcador molecular de Fibrosis Pulmonar. La Cul 1mg/kg/día inhibe los niveles de PIIINP liberados al medio extracelular.	129
4.2	RESULTADOS ESTUDIO II: EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE JAK2 Y STAT3 EN TEJIDO DE PACIENTES CON FIBROSIS PULMONAR E HIPERTENSIÓN PULMONAR.	130
5.	DISCUSIÓN:	137
6.	CONCLUSIONES.....	153
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157
8.	ÍNDICE DE ABREVIATURAS	171

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

1.1.1 DEFINICIÓN

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) se define, según la American Thoracic Society (ATS), como una enfermedad de afectación específica de neumonía intersticial fibrosante crónica, de origen desconocido y limitada al pulmón, que afecta a adultos de edad media a avanzada [1].

La FPI pertenece a un grupo de enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID), que presentan alteraciones heterogéneas en el tracto respiratorio inferior, con afectaciones del tejido intersticial y el espacio alveolar. Se caracterizan por presentar inflamación y cicatrización, tanto alveolar como del intersticio, que desemboca en alteraciones de las paredes alveolares y pérdida de la unidad funcional capilar alveolar. Dichas alteraciones se traducen en daños estructurales tales como el epitelio alveolar, el endotelio capilar pulmonar, la membrana basal y los tejidos perivasculares y perilinfáticos, como consecuencia del envejecimiento, factores genéticos y epigenéticos y la reactivación de rutas de señalización [2]. La progresión de la fibrosis con pérdida funcional del tejido pulmonar conduce a una ventilación restringida, disfunción del intercambio gaseoso, ejercicio y respiración limitada, calidad de vida deficiente y finalmente la muerte [3].

Se conocen más de 100 agentes causales que derivan en enfermedades intersticiales, pero en dos tercios de los casos, no se ha identificado la causa. Este grupo se conoce como EPID de causa desconocida, y la FPI es la forma más común de EPID. La definición de FPI implica la exclusión de todas las otras formas de neumonía intersticial, incluyendo las idiopáticas y las EPID asociadas a factores de exposición ambiental, medicación o enfermedades de carácter sistémico [4-6]. Es la forma más severa de las EPIDs, es irreversible y presenta un curso clínico variable e impredecible asociado con un mal pronóstico.

1.1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Aun siendo la FPI una enfermedad crítica y con mal pronóstico, la epidemiología de la enfermedad no ha sido ampliamente estudiada. El motivo yace en las imprecisas y variables definiciones de la enfermedad que han sucedido a lo largo de las últimas décadas. Esta falta de consenso ha conducido a una cuantificación sesgada de la prevalencia, morbilidad y mortalidad según los criterios de clasificación empleados.

La ausencia de una descripción unánime desde que la patogénesis de la enfermedad fue descrita en 1944 por Hamman and Rich [3], nos reporta una incidencia muy variable en la epidemiología de la enfermedad [4]. Publicaciones recientes indican un aumento de incidencia y la mortalidad. Estudios epidemiológicos realizados en la década de los 90 permitieron identificar que la FPI había resultado infradiagnosticada por falta de unanimidad en la nomenclatura de las enfermedades pulmonares con afectación intersticial idiopática [7]. Actualmente, la clínica y el diagnóstico de la FPI están bien consensuados y establecidos, ya que en el año 2000 el grupo multidisciplinario internacional de la ATS y la European Respiratory Society (ERS) redactaron un consenso donde se compilan los criterios clínicos, radiológicos y anatomopatológicos que permiten el diagnóstico de la FPI [4, 5]. Dicho consenso establece que el diagnóstico definitivo de FPI requiere una biopsia de tejido pulmonar que confirme el patrón histológico de neumonía intersticial usual (UIP), además de presentar los siguientes criterios:

- 1) exclusión de agentes causantes de EPID (toxicidad farmacológica, exposición ambiental y enfermedad vascular del colágeno),
- 2) anormalidad de la funcionalidad pulmonar, desacoplamiento del intercambio gaseoso,
- 3) imágenes consistentes con el diagnóstico,

En ausencia de biopsia pulmonar, se valorará la biopsia transbronquial o lavado broncoalveolar, confirmación de anomalías tisulares características como opacidad reticular periférica con mínimas opacidades de vidrio deslustrado mediante la tomografía computerizada de alta resolución (TCAR) [7].

La historia natural de la enfermedad se describe como un declive progresivo de la función pulmonar hasta eventualmente llegar a la muerte por fallo respiratorio u otras comorbilidades asociadas. La velocidad de la progresión de la enfermedad es impredecible y varía en cada enfermo. La mayoría sufren una progresión lenta y gradual, pero algunos se ven precipitados a una insuficiencia respiratoria aguda. Se desconoce si la historia natural de la enfermedad representa distintos fenotipos, o si esta progresión es atribuible a factores geográficos, étnicos, culturales, raciales y otros [8].

1.1.3 PREVALENCIA E INCIDENCIA

Los registros epidemiológicos de FPI y otras EPIDs son escasos como consecuencia de la falta de consenso en la definición y clasificación de la enfermedad, y la dificultad en el diagnóstico, por lo que resulta difícil extraer conclusiones. Hay que tener presente que hasta hace poco más de una década, la definición de FPI abarcaba un sentido más amplio que en la actualidad. A la hora de presentar datos de incidencia y prevalencia, resulta común encontrar rangos y variaciones en las estadísticas en función de los criterios de definición empleados por el estudio epidemiológico en cuestión. La prevalencia de una enfermedad se define como el número de personas que presentan una patología dividido por la población total. La incidencia, es el número de nuevos diagnósticos de una patología frente el número de personas con riesgo de desarrollar la enfermedad. La prevalencia expresa la proporción de individuos que padecen una enfermedad, mientras que la incidencia es una tasa.

En los últimos 30 años se han realizado estudios epidemiológicos exhaustivos en países como EEUU y Reino Unido, los cuales revelan una tendencia de aumento en la incidencia de FPI llegando a duplicarse en el año 2003 [9] y aumentando a una tasa del 5% por año [10] sin poder correlacionarse con el envejecimiento poblacional general. La tendencia de los últimos años ha permitido apreciar un incremento en los datos de incidencia y prevalencia de esta entidad que pueden ser atribuidos a numerosos factores, tales como la mejora de las técnicas diagnósticas utilizadas, mayor sensibilidad

1.INTRODUCCIÓN

de los profesionales en el diagnóstico de esta entidad, el mayor envejecimiento poblacional, etc.

Estudios realizados en el Reino Unido en el año 2008 mostraron una incidencia de entre 8,8/100.000 y 17,4/100.000 personas-año (variación según la definición estricta o la ampliada de la enfermedad), siendo la incidencia mayor en hombres que en mujeres y aumentando progresivamente con la edad, hasta los 80 años en mujeres [3]. En 2005 la prevalencia de FPI ajustada a la edad y al sexo era de 27,9/100.000 y 63/100.000 (definición estricta y ampliada respectivamente).

En nuestro país se han realizado en los últimos años tres estudios epidemiológicos que reflejan las características de la EPID en el ámbito nacional y en algunas comunidades autónomas. El estudio epidemiológico más reciente publicado por el grupo de MJ Linares, ha sido realizado en la Comunidad de Madrid (Neumomadrid) entre los años (2005-06) y utilizando como referencia el consenso ATS/ERS publicado en 2002. Se realizó en una población de 3.400.000 habitantes (h), revelando una incidencia de EPID de 3 casos/100.000 habitantes y año, siendo las neumopatías intersticiales idiopáticas (NII) las más frecuentemente observadas entre las que se encuentra en primer lugar la FPI [29,5%], seguido de sarcoidosis [15,2%] y EPID asociada a conectivopatías [13,3%].

El segundo estudio auspiciado por SEPAR (sociedad española de neumología y cirugía torácica) se realizó en 2004 y tuvo como referencia el ámbito nacional; la incidencia estimada de EPID fue de 7,6 casos/100.000 h y la de FPI, de 1,6/100.000 h [14]. Finalmente, el tercer estudio se realizó en la Comunidad Autónoma de Andalucía (Estudio RENIA), cuyos datos de incidencia (7,2/100.000 h) se asemejan a los obtenidos en el estudio nacional SEPAR [11].

La tabla a continuación muestra datos de incidencia y prevalencia para algunos países europeos entre los que se encuentra los resultados de los estudios obtenidos en España comentados anteriormente:

	Flandes (Bélgica) (1992–1996)		Alemania (1995)	Italia (1997– 1999)	España/RENIA (1998–2000)	España/SEPAR (2000–2001)	Grecia (2004)	
	P	I	I	P	I	I	P	I
Sujetos (n)	362	264	234	1138	744	511	967	254
FPI / PII	62 (17)	50 (19)	76 (32)	417 (37)	287 (39)	215 (42)	234 (24)	66 (25)

Tabla 1: Estudios de prevalencia e incidencia de FPI en Europa. Comparación de la distribución de EPIDs en Europa entre 1992-2004 según registros prospectivos realizados por facultativos respiratorios. Únicamente se presentan los datos referentes a FPI y Neumonía intersticial idiopática (NII). Los datos se presentan como n (%), donde P equivale a prevalencia e I a incidencia. RENIA: Registro de Neumopatía Intersticiales de Andalucía; SEPAR: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. <http://www.erswhitebook.org/>

1.1.4 MORTALIDAD

La mortalidad hace referencia a la proporción de personas en la población general que fallecen al año como consecuencia de la enfermedad, en las que la FPI es considerada la enfermedad causal de la muerte o asociada a la causa de la muerte [3]. La mortalidad como consecuencia de la enfermedad se multiplica por 8 a partir de los 70 años frente a la mortalidad a edades entre 45-54 años. 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.

En referencia a los datos de mortalidad obtenidos en los estudios epidemiológicos realizados con anterioridad, se puede concluir que la mortalidad ha aumentado en la mayoría de los países, es superior en hombres que en mujeres y presenta variaciones regionales dentro de cada país [3].

Tal y como se observa en la Figura 1, estudios realizados de mortalidad ajustada a edad y sexo revelan que la tasa de incidencia de la enfermedad aumenta con la edad y dicho aumento ha sido más notable en mujeres en los últimos años [12]. Esto podría explicarse con los cambios en los patrones

1.INTRODUCCIÓN

fumadores en mujeres. Todavía no existe ningún tratamiento eficaz para combatirla, siendo la supervivencia media de 2,8 años [13, 14] similar a la de pacientes con cáncer de pulmón [15].

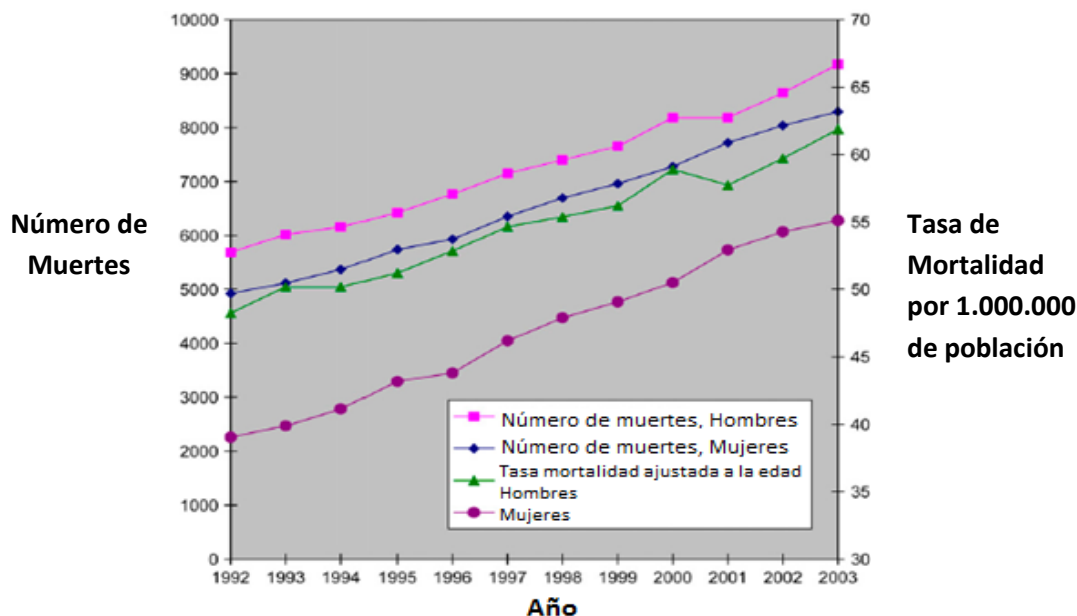


Figura 1: Morbilidad en pacientes con FPI. Número de muertes al año y tasa de mortalidad ajustada al sexo en pacientes con fibrosis pulmonar por 1.000.000 de habitantes, entre 1992-2003. La tasa de mortalidad está estandarizada a la edad según el censo de poblacional de EEUU en el 2000.

Coultas y Hughes realizaron ensayos epidemiológicos raciales para determinar la relación entre las diferencias étnicas y la enfermedad. Estos estudios comprenden datos entre 1989 y 2007 y determinaron que la incidencia en la población blanca (87,2%) es notablemente superior a la de la raza negra (5,1%) y la hispánica (5,4%) [3].

1.1.5 FACTORES ETIOLÓGICOS

Por definición la FPI es una enfermedad de etiología desconocida, no obstante se han descrito una serie de factores de riesgo potenciales implicados en el desarrollo de la enfermedad. Estos factores abarcan desde hábitos de tabaquismo, hasta exposiciones ambientales y comorbilidad. Estudios

epidemiológicos realizados en EEUU, Reino Unido y Japón entre otros, han permitido la identificación de factores de riesgo en pacientes diagnosticados con FPI. Estos estudios han logrado establecer una correlación ocupacional en determinados sectores altamente industrializados. Tal y como hemos descrito con anterioridad, la FPI tiene una incidencia mayor en hombres que en mujeres. Esta diferencia en la incidencia puede relacionarse con las ocupaciones predominantemente masculinas y los países altamente industrializados. Cabe destacar la relevancia clínica que implica conocer los factores ambientales implicados en esta enfermedad, ya que a raíz de estos pueden desarrollarse estrategias de prevención, pronta identificación y diagnóstico de la enfermedad, así como nuevas dianas terapéuticas.

A continuación se detallan aquellos factores etiológicos relacionados con la aparición y progresión de la FPI:

a) **Factores ambientales:**

- **Tabaquismo:** el hábito tabáquico está estrechamente relacionado con la FPI, especialmente en individuos con un historial fumador extenso. La prevalencia del tabaco en pacientes con FPI oscila entre 41% y 83%, dependiendo de la definición empleada [16]. Es considerado el factor de riesgo de mayor prevalencia, ya que aun habiendo cesado el hábito tabáquico, este es determinante en el desarrollo de la enfermedad, lo que sugiere que la exposición al tabaco es capaz de inducir algún tipo de lesión autosuficiente [17]. El mecanismo por el cual el tabaco influye en el desarrollo de FPI es desconocido; se cree que puede acelerar el desarrollo de enfermedades edad-dependientes, o la enfermedad puede ser potenciada por el estrés oxidativo aumentado en pacientes fumadores [16].
- **Exposición ambiental y ocupacional:** el riesgo a sufrir FPI está correlacionado con la exposición ambiental al polvo de metales (aleaciones de cobre, plomo y acero), polvo de madera de pino, arena, grava y silicio, la agricultura y la cría de pájaros [18-20].

1.INTRODUCCIÓN

- b) **Agentes microbianos:** varios estudios epidemiológicos han relacionado el desarrollo de la FPI como consecuencia de una infección viral crónica. Se han encontrado proteína y ADN viral del Epstein-Barr virus (EBV) en tejido pulmonar de pacientes con FPI, en concreto en células epiteliales alveolares. El EBV, Hepatitis C y herpesvirus son algunos de los agentes microbianos relacionados con la enfermedad. Resulta altamente complicado establecer conclusiones definitivas con la relación de agentes microbianos y la enfermedad ya que muchos de los pacientes con FPI recibieron terapia inmunosupresora, y la prevalencia de algunos de los virus como el EBV es per se muy elevada [4].
- c) **Reflujo gastroesofágico (ERGE):** la presencia de contenido gástrico en el pulmón como consecuencia de la enfermedad de ERGE, está altamente relacionada con la FPI aunque resulta imposible establecerla como agente causal directo. Una de las posibles teorías es la microaspiración crónica de contenido ácido o básico que va dañando el pulmón paulatinamente produciendo inflamación [21]. Otra hipótesis es la constricción bronquial y de la laringe junto con hipersensibilidad como consecuencia de la presencia de ácido en el esófago [22].
- d) **Factores genéticos:** menos de un 5% de la población que desarrolla FPI se debe a la transmisión genética familiar, esta es clínica e histológicamente indistinguible del FPI espontáneo. Recientes estudios de asociación del genoma completo, sugieren que el gen ELMOD2 de función desconocida y localizado en el cromosoma 4q31, puede relacionarse con la FPI familiar [23]. Recientemente, dichos estudios genómicos han asociado el desarrollo de la enfermedad con mutaciones en los genes TERT/TERC implicados en el acortamiento de los telómeros y mutaciones en MUC5B que codifica para la mucina 5B, y otros nuevos loci implicados en defensa del hospedador, adhesión celular y reparación de ADN [24, 25].
- e) **Radioterapia Torácica:** se emplea en el tratamiento de cánceres pulmonares, de esófago, mama y linfomas. La principal limitación en la dosificación de esta técnica es el desarrollo de lesiones intersticiales pulmonares y la emersión de focos fibróticos [26]. Se han identificado

lesiones como consecuencia de la radioterapia torácica que incluyen daño alveolar, aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y sus efectos tóxicos en las células parenquimales, junto con la afluencia de células inflamatorias tales como macrófagos y linfocitos. Además, se ha observado una desregulación de las citoquinas proinflamatorias y profibróticas, factor de crecimiento transformante (Tgf- β), Interleucina 6 (IL-6), metaloproteinasas (MMPs) y quimioquinas que pueden exacerbar la respuesta inflamatoria y de reparación de la lesión [27].

- f) **Bleomicina:** es un antibiótico quimioterápico empleado en linfomas, carcinomas de células escamosas, tumores de células germinales, que produce fibrosis pulmonar como principal efecto secundario en humanos. La bleomicina actúa produciendo roturas en cadena simple y doble cadena de ADN de las células tumorales interrumpiendo el ciclo celular. Esto se produce por la quelación de los iones metales y la producción de radicales de oxígeno. Esta sobreproducción de ROS genera una respuesta inflamatoria pudiendo producir toxicidad pulmonar, activación de fibroblastos y la consecuente fibrosis pulmonar[28-30].



Figura 2: Factores etiológicos relacionados con la aparición de FPI.

1.2 FISIOPATOLOGÍA DE FPI

1.2.1 SISTEMA RESPIRATORIO

Los pulmones son órganos de vital importancia al proporcionar al oxígeno acceso a la circulación pulmonar y de esta forma distribuirlo a todas las células del organismo. Esto se consigue mediante unas estructuras conocidas como árbol bronquial que sufren ramificaciones hasta derivar en un entramado de sacos alveolares constituidos por alveolos, que estructuralmente se asemejan a un panal de abeja. El árbol bronquial proporciona un conducto a través del cual el aire es conducido hasta los alveolos.

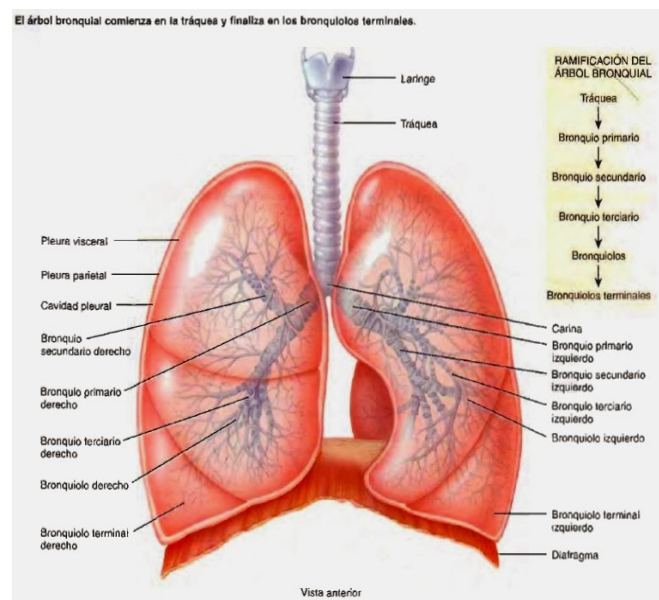


Figura 3: Anatomía del pulmón

El acino o unidad respiratoria terminal, contiene los alveolos, lugar donde se produce el intercambio gaseoso. Tiene forma esférica y un diámetro de 7mm. Un acino está formado por los bronquiolos respiratorios (procedentes del bronquiolo terminal), que se continúan con los conductos alveolares, e inmediatamente se ramifican y desembocan en los sacos alveolares cuyas paredes están formadas enteramente por alveolos, que constituyen los extremos ciegos de las vías respiratorias (Figura 4).

Los alveolos se caracterizan por presentar paredes extremadamente delgadas que permiten el eficiente intercambio gaseoso entre los capilares sanguíneos adyacentes. Las paredes alveolares no son sólidas, están perforadas por numerosos poros de Khon, que permiten el paso de las bacterias y exudados entre alveolos adyacentes. Estas paredes alveolares están formadas por endotelio capilar, membrana basal y epitelio alveolar. Los capilares pulmonares tienen un diámetro muy pequeño (5 a 7 μm) y están limitados por el endotelio que descansa sobre la membrana basal. La membrana basal y el tejido intersticial adyacente separan las células endoteliales del revestimiento epitelial alveolar. En estas porciones del septo alveolar, se fusionan las membranas basales del epitelio, mientras que en las porciones más gruesas, están separadas por un espacio intersticial (el intersticio pulmonar) que contiene fibras elásticas, pequeños haces de colágeno, algunas células de tipo fibroblástico, células musculares lisas, células cebadas, linfocitos y unos pocos monocitos. El epitelio alveolar forma una capa continua con dos tipos celulares, los neumocitos tipo I o neumocitos membranosos, células aplanadas, que tapizan el 95% de la superficie celular y alveolar y los neumocitos tipo II o neumocitos granulares, que tienen microvellosidades en su superficie, son de forma cuboidal y sintetizan y secretan un fosfolípido denominado surfactante pulmonar. Estas células tipo II son importantes ya que es el principal tipo celular implicado en la reparación del epitelio alveolar tras la destrucción de los neumocitos tipo I.

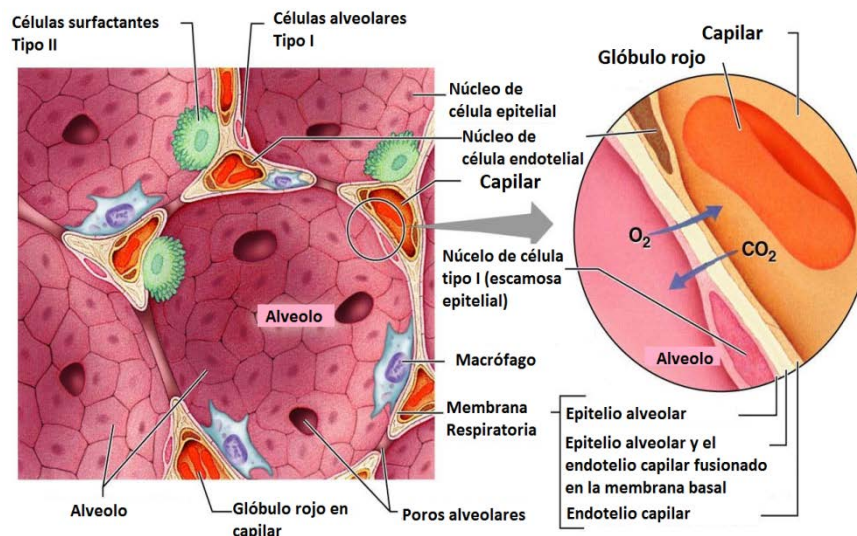


Figura 4. Estructura del acino alveolar

1.INTRODUCCIÓN

Las estructuras alveolares son extremadamente sensibles a lesiones y su reparación conlleva su posterior cicatrización. Esta cicatrización con la que responde nuestro organismo ante lesiones como tuberculosis o infecciones por hongos se denomina fibrosis. Sin embargo, existen casos de etiología desconocida en los que se desencadena el proceso fibrótico sin control. Si una proporción suficiente del pulmón se cicatriza, puede conducir a un fallo respiratorio. Esta cicatrización progresiva podría deberse a lesiones recurrentes en una región determinada del pulmón, o a un fallo en la reparación del tejido una vez la lesión ha sido reparada. En estos casos la cicatrización se convierte en un proceso descontrolado y en ausencia de regulación.

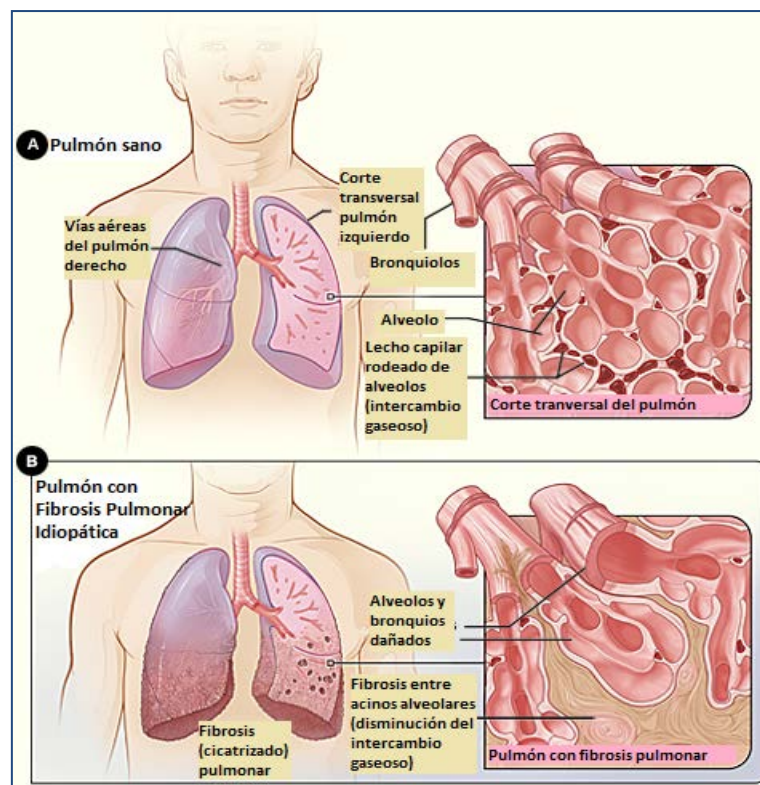


Figura 5: Anatomía pulmonar de fibrosis pulmonar idiopática.

A) Anatomía del pulmón sano. Corte transversal ampliado de los acinos alveolares rodeados de lechos capilares.

B) Anatomía de un pulmón con FPI. Corte transversal ampliado de los acinos alveolares con destrucción del parénquima pulmonar por focos fibróticos entre los alveolos. Disminución del intercambio gaseoso.

1.2.2 ASPECTOS MACROSCÓPICOS DE FPI

El modelo patogénico de la FPI propuesto originalmente se basaba en un proceso derivado de una respuesta inflamatoria ante la lesión del tejido pulmonar [31]. La ineffectividad de los fármacos antiinflamatorios e inmunosupresores [32], la ausencia de patrón histológico propio de la inflamación en tejidos biopsiados y la presencia de opacidades en vidrio deslustrado en las TCAR obligaron a proponer una nueva hipótesis para explicar la patogenia de la enfermedad [33].

La FPI comienza con la lesión del endotelio y el epitelio vascular. Cuando se lesiona la membrana basal (MB), se produce hemorragia y extravasación de plasma al tejido pulmonar; la activación plaquetaria y la desgranulación producen liberación de mediadores lipídicos, citoquinas, y factores de crecimiento de la matriz que generan la activación de células epiteliales, endoteliales, fibroblastos/miofibroblastos y leucocitos [27].

Cuando la MB no está afectada y el estímulo de la lesión se elimina, se produce una reparación normal y completa mediante los procesos simultáneos de reabsorción de los depósitos en la matriz extracelular, y de reepitelización y reendotelización de la barrera alveolo-capilar [34, 35].

La Figura 6 resume las fases de reparación de una lesión pulmonar, en condiciones normales.

1.INTRODUCCIÓN

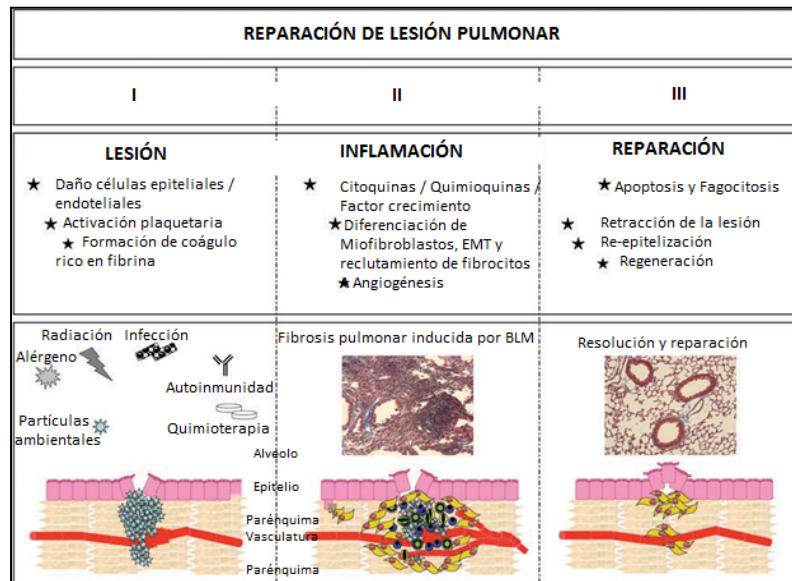


Figura 6: Fases de reparación de la lesión tisular. La reparación de la lesión tisular tiene lugar en tres fases: (1) Lesión; muchos agentes pueden causar lesión pulmonar, incluyendo partículas ambientales, alérgenos, agentes infecciosos, quimioterapia y radiación. La lesión de las células epiteliales y endoteliales inician una cascada anti-fibrinolítica, tamponando temporalmente el tejido lesionado. (2) Inflamación; las células fibrocitos circulantes inflamatorios son reclutados en el lugar de la lesión gracias a la liberación de quimioquinas, proporcionando citoquinas activadoras de fibroblastos y factores de crecimiento. La neovascularización proporciona acceso a las áreas dañadas y un aporte de células inflamatorias, antiinflamatorias y fagocíticas. (3) Reparación; los fibroblastos reducen el área lesionada. Las células inflamatorias, α -SMA y miofibroblastos sufren apoptosis, cesa el depósito de colágeno, las células epiteliales y endoteliales son repuestas y la arquitectura bronquial es restaurada.

Por el contrario, en pacientes con FPI, se producen las siguientes circunstancias: [35-41].

- Pérdida de células endoteliales y epiteliales tipo I.
- Pérdida de la integridad de la MB de la barrera alveolo-capilar con colapso de las estructuras alveolares y fusión de sus membranas basales.
- Proliferación de células epiteliales alveolares tipo II y células endoteliales en una matriz extracelular inapropiada, sin restablecimiento de la estructura epitelial normal.
- Reclutamiento y proliferación de fibroblastos y miofibroblastos con depósito de matriz extracelular madura generándose el estado final de fibrosis alveolar.

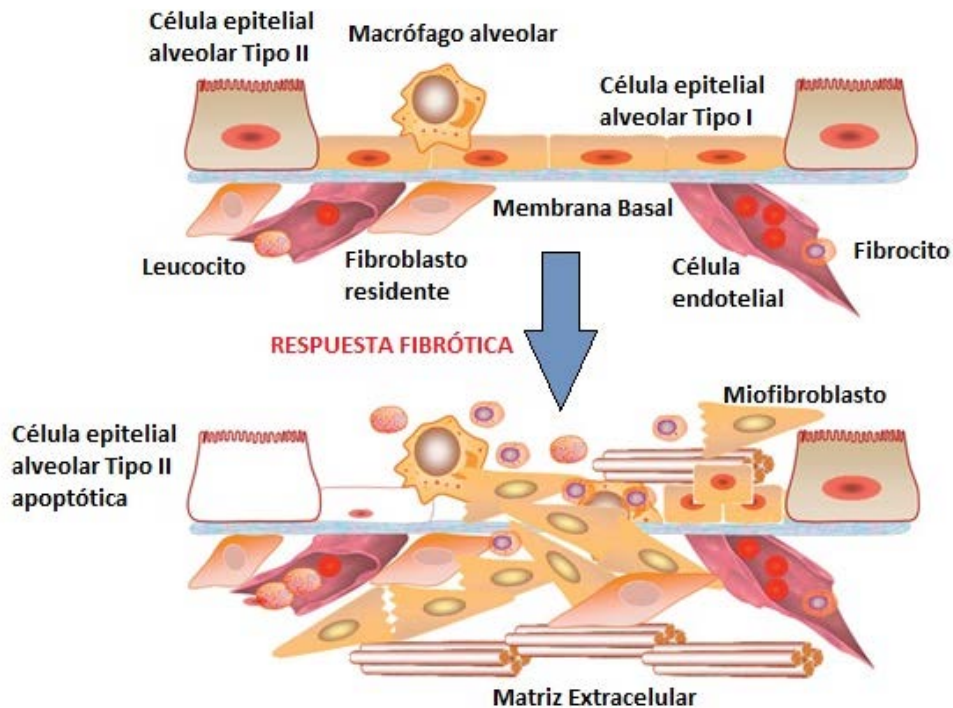


Figura 7: Adaptación de “Current opinion in pharamacology: Alteraciones patológicas implicadas en FPI”. Se cree que la lesión de las células alveolares epiteliales conduce a la apoptosis celular. La pérdida del equilibrio homeostático del pulmón produce la acumulación de fibroblastos y miofibroblastos, así como inflamación crónica que implica la migración de monocitos/macrófagos y fibrocitos. El daño vascular inicia el depósito de matriz extracelular inicial. La hiperplasia de las células endoteliales alveolares se percibe en la lesión fibrótica. Las células mesenquimales pulmonares promueven la fibrosis a través de la secreción de matriz extracelular rica en colágeno tipo 1. La rigidez de la matriz extracelular puede contribuir a la perpetuación de las señales profibróticas hacia la formación de células mesenquimales.

Se han explorado distintas vías que, en conjunto, pueden ser responsables de la combinación de la producción alterada de fibroblastos, pérdida de células epiteliales alveolares y acúmulo en exceso de matriz extracelular:

- 1) mecanismos inmunológicos e inflamatorios: papel de la inflamación aguda y crónica derivada de la liberación de citoquinas,
- 2) estrés y señalización oxidativa: papel de ROS,
- 3) entorno procoagulante en el pulmón: papel de las proteinasas y sus receptores tisulares [43].

1.INTRODUCCIÓN

La patogénesis de la FPI se caracteriza por ser una enfermedad en la que las lesiones tisulares no son reparadas. Esta ausencia de reparación del tejido pulmonar puede apreciarse a nivel macroscópico mediante la técnica TCAR. La FPI presenta patrón radiológico en vidrio deslustrado, un término radiológico para el patrón difuso con aumento de atenuación observada en la TCAR. Se produce como consecuencia del infiltrado alveolar que excluye parcialmente el aire en los alveolos. La FPI cursa con bronquiectasia, ensanchamiento de los nódulos linfáticos, alteración de la estructura del panal de abeja y opacidades reticulares irregulares que predominan a nivel subpleural, posterior y distal [33]. En las áreas fibróticas observamos un engrosamiento del septo y focos fibróticos que predominan en las regiones paraseptales o subpleurales. Los focos fibróticos son regiones altamente proliferativas de acumulación de miofibroblastos, localizados en las inmediaciones de las células alveolares epiteliales hiperplásicas o apoptóticas o ambas [44]. La sintomatología clínica incluye tos, disnea, crépitos en la inspiración final y disminución del intercambio gaseoso [4].

1.2.3 COMPLICACIONES ASOCIADAS A LA FPI (comorbilidades)

Existen una serie de comorbilidades asociadas a la FPI. Entre ellas cabe destacar la hipertensión pulmonar (HP), enfisema, diabetes, cáncer de pulmón, ERGE, depresión, apnea del sueño obstructiva (OSA) y enfermedades cardiovasculares. La mayoría de los pacientes con fibrosis suelen presentar como mínimo una segunda complicación clínica.

La hipertensión pulmonar es una enfermedad que afecta a la musculatura pulmonar que se caracteriza por presentar vasoconstricción y remodelado de las arterias pulmonares, aumentando la resistencia vascular pulmonar y la presión arterial [45]. Es una enfermedad reconocida como complicación asociada a la FPI. El desarrollo de la hipertensión pulmonar en los estadios avanzados de la enfermedad empeora la calidad de vida del paciente y reduce las posibilidades de supervivencia [46]. Esta se desarrolla ante una pérdida significativa de la densidad del lecho vascular, aumentando la resistencia vascular pulmonar. En las fases tempranas del desarrollo del panal de abeja pulmonar predomina la muscularización vascular. A medida que el panal de abeja se va desarrollando, se produce un estado de atrofia vascular fibrótica y la ablación del tejido que con el tiempo alcanza la vascularización. La ablación vascular reduce el riego del lecho vascular, incrementando la resistencia y generando hipertensión pulmonar. Es más, la fibrosis perivascular puede afectar a la distensión de los vasos pulmonares aumentando la resistencia vascular y la presión arterial pulmonar [47].

Los procesos biológicos complejos implicados en la fibrosis pulmonar pueden contribuir a la patogénesis del remodelado vascular. Las áreas fibróticas poseen menos vasos sanguíneos adyacentes, pero las áreas no fibróticas aparentemente aumentan su vascularización. Los cambios estructurales oscilan desde la pérdida de capilares hasta lesiones vasculares complejas con engrosamiento de la íntima y la túnica media, y fibrosis adventicia. La neovascularización se caracteriza por la ausencia de la capa de elastina, lo cual puede contribuir al desarrollo de hipertensión pulmonar [48]. La lesión endotelial producida por la apoptosis celular puede estar implicada en el

1.INTRODUCCIÓN

remodelado vascular debido a la liberación de mediadores que promueven el remodelado vascular [49].

La prevalencia del cáncer de pulmón en pacientes con FPI varía entre 20,4% y 31,2%. Aparentemente la fibrosis pulmonar es un factor de riesgo para el cáncer de pulmón no asociado al tabaco y viceversa [50] . FPI y enfisema son patológica y funcionalmente opuestas, pero en ocasiones pueden coexistir. En algunos pacientes se ha visto enfisema en las áreas superiores junto con áreas fibróticas en la base del pulmón.

1.2.4 ASPECTOS MICROSCÓPICOS

La acumulación excesiva de la matriz extracelular así como el remodelado de la arquitectura bronquial, son consecuencias de la alteración del equilibrio de dos procesos fisiológicos: la proliferación y apoptosis de los fibroblastos y la acumulación y desintegración de la matriz extracelular. Cuando el equilibrio se desplaza hacia la formación de matriz extracelular y hacia la proliferación acelerada de fibroblastos o un enlentecimiento de su apoptosis, se produce un acúmulo de la matriz extracelular.

Se ha observado que los fibrocitos circulantes son células progenitoras mesenquimales que se extravasan al foco de la lesión tisular, se diferencian a fibroblastos y miofibroblastos, y contribuyen a la generación de matriz extracelular durante la fibroproliferación [41, 51]. Los fibrocitos implicados en el foco fibrótico pueden ser residentes del tejido pulmonar o provenir de la circulación sistémica por un proceso de migración celular. Independientemente del origen de la expansión de fibroblastos en los pulmones, el efector común en ambas vías es la formación de miofibroblastos, los cuales presentan propiedades contráctiles similares a las células lisas musculares, y va asociado a la presencia de alpha actina de músculo liso (α -SMA) [43].

Como posibles orígenes de la activación de miofibroblastos se encuentran las células epiteliales responsables de la transición epitelio-mesenquimal (EMT), células endoteliales responsables de la transición endotelio-mesenquimal (EndoMT), células mesenquimales tales como los fibroblastos o

pericitos a través de su proliferación e invasión, o células progenitoras circulantes, vía el reclutamiento, invasión y activación de los fibroblastos.

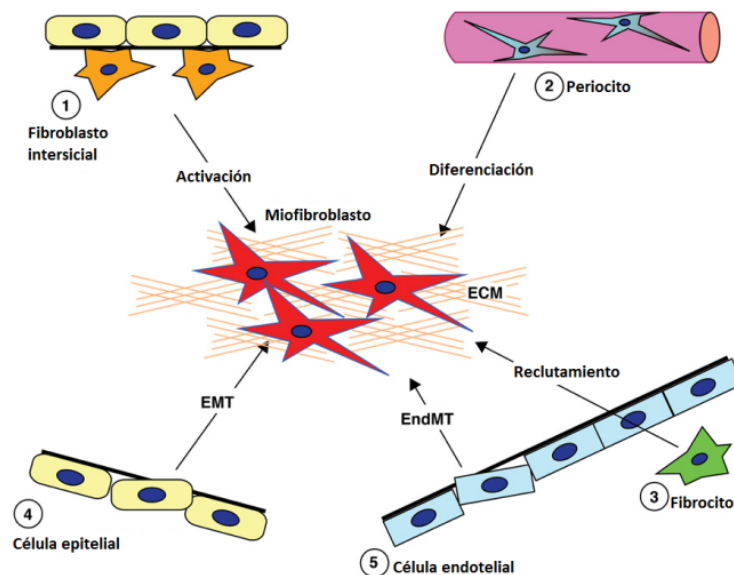


Figura 8: Posibles fuentes de fibroblastos pulmonares

El epitelio alveolar se encuentra dañado en aquellos pacientes que sufren la enfermedad. La hiperplasia alveolar epitelial es inducida por la secreción de sustancias por las propias células epiteliales, células inmunológicas y fibroblastos adyacentes [44]. Las células epiteliales alveolares de tipo I son reemplazadas por células epiteliales tipo II, o células cúbicas bronquiolares [43]. La EMT se produce en presencia de Tgf- β , el cual induce la transición de células epiteliales tipo II o neumocitos tipo II a estas células con fenotipo mesenquimal, fibroblastos y miofibroblastos, que contribuyen a la fibroproliferación [52-55].

Recientemente, se ha reconocido la EndoMT como un nuevo tipo de transdiferenciación celular, y ha sido propuesto como otro posible origen de formación de miofibroblastos. La EndoMT es un proceso biológicamente complicado por el que las células endoteliales pierden sus marcadores específicos y adquieren fenotipos mesenquimales o de miofibroblastos para expresar productos propios de las células mesenquimales como α -SMA y colágeno tipo I (Col-1). Al igual que la EMT, la EndoMT puede ser inducida por Tgf- β [56].

1.INTRODUCCIÓN

Los pericitos pulmonares son derivados de las células mesenquimales localizadas en la membrana basal o en el revestimiento perivascular implicadas en la reparación de tejido y en la síntesis de colágeno [57-59]. Se denominan pericitos a las células CD34+ circulantes derivadas de los miofibroblastos originadas en la médula ósea [60]. Estudios recientes en el mapeo de destinos celulares han determinado que los pericitos son una fuente de activación de miofibroblastos inducidos por Tgf- β o por Sonic hedgehog (SHH) [61, 62].

La lesión producida en las células epiteliales las hace más vulnerables a la apoptosis, condición fundamental en la patogénesis de la enfermedad que imposibilita la regeneración de la capa celular epitelial. Estudios genéticos sugieren la implicación de determinados genes que codifican para proteína C y proteína A2 surfactante, que presentan la estructura tridimensional incompleta y no pueden ser procesadas adecuadamente por las células [63]. Esto resulta en muerte celular si los mecanismos de reparación no son eficientes. Se han descrito genes implicados en el acortamiento de los telómeros asociados a la fibrosis pulmonar difusa [64]. Si los telómeros se acortan hasta una longitud crítica, se induce a la muerte celular. El acortamiento de los telómeros se produce tras cada división celular y también está relacionado con el envejecimiento, obesidad y tabaquismo. Sin embargo, se han observado variaciones en estos genes que codifican para proteínas implicadas en la renovación del acortamientos de los telómeros en casos de fibrosis pulmonar familiar y no familiar [65].

1.2.5 MARCADORES MOLECULARES

El proceso fibrótico se inicia con la formación de un coágulo seguido de la respuesta inflamatoria que implica una vasodilatación local, aumento de la permeabilidad vascular y acumulación de leucocitos y monocitos. El daño epitelial se traduce en la liberación de mediadores profibróticos entre los que encontramos el Tgf- β , factor de necrosis tumoral (TNF), endotelina 1, (ET-1), citoquinas, MMPs y mediadores de factor de coagulación de tejidos [66, 67].

Las citoquinas IL-13 y Tgf- β han sido ampliamente estudiadas en la patogénesis de la FPI por su importante actividad profibrótica y por el

reclutamiento y activación de fibroblastos, macrófagos y miofibroblastos. Se ha identificado a IL-13 como una citoquina clave en la respuesta fibrogénica, independientemente de la expresión de Tgf- β . La citoquina IL-13 puede desencadenar la diferenciación de fibroblastos en α -SMA, expresando miofibroblastos y células productoras de factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Es responsable de la fibrosis subepitelial acompañada de una inflamación eosinofílica y de producción de moco [68]. En modelos animales de fibrosis pulmonar se ha visto como IL-13 es capaz de inducir al activador de plasminógeno MMP-9, potenciando la liberación de Tgf- β activo y la correspondiente fibrosis. Existe una respuesta coordinada y potencialmente combinada del efecto del IL-13 y Tgf- β en la activación de fibroblastos y el depósito de colágeno [27].

El Tgf- β se sintetiza en la médula ósea y su actividad se regula a nivel post-transcripcional por la proteína asociada a latencia (LAP) que la mantiene inactiva. Se encuentra encapsulado en dos proteínas y requiere una activación proteolítica o un cambio conformacional para su activación. Una vez se activa, el Tgf- β es increíblemente pleiotrópica con propiedades quimiotácticas e inductoras del crecimiento celular, estimula la proliferación de fibroblastos y la síntesis de proteínas de la matriz extracelular y suprime la respuesta de las células T [69]. Los fibroblastos expresan tres tipos de receptores de Tgf- β en su superficie. Al unirse, los receptores tipo I y tipo II se asocian en complejos y activan al receptor tipo I. El tipo III también conocido como receptor accesorio, facilita las interacciones entre Tgf- β y los receptores de señalización. La fosforilación del receptor I resulta en la activación de la cascada de transducción de señales intracelulares que implican una serie de proteínas entre las que cabe destacar tres tipos de proteínas pertenecientes a la familia de moduladores de transcripción denominados Smad. Una vez activada, Smad se transloca al núcleo dónde interactúa y facilita la activación de los genes implicados en la activación transcripcional de Tgf- β [70]. La activación de la ruta Tgf- β /Smad2/3 está implicada en la EMT. Muchos otros mediadores son capaces de activar a Smad2 y Smad3 independientemente de Tgf- β , ya que éstas actúan como integradores de señales e interaccionan con otras vías de señalización como las MAPK. Estudios realizados en fibrosis renal muestra la importancia de la interacción en la ruta MAPK-Smad en la expresión del factor

1.INTRODUCCIÓN

de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) mediante la activación de Smad2/3, en ausencia de Tgf- β [71].

La sobreexpresión de Tgf- β está relacionada con el desarrollo de fibrosis intersticial y pleural severa, que cursa con un exceso del depósito de colágeno, proteínas de matriz extracelular, fibronectina, elastina, y la presencia de miofibroblastos [72]. A diferencia con IL-13, Tgf- β no recluta células inflamatorias ni potencia la secreción de moco por el pulmón, lo que sugiere que puede inducir fibrosis directamente en ausencia de inflamación significativa [27].

Durante la fase inflamatoria de la FPI, las células estromales y células que pertenecen al linaje de los macrófagos y monocitos liberan citoquinas inflamatorias de la familia IL-6. Se cree que esta familia de citoquinas es responsable de la potenciación de la respuesta fibrótica a través de la proliferación de fibroblastos asociados a la señalización de Erk1/2 [73] y a la inducción de la respuesta fibrótica mediada por ligandos de la familia Tgf- β . La familia IL-6 se caracteriza por presentar la subunidad de receptor gp130, implicada en la fibrosis pulmonar. Los niveles de IL-6 se han visto sobreexpresados en lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes con FPI [74].

El CTGF es liberado por células epiteliales, endoteliales y mesenquimales junto con la secreción de Tgf- β [75], con el particular rol de estimular la producción de matriz extracelular de fibroblastos y la diferenciación de miofibroblastos, o estimular el remodelado vascular. El remodelado vascular conduce a una hipertensión local que induce la expresión de CTGF por retroalimentación positiva se agrava el remodelado vascular [76]. La liberación de CTGF es inducida por otros mediadores profibróticos tales como la trombina. Se ha observado como su expresión se ve aumentada tanto en tejido pulmonar fibrótico como en LBA de pacientes con FPI, y se localiza en el epitelio alveolar tipo II proliferativo y en los fibroblastos activados [77]. Estudios realizados en ratones knockout para Smad3, han visto que estos son resistentes a la fibrosis inducida por Tgf- β , y dicha resistencia es asociada al fallo en la inducción de la expresión génica de CTGF. La sobreexpresión de CTGF en ratones resulta en la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos y un aumento de la concentración de colágeno durante 28 días, lo que sugiere

que el CTGF es capaz de inducir pero no mantener la enfermedad pulmonar [75].

La familia de las endotelinas está compuesta por tres péptidos vasoactivos y dos receptores de unión, ET_A y ET_B. En los años 90 se identificó el papel de las endotelinas en la inducción de la quimiotaxis y la proliferación de fibroblastos en los vasos pulmonares [78]. La ET-1 se expresa mayoritariamente en el pulmón, en células endoteliales, epiteliales, células del músculo liso, células Clara y macrófagos alveolares. En fibrosis pulmonar la ET-1 se encuentra sobreexpresada en células alveolares tipo II. Su regulación se ve sobreexpresada por sustancias como la angiotensina II, vasopresina, trombina y Tgf-β. El papel profibrótico atribuido a la ET-1 proviene de su habilidad para inducir la proliferación y activación de fibroblastos, regular el tono y el remodelado vascular, y regular la inflamación. Además, también posee un papel importante como mediador en la permeabilidad vascular en lesiones pulmonares [79].

Dentro de los subtipos de colágeno, cabe destacar el colágeno tipo I y tipo III tanto el pulmón sano como en la fisiopatología de la FPI. El precursor del colágeno es una proteína fibrilar soluble que se asocia para formar una estructura insoluble de triple hélice, que resiste al ataque de la mayoría de las enzimas [80]. Existen evidencias de la sobreexpresión de colágeno tipo I y tipo III en pacientes con FPI. Ambos tipos de procolágeno se han visto aumentados en LBA pero no en suero de los pacientes estudiados. El colágeno tipo I está presente en los estadios avanzados de la enfermedad, mientras que el tipo III predomina en el engrosamiento del septo alveolar en el intersticio. El procolágeno tipo I se expresa en los focos fibróticos sintetizados de novo, y el tipo III se expresa a nivel extracelular, debajo del epitelio alveolar metaplásico [81].

1.3 PAPEL DE LA RUTA METABÓLICA JAK2/STAT3 EN FPI

1.3.1 TIROSINA QUINASAS

Las proteínas tirosina quinasas (PTKs) son enzimas que modifican otras proteínas a través de la fosforilación, produciendo cambios en las proteínas diana tales como alteración de la actividad enzimática, cambios de localización celular o asociación con otras proteínas. Las PTKs pertenecen a una amplia y diversa familia multigénica cuya función principal es la regulación de procesos fisiológicos de señalización celular tales como el metabolismo, crecimiento, diferenciación, inmunidad, inflamación y apoptosis. Las PTKs contienen dominios catalíticos altamente conservados similares a los de las proteínas serina/treonina quinasas [82].

Actualmente se han secuenciado 518 genes del genoma humano que codifican para tirosina quinasas. Las PTKs se catalogan en dos grupos dependiendo de si poseen un dominio de unión específico a un receptor transmembrana o si por el contrario carecen de él. Las PTKs asociadas a receptor se dividen en 20 subfamilias en función de la secuencia del dominio quinasa, mientras que las PTKs no asociadas a receptor se dividen en 10 [82]. Activan rutas de señalización esenciales entre las que se incluyen quinasas reguladoras de señales extracelulares (ERK), proteínas mitogénicas activadas (MAP) quinasas, fosfatidilinositol 3-quinasa (Pi3K) y Janus quinasa-transducción de señal de activación de la transcripción (JAK-STAT). La consecuencia de la activación de estas PTKs depende del tipo celular y la ruta de señalización activada.

1.3.1.1 TIROSINA QUINASAS IMPLICADAS EN LA REGULACIÓN DE FIBROBLASTOS

La activación patológica de determinadas PTKs pueden promover la carcinogénesis, el remodelado vascular y la fibrogénesis [83]. A continuación se describen las PTKs implicadas en la modulación y activación de fibroblastos:

a) Receptores de PDGF: Son de tipo α y β , y son activados por ligandos denominados según su estructura y afinidad por cada receptor (PDGF-A, B, C y D). El complejo de señalización PDGF-B/PDGF β está implicado en remodelado vascular tanto en condiciones de homeostasis como en condiciones patológicas. El revestimiento de los vasos sanguíneos por pericitos depende particularmente de esta señalización. El PDGF-B es liberado por macrófagos y células estrelladas hepáticas, y la formación del complejo PDGF-B/PDGF β en estas últimas, ha sido señalado como papel principal en la fibrosis hepática [84]. El complejo PDGF-A/PDGF α tiene un papel todavía más amplio en la homeostasis y reparación de tejido, especialmente en piel, pulmón, esófago y riñón. Los fibroblastos y células análogas a estas presentan en su superficie celular receptores PDGF α , por lo que la señalización tanto endocrina como paracrina de PDGF-A/PDGF α puede estimular la síntesis de matriz extracelular por los fibroblastos y la liberación de mediadores profibróticos [85].

La señalización de PDGF permanece inactiva hasta que se produce una lesión tisular o reparación y cicatrización de tejido. Cuando se dan esas condiciones el PDGF se encuentra estrictamente regulado y la señal se inactiva tan pronto como el tejido es reparado. La activación incontrolada impide el cese de la señalización y desemboca en la cicatrización excesiva y la formación de fibrosis tisular. La potenciación de la señalización de PDGF ha sido descrita en fibrosis pulmonar, esclerosis sistémica (SSc) y fibrosis hepática.

b) Receptores de factores de crecimiento de endotelio vascular (VEGF): Presentan tres tipos distintos de receptores (VEGFR1,2 y 3) y cinco ligandos cuyas actividades están implicadas en mecanismos de regulación de angiogénesis e integridad vascular. El complejo VEGF/VEGFR posee efectos mitogénicos y profibróticos en fibroblastos. Existe evidencia científica de que la señalización de VEGF-A puede estimular la producción de matriz extracelular, estableciendo una relación directa entre las alteraciones vasculares y la fibrosis [86]. Sin embargo el papel profibrótico de la señalización de VEGF todavía requiere ser estudiado en detalle.

c) Receptores de factor de crecimiento epitelial (EGF): Los receptores EGF son estimulados por un sistema complejo de PTKs llamadas ErbB, que inician la señalización celular a través de MAP quinasas, PI3K, y factores de

1.INTRODUCCIÓN

transcripción como STAT3 [87]. La señalización de EGF está implicada en la patogénesis de la fibrosis pulmonar y renal. En los pulmones participa en las interacciones epitelial-mesenquimal tanto en condiciones patológicas como en ausencia de las mismas. Actúa como factor importante en la supervivencia del epitelio pulmonar pero también promueve la proliferación de fibroblastos y la producción de matriz extracelular. Estudios genéticos y farmacológicos indican que la estimulación de la señalización EGF exacerba la fibrosis pulmonar a nivel experimental [88].

d) Src quinasas: pertenecen a la familia de quinasas sin receptor de membrana y son importantes mediadores de las rutas de señalización profibróticas. Modulan la actividad de la señalización de Tgf- β mediante la fosforilación y activación del receptor tipo II. La Src quinasas son activadas al aumentar los niveles de ROS o por citoquinas profibróticas incluyendo Tgf- β , PDGF y angiotensina II, las cuales forman parte de la patogenia de la FPI [89].

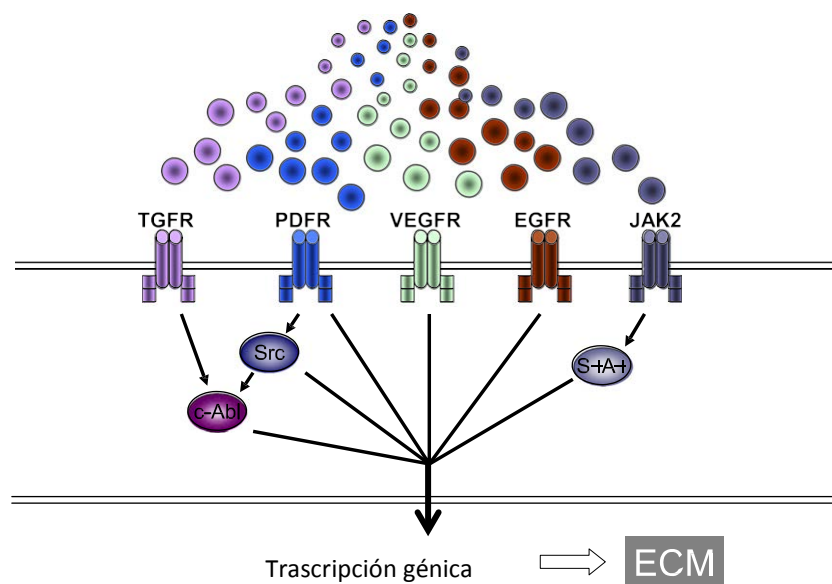


Figura 9: Tirosina quinasas implicadas en procesos fibróticos. PTKs asociadas a receptor, PDGFR, VEGFR, EGFR y las que carecen de receptor JAK quinasas, c-Abl y Src quinasas, implicadas en la síntesis y liberación de proteínas de matriz extracelular (ECM) en condiciones patológicas.

1.3.2 ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LAS JANUS QUINASAS (JAK)

La familia de las JAK quinasas fueron descubiertas en torno a los años 90 gracias a la tentativa de la comunidad científica por descubrir PTKs nóveles. Fueron denominadas JAK por su acrónimo en inglés, “Just Another Kinase”, una quinasa más. Estudios de secuenciación identificaron cuatro componentes de la familia, JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Estos componentes se caracterizaron por presentar un dominio quinasa adicional al resto de las PTKs, gracias al cual adquirieron el nombre de Janus Kinasas en referencia al Dios griego de dos caras [90]. Los dos dominios se denominan JH1 y JH2 y presentan una gran homología con los dominios de las TKs. Estas proteínas, en lugar de presentar un dominio SH2 o SH3, codifican para un grupo de dominios bien conservados identificados como JH1-JH7. El dominio JH1 es el responsable de la fosforilación de proteínas mientras que el dominio JH2 presenta una especificidad dual que fosforila dos sitios de regulación negativa en JAK2 [91].

El resto de los dominios (JH3-JH7) son necesarios para la interacción proteína-proteína con sus receptores de citoquinas y proteínas STAT [92]. La figura 9 muestra la organización estructural de las Janus quinasas [93].

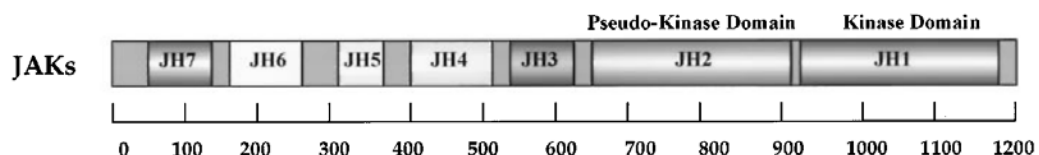


Figura 9: Organización estructural de las Janus quinasas. Los dominios estructurales de la familia de JAK quinasas se conocen como regiones homólogas (JH1-JH7). Las JAK quinasas además de presentar un dominio carboxiterminal funcional (JH1), también poseen un dominio pseudo terminal (JH2). Las secuencias amino terminales no poseen semejanza alguna con las proteínas quinasas. Son bloques homólogos compartidos en las familias de las Janus quinasas.

La activación de las JAK quinasas se produce tras la interacción de una citoquina con su receptor específico produciendo la oligomerización del

1.INTRODUCCIÓN

receptor activado. Esto desencadena la señal de reclutamiento de JAKs en la proximidad del receptor. La agregación local de las JAK quinasas y su posterior activación tanto por auto como trans-fosforilación requiere la implicación de otros miembros de la familia JAK, y otras quinasas de la familia Src. Las JAKs poseen influencia celular en procesos como la hematopoyesis y respuestas inmunológicas. Durante la respuesta inflamatoria, las citoquinas liberadas se unen a los receptores de membrana iniciando la respuesta intracelular [94].

1.3.3 RUTA METABÓLICA JAK2/STAT3

La ruta de transducción de la señalización de JAK2/STAT3 ha sido asociada a la fibrosis pulmonar. Estas vías son importantes canales de transducción de citoquinas implicados en la regulación de genes responsables de funciones biológicas tales como citopoyesis, diferenciación, desarrollo embrionario e inmunidad. STAT requiere una fosforilación previa para iniciar su función biológica. Esta función es llevada a cabo por diversas citoquinas, tales como IL-6, IL-13, PDGF o factor de crecimiento epidérmico, que al unirse con sus respectivos receptores de membrana inducen el reclutamiento de STAT en la superficie interna de la membrana plasmática celular en las inmediaciones de la porción citoplasmática de los receptores [95, 96].

Las tirosín quinasas responsables de la fosforilación de STAT son aquellas no asociadas a receptores. Cabe destacar la citoquina IL-6 como activador principal de la respuesta inflamatoria y transformación de fibroblastos a través de STAT3 [94]. Las citoquinas se unen a sus receptores e inducen su dimerización para formar sitios de unión para JAK en el citoplasma. Los sitios de unión activan a JAK mediante la fosforilación de la tirosina y este a su vez fosforila a STAT activando la proteína. Estas una vez activadas sufren una dimerización y se translocan al núcleo donde se unen específicamente al ADN para la transcripción genética [97-99].

STAT3 se activa tras la fosforilación del residuo de tirosina Y705 por quinasas upstream como JAK2. A través del dominio SH2 se realiza la dimerización del monómero STAT3 adquiriendo una conformación transcripcionalmente activa. La persistente activación de JAK2/STAT3 ha sido

transcripcionalmente activa. La persistente activación de JAK2/STAT3 ha sido documentada en innumerables cánceres hematológicos y normalmente asociado a un mal pronóstico. La inhibición selectiva de JAK2 previene la fosforilación y dimerización de STAT3. Al requerir un dominio SH2 intacto, sirve de diana para la disrupción de la señal STAT3 [100].

A continuación se detallan las citoquinas implicadas en la activación de la ruta metabólica JAK/STAT [93]:

CITOQUINA	JAK-QUINASA	NON-JAK QUINASA	STAT
IL-2	Jak1, Jak2, Jak3	Fyn, Lck, Hck, Tec, Syk	Stat5a, Stat5b, Stat3
IL-3	Jak2	Lyn, Hck, Fyn	Stat3, Stat5a, Stat5b
IL-4	Jak1, Jak3	Lck, Tec	Stat6
IL-5	Jak2	Btk	stat1, Stat3, Stat5a, Stat5b
IL-6	Jak1, Jak2, Tyk2	Hck	Stat1, Stat3
IL-7	Jak1, Jak3	Lyn	Stat5a, Stat5b, Stat3
IL-9	Jak3		Stat5a, Stat5b, Stat3
IL-10	Jak1, Tyk2		Stat1, Stat3
IL-11	Jak1, Jak2, Tyk2	Src, Yes	Stat3
IL-12	Jak2, Tyk2	Lck	Stat4
IL-13	Jak1, Jak2, Tyk2	Lsk	Stat3, Stat6
IL-15	Jak1, Jak3	Lck	Stat5a, Stat5b, Stat3
IFNa/b	Jak1, Tyk2	Lck	Stat1, Stat2
IFNg	Jak1, Jak2	Hck, Lyn	Stat1
Epo	Jak2	Lyn	Stat5a, Stat5b
Tpo	Tyk2, Jak2		Stat5a, Stat5b
G-CSF	Jak2, Jak3	Lyn	Stat3
GH	Jak2	Src kinases	Stat5a, Stat5b, Stat3
PRL	Jak2	Src	Stat5a, Stat5b
Leptin	Jak2		Stat3, Stat6, Stat5a, Stat5b
GM-CSF	Jak2	Lyn, Hck	Stat5a, Stat5b
CNTF	Jak1, Jak2, Tyk2		Stat3
CT-1	Jak1, Jak2, Tyk2		Stat3
LIF	Jak1, Jak2, Tyk2	Hck	Stat3
OSM	Jak1, Jak2, Tyk2	Src kinases	Stat3
EGF	Jak1	EGF-R, Src	Stat1, Stat3, Stat5
PDGF	Jak1	PDGF-R, Src	Stat1, Stat3, Stat5
Insulin	Jak2	IR, Src	Stat1, Stat5B

Tabla 2: Papel de las citoquinas y factores de crecimiento transductores de señales en la activación de tirosina quinasas y STAT.

1.INTRODUCCIÓN

STAT3 es un factor de transcripción citoplasmático que juega papeles cruciales en las funciones celulares tales como la proliferación, migración, supervivencia y diferenciación. Existe como dos isoformas como resultado de la partición del gen común. STAT3 α de longitud completa y STAT3 β que carece del dominio de activación C-terminal y se cree que resulta un factor negativo dominante. Mientras que el papel de STAT3 en fibrosis pulmonar todavía es desconocido, estudios realizados en hígado, piel y riñón indican un papel regulador de STAT3 en la patogénesis del proceso fibrótico. Estudios realizados en ratones knockout para SOCS3, un regulador de STAT3, aumentaron la fibrosis hepática atribuida a una sobrerregulación de Tgf- β [101, 102]. La fosforilación de STAT3 (P-STAT3) potencia la fibrosis queloide de tejido y su inhibición reduce los niveles de colágeno. Otro estudio de correlación entre la actividad de STAT3 y la función y lesión renal determinó como P-STAT3 media en la activación intersticial de fibroblastos [103, 104].

La ruta de señalización JAK/STAT está alterada en artritis inflamatoria debido a cambios en la expresión de STAT1, STAT3, STAT4 y STAT6. La capacidad de modular la expresión de estas señales de transducción lo convierte en una diana terapéutica ideal para la actividad de citoquinas inflamatorias tales como TNF- α , IL-1 e IL-6 implicadas en procesos inflamatorios bien sea artritis inflamatoria, FPI u otras enfermedades que cursan con inflamación [94].

Estudios realizados con un modelo de FPI inducida con bleomicina (BLM) mostraron que tanto JAK-STAT1 como JAK-STAT3 juegan un papel importante en el desarrollo de la alveolitis temprana y fibrosis pulmonar [105]. Mientras que la fosforilación del resto tirosina de STAT regula la dimerización, la translocación nuclear y la posterior unión al ADN y por último la fosforilación del resto serina/treonina que regula la actividad transcripcional de la actividad de STAT [96].

Se ha observado la presencia de P-STAT activado en varios tipos de cáncer. El bloqueo de la activación aberrante de STAT3 resulta en una inhibición de crecimiento del tumor e induce la apoptosis celular, lo que sugiere esta vía como posible diana terapéutica en el tratamiento del cáncer. Estudios

realizados con inhibidores de JAK2 han conseguido suprimir los niveles de P-STAT3 en líneas celulares cancerígenas.

Recientemente se ha visto que STAT3 está implicado en la mediación de la patogénesis de la hipertensión arterial pulmonar (HPA), una enfermedad letal con tratamiento limitado. Inhibidores de STAT3 son capaces de revertir la HPA y reestablecer anomalías moleculares. STAT3 ha mostrado ser una potencial diana terapéutica, no solo por su capacidad de inhibir la proliferación celular, supervivencia y mortalidad de células arteriales pulmonares de músculo liso (PASMC), sino también a nivel inmunológico [45]. Esto tiene relevancia teniendo en cuenta que la fibrosis pulmonar es el resultado de una lesión crónica y prolongada, normalmente asociada a la inflamación y a la activación del sistema inmunológico, y puede extrapolarse a otros órganos como la piel, pulmones, riñones, corazón, hígado y estómago [106].

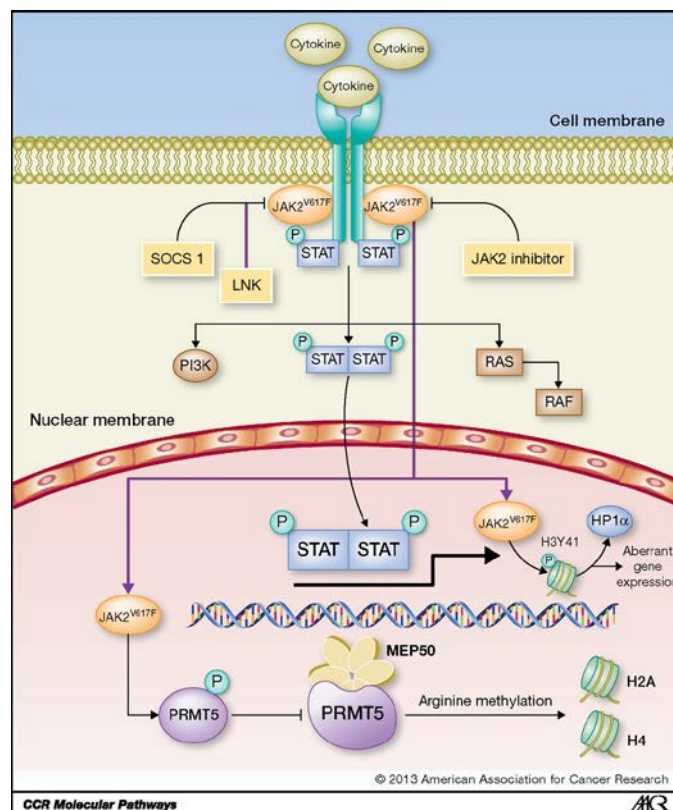


Figura 10: Ruta celular JAK/STAT

1.3.3.1 CUCURBITACINA I, INHIBIDOR DE LA RUTA JAK2/STAT3

La cucurbitacina I (hydrate) (Cul), también descrita como Elatericina B o JSI 124, es un compuesto químico con estructura molecular $C_{30}H_{42}O_7 \cdot xH_2O$ y peso molecular 514,65 g/mol (referencia Sigma). La cucurbitacina se obtiene de la raíz y frutos de la familia de plantas *Cucurbitaceae* y se ha descrito una potente acción antiinflamatoria y anticancerígena [107].

Las cucurbitacinas son triterpenos tetracíclicos altamente oxidativos ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se liberan como feromonas químicas ante peligros biológicos externos. Tanto la cucurbitacina natural como semisintética presentan prometedoras propiedades farmacológicas de carácter antiproliferativo y proapoptóticas para su empleo en enfermedades cancerígenas [108]. La cucurbitacina I está presente en las siguientes familias de cucurbitáceas: *Momordica balsamina* L (Balsam pear), *Cayaponia tayuyá* (Tayuya), *Cucurbita andreana* (Winter Squash), *Citrullus colocynthis* (Bitter cucumber) [107].

El mecanismo de acción de las cucurbitacinas se produce al inhibir la fosforilación de STAT3 y/o JAK2, impidiendo su activación [107].

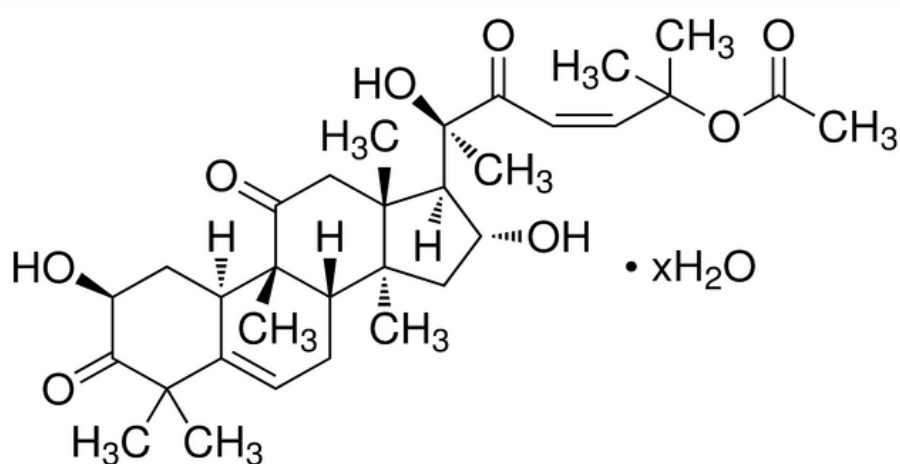


Figura 11: Estructura molecular de la Cucurbitacina I hydrate.

1.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Tal y como se ha descrito previamente, la FPI es una enfermedad de difícil diagnóstico. Los parámetros funcionales utilizados para diagnosticar al paciente con FPI, son la FVC (capacidad vital forzada) y la D_LCO (capacidad de transferencia de CO). Estos parámetros se emplean al diagnosticar y durante la evolución [109-112]. Otros estudios sugieren que la prueba de marcha de seis minutos [113] y los cambios tomográficos [110] también pueden ser útiles para valorar la evolución de la FPI.

1.4.1 DIAGNÓSTICO POR IMÁGENES

1.4.1.1 TOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA DE ALTA RESOLUCIÓN (TCAR)

La TCAR es la herramienta principal de diagnóstico diferencial de las EPIDs ya que no disponemos de ninguna prueba determinante para el diagnóstico de dichas enfermedades. Es importante discernir los distintos patrones radiológicos que atañen a cada enfermedad para lograr el diagnóstico más preciso posible.

La arquitectura pulmonar integra tres componentes que deben ser diferenciados: el intersticio axial, periférico y septal. El intersticio axial comprende el tejido conectivo que subyace en torno a los lechos broncovasculares que emergen del hila pulmonar y se extienden hasta los bronquiolos respiratorios. El intersticio septal consiste en una red de tejido conectivo dentro del lóbulo secundario pulmonar que soporta la estructura íntegra del lóbulo. El intersticio periférico se origina del estrato inferior de la superficie de la pleura visceral y se extiende hacia el parénquima pulmonar. El intersticio periférico es atravesado por las vénulas y los conductos linfáticos que irrigan las regiones periféricas del pulmón.

Los pacientes que sufren FPI presentan un patrón radiológico propio de UIP. Para el diagnóstico de la enfermedad de FPI basta con la presencia de

1.INTRODUCCIÓN

dicho patrón, aun sin evidencia alguna de un diagnóstico clínico alternativo. La precisión de dicho diagnóstico acierta entre 79% y 90%. Las biopsias se reservan para los casos atípicos o inciertos. La TCAR en pacientes con FPI presenta un patrón de enfermedad predominantemente subpleural con gradiente apical-basal [114]. A continuación se describen los diversos distintivos de la enfermedad:

- ❖ Panal de abeja: es la mayor evidencia de fibrosis pulmonar. Se identifican como quistes agrupados en una o más capas en las regiones pleurales. Los quistes suelen ser entre 3 y 10 mm de espesor y presentan un tamaño uniforme. Se diferencian del enfisema por sus paredes engrosadas y bien definidas, normalmente con predominio en el lóbulo inferior y distribución no centrilobular. El panal de abeja presenta áreas de tejido pulmonar destrozado con una pérdida de la arquitectura bronquial.
- ❖ Opacidad reticular periférica: existen diferentes modelos de opacidades observadas en las TCAR. Pueden clasificarse como suaves (edemas hidrostáticos, congestión linfática), irregulares (FPI, linfoma, tumor sólido secundario) y nodular (linfoma, tumores secundarios). En fibrosis se manifiestan como opacidades lineares que muestran bandas en el parénquima en contacto con la pleura y de mayor longitud si se comparan con el septo intralobular. Las líneas subpleurales se observan como densidades curvas que van paralelas o vecinas a la pleura visceral. Las bandas del parénquima y las líneas subpleurales se suelen manifestar en fibrosis o atelectasias.
- ❖ Patrón de vidrio deslustrado: se define como áreas con un aumento de la atenuación que no son suficientemente densas para oscurecer las regiones broncovasculares subyacentes. En FPI presenta una manifestación leve. En ocasiones, siempre y cuando la resolución espacial del scanner lo permita, puede observarse el patrón de vidrio deslustrado ligeramente en el intersticio. En otras enfermedades pulmonares el patrón de vidrio deslustrado habitualmente es indicativo de una reversión del proceso fibrótico, aunque en un tercio de los casos es indicativo de fibrosis. Es importante para el diagnóstico de FPI que al

patrón de vidrio deslustrado lo acompañen el resto de signos propios de la enfermedad.

- ❖ Bronquioectasia: comúnmente asociada con el patrón reticular que indica un estadio avanzado de la enfermedad y distorsión de la arquitectura bronquial.
- ❖ Pérdida del volumen del lóbulo inferior.
- ❖ Solapamiento de signos propios de otras enfermedades como sarcoidosis o hipertensión pulmonar. En presencia de estos patrones atípicos es imprescindible una biopsia.

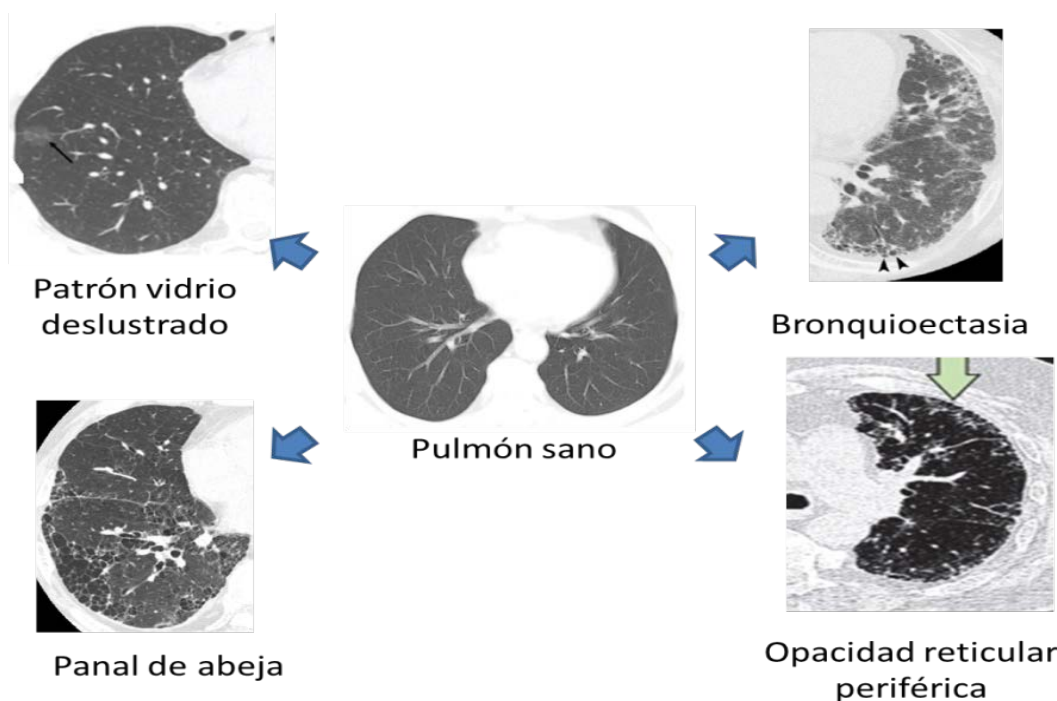


Figura 12: Patrón radiológico característico de fibrosis pulmonar en humanos.

1.4.1.2 TOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA POR EMISIÓN DE FOTONES SIMPLES (SPECT)

La técnica de SPECT es una técnica no invasiva que permite la cuantificación y la localización espacial de los procesos fisiológicos, metabólicos y patológicos en humanos mediante el uso de un trazador

1.INTRODUCCIÓN

radioactivo o marcado con un compuesto radioactivo. Los fotones emitidos a distintos ángulos por el radiotrazador son registrados en una gammacámara. Dichos datos registrados se reconstruyen obteniendo una imagen en 3D de la distribución de la radioactividad. La existencia de una amplia variedad de trazadores o radiofármacos fáciles de obtener y a un coste relativamente bajo, permite que sea una técnica puntera en la identificación de enfermedades de difícil diagnóstico [115].

La técnica de SPECT se emplea para realizar estudios combinados de ventilación y perfusión utilizando macroagregados de albúmina (MAA) marcados con tecnecio 99 metaestable (^{99m}Tc). Los MMA presentan un tamaño de partículas entre 10-150 μm lo que permite que se queden atrapadas en la microcirculación pulmonar cuando se administran vía intravenosa. El DTPA- Tc^{99m} se administra nebulizado en forma de aerosol para la obtención de estudios de ventilación pulmonar. El ^{99m}Tc tiene una semivida de 6 horas, lo que lo convierte en un radioisótopo óptimo para los estudios pulmonares. Otros radioisótopos empleados en estudios pulmonares poseen unas semividas que limitan los ensayos. Algunos ejemplos son el Xenon-133 con semivida de 5,3 días; Krypton-81m con semivida de 13s y el Indio-113, con semivida de 100min. La administración del radiofármaco por vía intravenosa y por vía inhalatoria nos permite observar la distribución sanguínea y la distribución de las vías aéreas en los sujetos de estudio y así evaluar la ventilación y perfusión pulmonar [115].

La combinación del sistema multimodal SPECT-tomografía computerizada (CT) nos permite fusionar las imágenes anatómicas con las imágenes funcionales adquiridas. Las imágenes del CT nos proporcionan información adicional sobre la localización exacta de los procesos fisiológicos funcionales identificados con el SPECT.

1.4.1.3 DIAGNÓSTICO POR IMÁGENES EN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

En la última década se han adaptado las técnicas de diagnóstico por imágenes a la experimentación animal gracias a los equipos de tomografía microcomputarizada (micro-CT). Esta técnica es idónea para la evaluación de la función pulmonar ya que en particular en el pulmón, existe una diferencia de contraste entre aire y tejido pulmonar que permite cuantificar y comparar la función pulmonar de un mismo sujeto experimental. Además, permite realizar el seguimiento de la evolución animal in vivo, sin necesidad de sacrificar sujetos a lo largo del procedimiento experimental para verificar la correcta inducción de la enfermedad.

El micro-CT se emplea tanto en enfermedades agudas como crónicas, proporciona información complementaria a la evaluación histológica, dado que la técnica no es destructiva. También se emplean en estudios in vivo e in vitro. Los animales vivos evalúan la función pulmonar y los tejidos fijados se emplean para estudios estructurales. Recientemente los equipos de micro-CT se han combinado con la tecnología SPECT y tomografía por emisión de positrones (PET) lo que permite fusionar imágenes anatómicas con imágenes funcionales capturadas al mismo tiempo además de la posibilidad de realizar estudios dinámicos [116].

1.4.2 MARCADORES MOLECULARES

La importancia de los marcadores moleculares radica en que el diagnóstico de la FPI, a día de hoy, reside básicamente en las imágenes radiológicas y las biopsias de pulmón. Los marcadores moleculares y principalmente aquellos identificados en suero, acelerarían el diagnóstico de la enfermedad. En los años 90 se identificaron varios marcadores en suero de pacientes con FPI entre los que cabe destacar las proteínas surfactantes A y D (SP-A y SP-D), antígeno krebs von den lungen (KL-6), lactato deshidrogenasa

1.INTRODUCCIÓN

(LDH) y recientemente se identificó el ligando 18 de la CC-quimiocina (CCL-18) [117].

La SP-A y SP-D son proteínas hidrófilas surfactantes producidas y secretadas por los neumocitos tipo II. Aparecen a altas concentraciones en enfermedades inflamatorias pulmonares. En el caso de FPI se cree que es debido a la combinación de la pérdida de integridad de la membrana epitelial y al incremento de neumocitos tipo II debido a la hiperplasia. KL-6 es una glicoproteína de alto peso molecular similar a las mucinas que se expresa en los neumocitos alveolares tipo II. Las concentraciones de KL-6 en suero y LBA se encuentran elevados en pacientes con fibrosis pulmonar. Varios estudios han correlacionado la presencia de KL-6 con alveolitis y ha sido asociado a estudios de supervivencia [118]. La LDH es una enzima citoplasmática que se libera al espacio extracelular en condiciones de daño celular o apoptosis. Se considera un potente marcador de la enfermedad, aunque inespecífico. La quimiocina CCL18 se produce por las células mieloides y juega un papel importante en los procesos de reparación de tejidos y fibrosis. CCL18 regula la producción de colágeno por los fibroblastos pulmonares y se produce en abundancia en los macrófagos alveolares de pacientes con FPI [119]. Estudios realizados en 72 pacientes con FPI han establecido el CCL18 como el primer biomarcador capaz de predecir la mortalidad [117].

Alteraciones producidas en el LBA suelen consistir en neutrofilia asociada o no a moderada eosinofilia. La linfocitosis no es una característica de la FPI; cuando el porcentaje de linfocitos es superior al 15% o el de eosinófilos mayor del 20%, deben descartarse otros diagnósticos [120]. Cuando los pacientes no cumplen estrictamente los criterios clínico-radiológicos, la biopsia pulmonar a cielo abierto sigue siendo necesaria, lo que ocurre en el 25-40% de casos.

1.4.3 MARCADORES GENÉTICOS

La existencia de un componente genético en el desarrollo de la enfermedad resulta evidente gracias a estudios realizados en familias multigeracionales, gemelos y hermanos criados por separado que presentan la enfermedad. La FPI ha sido asociada a mutaciones puntuales de proteína

surfactante C, proteína surfactante A2, y genes implicados en el acortamiento de telómeros como TERT y TERC. Se han identificado polimorfismos en la región promotora del gen MUC5B, estrechamente relacionado con la fibrosis familiar y esporádica tal y como se ha descrito con anterioridad. Estudios de asociación genómica realizados en individuos de raza blanca no hispánicos con FPI, identificaron la asociación de loci de TERT y MUC5B, cercanos al loci de TER, junto con la identificación de otros nuevos loci: FAM13 A, DSP, OBFC1, ATP11 A y DPP9 [17].

Estudios asociación genética del parénquima pulmonar coinciden en la expresión de genes y rutas metabólicas implicados en la formación, degradación y señalización de la ECM, marcadores de músculo liso, factores de crecimiento, genes que codifican para inmunoglobulinas, complemento y quimiocinas. Las vías de señalización de SHH, factor de crecimiento de fibroblastos, PDGF, y WNT también han sido expresadas en pacientes con FPI. Se ha empleado sangre periférica para estudios de expresión génica en pacientes que presentan la enfermedad y determinaron la sobreexpresión de MMP1, MMP7, MMP8, IGFBP1 y TNFRSA1F [17].

1.5 APROXIMACIONES FARMACOLÓGICAS

Actualmente no existe ningún tratamiento eficaz ni específico aprobado por la EMA (Agencia Europea de Medicamentos) o la FDA (Food and Drug Administration) para la fibrosis pulmonar idiopática. Sí existe un tratamiento específico aprobado recientemente en Japón [121-123].

Tal y como se ha descrito con anterioridad, la teoría patogénica inicial consideraba la FPI como consecuencia de una agresión inicial no identificada que iniciaba el ciclo de una inflamación crónica que se traducía en fibrosis. La presunción de que la interrupción de la cascada inflamatoria antes de la presencia de una lesión parenquimatosa irreversible podría aliviar la fibrosis, propició que el tratamiento con antiinflamatorios pareciera razonable. Tradicionalmente se han usado corticosteroides, inmunosupresores o citotóxicos. No obstante, en la actualidad se ha aclarado que estas opciones de

1.INTRODUCCIÓN

tratamiento no confieren un beneficio demostrado y producen efectos adversos potencialmente graves.

En el año 2011, los siguientes organismos internacionales, ATS, ERS, Japanese Respiratory Society y la Asociación Latinoamericana del Tórax, consensuaron y publicaron una guía para el tratamiento de la FPI. En ellas se establecieron como primera línea de abordaje de la enfermedad, el aporte exógeno de oxígeno, la rehabilitación pulmonar y el trasplante de pulmón según proceda [8].

1.5.1 TRATAMIENTOS CONVENCIONALES

A continuación, se resumen las propiedades de los tratamientos que se han utilizado hasta el momento como opción terapéutica para la FPI. Desde los medicamentos más convencionales como es el uso de corticoides y citotóxicos hasta tratamientos más actuales.

1.5.1.1 CORTICOIDES

A pesar de que los corticosteroides se han considerado la base principal del tratamiento durante décadas, no hay disponibles ensayos controlados que hayan usado estos agentes solos para el tratamiento de la FPI. En una revisión de estudios no controlados, los autores revelaron que la mejora a corto plazo de la función pulmonar no afectó a la supervivencia a los 3-5 años [124] y el hecho de que estos estudios sean anteriores al consenso de diagnóstico para las enfermedades intersticiales de la ATS/ERS, no genera pruebas concluyentes que respalden su uso para la FPI [125].

1.5.1.2 AGENTES INMUNOMODULADORES

La azatioprina y la ciclofosfamida son los fármacos de segunda línea utilizados con más frecuencia, habitualmente en combinación con corticosteroides. [126].

- Ciclofosfamida: Antineoplásico de tipo fosforamida, del grupo de las mostazas nitrogenadas. Se absorbe por vía oral y en el hígado se activa por biotransformación a varios compuestos citotóxicos que inhiben la función linfocitaria [15].
- Azatioprina: Es un análogo de purina que es convertido a mercaptopurina en los tejidos del organismo. Este inhibe la adenina desaminasa, que perjudica la proliferación de células, sobre todo leucocitos y linfocitos. Es menos tóxico que la ciclofosfamida. No induce lesión en la vejiga y presenta discreto potencial oncogénico discreto [15].

1.5.1.3 OTROS TRATAMIENTOS

- Pirfenidona: Es un componente piridínico que en modelos animales ha demostrado un amplio rango de efectos, como son antifibrótico, antiinflamatorio y antioxidante; sin embargo, su mecanismo de acción concreto se desconoce. Tras varios ensayos clínicos de fase II y III realizados en Japón, que concluían que la pirfenidona podía disminuir la progresión de la enfermedad, en 2008 se comercializó en el mercado de Japón, siendo así el primer medicamento aprobado para la FPI en un gran mercado [127].
- N-acetilcisteína (NAC): Es el derivado n-acetilado del aminoácido natural cisteína. Reduce la viscosidad de las secreciones bronquiales, favoreciendo su eliminación. Debido a la presencia de un grupo tiólico libre, es capaz de romper los puentes disulfuro que mantienen la estructura tridimensional de las mucoproteínas, lo que da lugar a la fluidificación de la secreción. Posee propiedades antioxidantes, y como tal, previene del daño celular epitelial mediado por radicales libres. NAC

1.INTRODUCCIÓN

aumenta la síntesis de glutatión, un potente mediador antioxidante tanto in vitro como in vivo, y su administración por vía oral disminuye la respuesta fibrótica en ratones expuestos a bleomicina [128-131]. Estudios llevados a cabo en humanos durante un año, concluyen que los pacientes que toman NAC a dosis elevadas, sufren menos deterioro en la DLCO y FCV [132]. Esto sumado a la ausencia de efectos secundarios, hace que este fármaco se esté añadiendo a la combinación terapéutica convencional.

- INF- γ : Es una citoquina que regula la función de los macrófagos e inhibe la fibrogénesis. Combinada con un glucocorticoide mejora la estabilización de la enfermedad en pacientes en estadios poco avanzados de FPI[133]. En cambio, en pacientes más graves no parece que beneficie ni mejore la supervivencia [127].
- Antagonistas de la ET-1: La ET-1 ha mostrado ser una molécula con fuertes efectos fibrogénicos, como la inducción de proliferación de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos e incremento de la síntesis de moléculas de la matriz extracelular. Se encuentra incrementada en los pulmones de pacientes con FPI, donde la expresan sobre todo las células del epitelio alveolar. Experimentalmente se ha demostrado que la inyección percutánea de un plásmido que expresa endotelina en pulmones de rata induce cambios fibróticos que se localizan específicamente en las regiones donde se expresa este gen [134, 135]. Asimismo, ratones transgénicos que sobreexpresan la pre-proendotelina 1 humana desarrollan fibrosis pulmonar difusa y progresiva sin ninguna agresión desencadenante[136]. Sobre la base de estos hallazgos se ha intentado su bloqueo en modelos experimentales y así se ha demostrado que la administración oral de bosentán, un antagonista no selectivo del receptor de la ET-1, protege contra la fibrosis inducida por bleomicina en ratas [79].
- El bosentán se utiliza actualmente para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar y es bien tolerado por esta población de pacientes [137]. Se sugiere que el bosentan pueda mejorar la disnea y la calidad

de vida [138]. Actualmente se están llevando a cabo 5 ensayos clínicos que aportaran más información en el futuro.

- Etanercept: Es un antagonista de los receptores solubles de TNF, que se utiliza para el tratamiento de la artritis reumatoide. El TNF es una citocina multifuncional que parece tener algunas actividades profibróticas [15].
- Anticoagulantes: Es una terapia en investigación. Se sabe que durante los procesos alveolíticos o fibróticos se produce trombosis. La anticoagulación combinada con prednisolona parece tener efecto beneficioso en la supervivencia de pacientes con FPI [139].
- Relaxina: Es también una terapia en investigación. Se trata de una hormona peptídica de la superfamilia de la insulina, y está involucrada en el remodelado de la matriz extracelular. Ha demostrado eficacia en modelos animales de fibrosis: reduce el contenido de colágeno y el espesor alveolar. Concretamente se ha visto que reduce la expresión de Col-1y Col-3, y de fibronectina en el pulmón como respuesta a Tgf- β (agente fibrogénico). Además inicia la degradación de la matriz extracelular aumentando los niveles de metaloproteinasas de matriz [140].
- Trasplante pulmonar: Se debe considerar para aquellos pacientes que presenten un progresivo deterioro a pesar del tratamiento farmacológico, y siempre que cumplan los criterios de inclusión para su realización. La escasa disponibilidad de órganos válidos para el trasplante deriva de dos factores principales [141-143]: a) la extraordinaria sensibilidad de los pulmones a la infección y a la lesión producida por la ventilación mecánica durante el período de ingreso en la unidad cuidados intensivos, y b) los donantes de órganos están desplazándose hacia las bandas de mayor edad, por lo que queda excluida la donación de pulmón en muchos casos. En 2005 la media de edad de los donantes multiorgánicos en España se situó en 51,4 años, frente a los 34,5 del año 1992.

1.INTRODUCCIÓN

A la carencia de órganos disponibles hay que sumar la mortalidad en lista de espera de trasplante de pulmón (el 5,3% en 2006) y la restrictiva entrada de candidatos. En la mayoría de los casos se realiza trasplante unipulmonar. La supervivencia a los 5 años después del trasplante es del 50-60%.

Probablemente la terapia efectiva pase por la combinación de varios de estos fármacos antifibróticos y de otros en estudio, actuando a diferentes niveles del proceso fibrogénico pulmonar. Se ha sugerido que el recambio del epitelio alveolar dañado por células sanas de la misma estirpe, podría ser un tratamiento eficaz en la FPI. Estos estudios con utilización de células madre todavía deben resolver algunos problemas básicos pero esenciales, como son el número total de células necesarias, rechazo inmunológico, vía de administración adecuada, y el control de su diferenciación una vez llegado al tejido pulmonar[144], por lo que sigue siendo una opción a largo plazo. No obstante, es importante recalcar que los últimos resultados en este sentido con experimentación animal son bastante satisfactorios [145].

Por otra parte los recientes resultados del ensayo clínico llevado a cabo por el consorcio IPF-Net PANTHER han mostrado que la terapia anti-inflamatoria/inmunomoduladora con prednisona/azatioprina y NAC (tratamiento clásico de la FPI durante décadas), no solo no redujo la mortalidad sino que tuvo que ser finalizado prematuramente por aumento de la mortalidad en el brazo de tratamiento [38]. En la prolongación de este mismo estudio, el brazo con NAC versus placebo no aportó ninguna diferencia significativa [146].

1.5.2 NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS

La ausencia de ensayos clínicos recientes que aborden el tratamiento de la enfermedad desde un sentido amplio puede explicarse dada la heterogeneidad biológica y genética de la enfermedad. Las aproximaciones farmacológicas planteadas estos últimos años tienen un fondo genético por lo que las nuevas terapias van dirigidas a las terapias personalizadas en base a los biomarcadores que se encuentran sobreexpresados en cada enfermo [42].

1.5.2.1 INHIBIDORES DE LAS TIROSINA QUINASAS

- **Imatinib:** El imatinib es un inhibidor de la tirosincinasa c-Abl, que también inhibe la activación del receptor del PDGF. Disminuye sustancialmente la fibrosis de la médula ósea en seres humanos. Se han registrado 6 casos de neumonitis inducida por este fármaco, y uno de ellos era en un paciente afectado de FPI [147].
- **Nintedanib:** es un inhibidor de la triple-tirosina quinasa y un potente antagonista de factores de crecimiento como el PDGF, VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos y se encuentra en la actualidad en ensayo clínico fase III. El tratamiento con nintedanib a altas dosis ha mostrado una disminución de la frecuencia de las exacerbaciones, mejora de la calidad de vida, enlentecimiento de la progresión de la fibrosis pulmonar en pacientes con FPI moderada.
- **Tofacitinib** (Xeljanz® Pfizer): es un inhibidor de JAK en fase III para el tratamiento de artritis reumatoide. Presenta selectividad funcional para las rutas JAK1/JAK2, JAK1/JAK3 y JAK2/JAK2 Tiene una capacidad inhibitoria de 20 a 100 veces superior por JAK3 que por el resto de JAKs. Se une al lugar de unión de la adenosina trifosfato (ADP) de TyK2 y forma interacciones polares y apolares con una serie de residuos... La inhibición de la actividad STAT produce una alteración en la expresión de genes, pudiendo modular la hematopoyesis y la respuesta inmunológica [94].

1.5.2. TERAPIAS ACTUALES Y EN DESARROLLO EN LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA.

Actualmente, los recientes hallazgos derivados de los ensayos clínicos ASCEND (pirfenidona) [148] e IMPULSIS (nintedanib; inhibidor multi-tirosinquinasa FGFR, VEGFR, PDGFR) [149] publicados en 2014, han desplazado a la FPI de una enfermedad intratable a una enfermedad tratable. Sin embargo, la tasa de mortalidad de la FPI sigue siendo hoy día inaceptable,

1.INTRODUCCIÓN

por lo que los esfuerzos público-privados en el desarrollo preclínico y clínico de nuevos tratamientos para la FPI están en auge [42]. Es por ello que urge la necesidad de profundizar en el conocimiento de esta enfermedad para desarrollar nuevos tratamientos y mejorar la esperanza de vida.

En el ensayo clínico STEP-IPF con el inhibidor de la PDE5 sildenafil se determinó una mejora en el test de 6 minutos marcha (por 99,3m) en el subgrupo de pacientes con FPI y disfunción sistólica ventricular derecha, lo cual se asoció a una mejora de la calidad de vida posiblemente por medio de la disminución de la HP [150]. Aunque eficaz en la HP, los antagonistas de los receptores de la ET-1 no han mostrado resultados positivos en la FPI tal y como muestran los ensayos con bosentan, ambrisentan (ARTEMIS-IPF) y macicentan (ensayo MUSIC). Actualmente existen ensayos clínicos con anticuerpos dirigidos contra CCL2 (MCP-1) (CNTO-888), CTGF (FG-3019), LOXL2 (GS6624), TGF β 1 (GC1008), IL-13 (QAX576) y α v β 6 integrina sin resultados disponibles.

Con todo ello, aunque ha habido numerosos intentos para reducir la progresión de la FPI, los resultados han sido decepcionantes, causando más bien un empeoramiento de la enfermedad, a excepción de los casos de pirfenidona y nintedanib.

Después de todo, ¿cómo debe un fármaco combatir la FPI?, ¿mediante el diseño específico o mediante el parecido?. Obviamente, basándonos en el conocimiento actual de los mecanismos de la FPI, un fármaco ideal debería (i) atenuar el fenotipo invasivo/ agresivo de los fibroblastos pulmonares, (ii) proteger las células alveolares tipo II de la apoptosis/ estrés, (iii) o reducir el fenotipo profibrótico de los macrófagos alveolares M2. Esto debería incluir y extenderse a prevenir las transiciones epitelial alveolar y endotelial a fenotipos mesenquimales (EMT y EnMT), transiciones de pericitos o células mesoteliales a miofibroblastos, así como reducir el reclutamiento de fibrocitos circulantes a los pulmones y su transformación a miofibroblastos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de la presente tesis doctoral está basada en las siguientes consideraciones, expuestas anteriormente, y resumidas a continuación:

- La FPI es una enfermedad pulmonar crónica, progresiva de etiología desconocida y con una esperanza de vida de entre 2-5 años desde el momento del diagnóstico.
- La acumulación excesiva de la matriz extracelular así como el remodelado de la arquitectura bronquial, son consecuencias de la proliferación de fibroblastos y la desintegración de la matriz extracelular.
- Los fibrocitos circulantes son células progenitoras mesenquimales que se extravasan al foco de la lesión tisular, se diferencian a fibroblastos y miofibroblastos, y contribuyen a la generación de matriz extracelular durante la fibroproliferación [41, 51].
- La activación patológica de determinadas PTKs pueden promover la el remodelado vascular y la fibrogénesis [83] por su implicación en la modulación y activación de fibroblastos.
- Las JAKs poseen influencia celular en procesos como la hematopoyesis y respuestas inmunológicas ya que se encuentran implicadas en respuestas inflamatorias mediada por las citoquinas liberadas se unen a los receptores de membrana iniciando la respuesta intracelular [94].
- Estudios previos han asociado la ruta de transducción de la señalización de JAK2/STAT3 a la fibrosis pulmonar. La persistente activación de JAK2/STAT3 ha sido documentada en cánceres hematológicos. La inhibición selectiva de JAK2 previene la fosforilación y dimerización de STAT3.
- Recientemente se ha publicado el papel regulador de STAT3 en la patogénesis del proceso fibrótico en estudios realizados en hígado, piel y riñón. Estudios knockout para reguladores de STAT3

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

aumentaron la fibrosis hepática atribuida a una sobrerregulación de Tgf- β [101, 102].

- La fosforilación de STAT3 potencia la fibrosis que loide de tejido y su inhibición reduce los niveles de colágeno. P-STAT3 media en la activación intersticial de fibroblastos en la lesión renal [103, 104].
- El mecanismo de acción de las cucurbitacinas consiste en la inhibición de la fosforilación de STAT3 y/o JAK2, impidiendo su activación [107].
- Estudios realizados con un modelo de FPI inducida BLM mostraron que tanto JAK-STAT1 como JAK-STAT3 juegan un papel importante en el desarrollo de la alveolitis temprana y fibrosis pulmonar [105].
- Estudio de la expresión y distribución de JAK2/STAT3 en tejido pulmonar de pacientes con FPI y FPI con HP asociada.

Basados en los antecedentes anteriormente descritos es razonable hipotetizar que la ruta molecular JAK2/STAT3 pueda estar sobreactivada en los diferentes actores celulares y procesos fisiopatológicos participantes en el desarrollo y perpetuación de la FPI. En base a los antecedentes expuestos se establece la siguiente hipótesis:

- La ruta molecular JAK2/STAT3 se encuentra involucrada en la activación de fibroblastos (proliferación y migración) de pacientes con FPI, además de en las transformaciones celulares como son la EMT, EnMT, así como la formación de miofibroblastos a partir de fibroblastos, fibrocitos, células musculares de arteria pulmonar, pericitos o células mesoteliales pulmonares, además de participar en el remodelado ventricular derecho, vasconstricción arterial pulmonar e HP, participando así en el desarrollo y progresión de la enfermedad.

- Una terapia dirigida a bloquear, JAK2, STAT3, o bien realizando un bloqueo dual JAK2/STAT3 puede mejorar de forma significativa la evolución de la FPI por medio de un abordaje múltiple de los procesos moleculares y celulares participantes en esta devastadora enfermedad.
- El mecanismo de acción de las cucurbitacinas se produce al inhibir la fosforilación de STAT3 y/o JAK2, impidiendo su activación [107]. Recientemente se ha visto que STAT3 está implicado en la mediación de la patogénesis de la HP, una enfermedad letal con tratamiento limitado. Inhibidores de STAT3 son capaces de revertir la HP y reestablecer anormalidades moleculares.
- STAT3 ha mostrado ser una potencial diana terapéutica, no solo por su capacidad de inhibir la proliferación celular, supervivencia y mortalidad de PASM, sino también a nivel inmunológico [45]. Los resultados obtenidos son de relevancia clínica ya que la fibrosis pulmonar se produce como consecuencia de una lesión crónica y prolongada, normalmente asociada a la inflamación y a la activación del sistema inmunológico, que puede extrapolarse a otros órganos como la piel, pulmones, riñones, corazón, hígado y estómago.

Es por ello que la presente tesis doctoral pretende estudiar los efectos de la administración farmacológica de inhibidores de la ruta metabólica JAK2/STAT3 en modelos de fibrosis pulmonar *in vivo*.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es evaluar la posible participación de JAK2 y STAT3 en la activación y las transformaciones celulares que participan en la FPI, así como en los aspectos clínicos y funcionales característicos como base preclínica y traslacional de futuros tratamientos. Para ello se establecerán los siguientes subobjetivos:

Con el fin de evaluar la validez de la hipótesis planteada, se establecen los siguientes subobjetivos, que se desarrollan en dos estudios diferenciados:

Estudio I. Efecto de la inhibición de la ruta metabólica JAK2/STAT3 en un modelo preventivo y curativo de fibrosis pulmonar idiopática en ratas Wistar. Aproximación clínica.

- i) Seguimiento in vivo de la instauración y evolución de la fibrosis pulmonar y del efecto de la administración intraperitoneal de un inhibidor JAK2/STAT3 mediante técnicas de imagen SPECT/CT.
- ii) Evaluación del efecto inhibitorio de las cucurbitacinas a nivel histológico: remodelado tisular, engrosamiento de las paredes arteriales.
- iii) Estudiar la presencia de marcadores tisulares y moleculares característicos del proceso de fibrosis pulmonar.

Estudio II. Estudio de la expresión y distribución de JAK2 y STAT3 en tejido de pacientes con fibrosis pulmonar.

iv) Estudiar los efectos de la Cul en la expresión y distribución de marcadores de JAK2 y STAT3 en tinciones inmunohistoquímicas de biopsias de tejido pulmonar en pacientes con FPI frente a pacientes sanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 FÁRMACOS ENSAYADOS

Los fármacos empleados en este estudio han sido, la Bleomicina, como agente inductor de fibrosis pulmonar, y la Cucurbitacina, ensayado como fármaco antifibrótico.

La bleomicina es un antibiótico empleado en el tratamiento inicial de linfomas, tumores testiculares y carcinomas de células escamosas. Fue identificado por primera vez por Umezawa et al. en el año 1966 [151] mientras investigaban nuevos agentes antitumorales. Se obtiene de la fermentación de *Streptomyces verticillus*. Es un glucopéptido citotóxico con un peso molecular de 1415.55 g/mol.

Su acción antineoplásica se debe a la inducción de la muerte de células tumorales, y a la inhibición de la angiogénesis. La bleomicina tiene un efecto sobre el ion ferroso (Fe^{+2}) que se une al ADN. Existen dos lugares funcionales, el dominio de unión al ADN y el dominio de unión al metal. La unión del complejo bleomicina- Fe^{+2} reduce el oxígeno molecular (O_2) del medio. Se crean radicales libres de O_2 que romperán el ADN por el C4' de la desoxirribosa.

Produce un síndrome de toxicidad pulmonar caracterizado por fibrosis pulmonar en un 10% de los casos [151]. La toxicidad se relaciona con la dosis acumulativa.

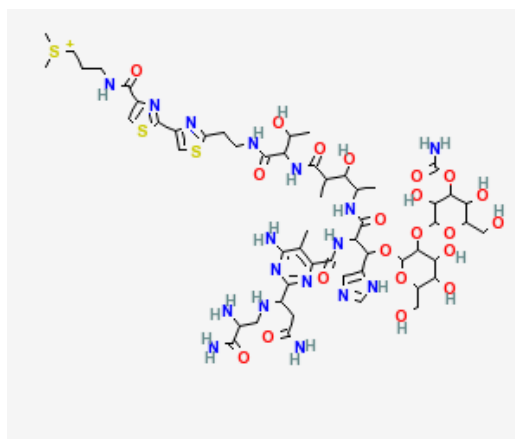


Figura 13: Estructura molecular de la bleomicina.

3.1.2 REACTIVOS

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Ácido acético glacial	Panreac	Ref. 361008
Ácido cítrico anhidro	Panreac	Ref. 141808
Ácido clorhídrico (HCl)	Panreac	Ref. 131020
Ácido fosfomolibdico	VWR Prolabo	Ref. 20616184
Ácido tricloroacético (cloroformo)	Panreac	Ref. 151067
Acrilamida	Sigma-Aldrich	Ref. A3574
Agua dietilpirocarbonato (DEPC)	Applied Biosystems	Ref. AM9906
Albúmina sérica bovina (BSA)	Sigma-Aldrich	Ref. A7906
Amonio persulfato	Sigma-Aldrich	Ref. A3678
Anfotericina B	Lonza Group LTD	Ref. 17-836E
Azul de anilina	VWR Prolabo	Ref. 21999183
Azul de tripano	Molecular Probes, Invitrogen	Ref. T10282
Bleomicina sulfato 15UI (Sol. Inyectable)	Merck	C.N:656759
Carbonato de litio	Sigma-Aldrich	Ref. 100979413
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	Panreac	Ref. 141396
Cloruro de sodio (NaCl)	Panreac	Ref. 141659
Cóctel inhibidor de proteasa	Sigma	P8340
Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent	Thermo Scientific	Ref. 1856210
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich	Ref. 34869
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Sigma-Aldrich	Ref. L3771
DPX	Panreac	Ref. 255254
ECL plus	Amersham GE Healthcare	Ref. RPN2132
EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)	Sigma	Ref. ED2SC
EGTA (ácido etilenglicol tetraacético)	Sigma	Ref. E3889
Ensayos de Expresión Génica TaqMan®	Applied Biosystems	Tabla 16 (apartado 3.2.4.3)
Eosina amarillenta	Panreac	Ref. 251299
Etanol absoluto	Panreac	Ref. 361086
Formol 10%	Panreac	Ref. 143091
Glicerol	Sigma-Aldrich	Ref. G5516
Glicógeno	Calbiochem	Ref. 361507
Hematoxilina	Sigma-Aldrich	Ref. GHS332
Hematoxilina de Ehrlich	Sigma-Aldrich	Ref. GHS322
Hematoxilina de Harris	Panreac	Ref. 253949

Reactivo	Casa comercial	Referencia
HEPES (Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazino etanosulfónico)	Sigma-Aldrich	Ref. H4034
Hidróxido sódico (NaOH)	Panreac	Ref. 131687
Isoflorano	Baxter SL.	ARREANE
Isopropranol	Sigma	Ref. I9516
Ketamina	(Imalgene®) Merial	904886
Kit "Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System"	GE Healthcare	Ref.RPN225
Kit "Taq Man para la retrotranscripción inversa"	Applied Biosystems	Ref. N8080234
Kit BCA para cuantificación de proteínas	Pierce	Ref. 23227
Kit BCA Protein Assay	Thermo Scientific	Ref. 23225
Kit de tinción panóptica	Panreac	Ref. 254807.0922
Marcador de peso molecular Amersham High-Range Rainbow	GE Healthcare	Ref. RPN756E
Medetomidina	(Domtor®) Esteve	135089-1
Medio de montaje rápido para microscopía óptica	FLUOPREP Biomerieux	75521
Metanol	Sharlab	Ref. ME03262500
Nonidet P 40	Sigma	Ref. 74385
Parafina	Sigma-Aldrich	Ref.P3683
Paraformaldehído 4%	Panreac	Ref.252931
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma	Ref. P7626
Polietilenglicol 400	Panreac	Ref. 162436
Ponceau de silidina	Merk	Ref. 1159270025
Tampón de lisis para la purificación de ácidos nucleicos Nucleic Acid Purification Lysis Solution.	Applied Biosystems	Ref. 4305895
Tampón salino fosfato (PBS)	Sigma-Aldrich	Ref.P4417
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems	Ref. 4369016
Tetramethylethylenediamine para electroforesis (TEMED)	Sigma-Aldrich	Ref.T9281
Triton X-100	Panreac	Ref. 142314
Trizol	Roche Diagnostics	Ref.1667157001
Tween20	Sigma-Aldrich	Ref.P1379
Xileno	Merck	Ref. 481769
β-Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	Ref. M6250

3.1.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los procedimientos realizados con animales de experimentación fueron previamente aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Comisión de Ética de la Universidad de Valencia y por el Comité Ético para la Experimentación Animal (CEEA) de la Fundación de Investigación del Hospital General de Valencia.

Se emplearon ratas macho Wistar Han[®] (Harlan[®]) de 9 semanas de edad y de un peso aproximado de entre 250-350 g. Los animales permanecieron siete días en cuarentena previamente al inicio del experimento (periodo de aclimatación). Los animales fueron estabulados a lo largo de todo el estudio con comida (dieta Harlan[®] Ref. 2014) y agua *ad libitum*. Se repartieron de forma aleatoria en jaulas y éstas a su vez en grupos experimentales distintos. Para realizar un seguimiento individualizado de cada rata, se identificó al animal mediante rayas pintadas en la cola. Las condiciones estándar del animalario fueron:

- Humedad relativa $55 \pm 10\%$.
- Temperatura $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Renovación del aire a 15 ciclos por hora.
- Ciclo luz/oscuridad 12/12 horas.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 ESTUDIO I: EFECTO DE LA CUCURBITACINA I HYDRATE EN MODELO DE FIBROSIS PULMONAR ANIMAL

3.2.1.1 MODELO ANIMAL

La fibrosis pulmonar en rata se indujo mediante instilación intratraqueal. Con la ayuda de un otoscopio (Riestar[®]) y de un fiador, se introdujo por la tráquea una cánula de 16G a través de la cual se instiló un volumen de solución salina de sulfato de bleomicina en dosis única de 3,75 UI/Kg según se indica en la tabla 3. La administración de BLM se realizó mediante jeringas estériles de insulina (BD Plastipak[®] 1 mL). Previa a la administración, para verificar la correcta canulación intratraqueal, se insuflaron 2 mL de aire y se comprobó el inflamamiento pulmonar. Tras la administración se insufló 1 mL de aire para facilitar el arrastre del producto y asegurar la correcta administración del antibiótico. Los animales del grupo control recibieron el mismo volumen de solución salina libre de bleomicina (Tabla 3).



Figura 14: Otoscopio (Riestar[®]) empleado en la canulación intratraqueal

La inducción de fibrosis en este estudio se realizó siempre el día 1 del experimento, coincidiendo con el inicio del tratamiento farmacológico en el modelo preventivo y 7 días antes en el modelo curativo [152]. El tratamiento farmacológico se administró diariamente hasta el día 21.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

BLEOMICINA 3,75 UI/kg BLM[]i 15 UI/2mL		
PESO g	UI/peso	µL admistración IT
200	0,75	100
210	0,79	105
220	0,83	110
230	0,86	115
240	0,90	120
250	0,94	125
260	0,98	130
270	1,01	135
280	1,05	140
290	1,09	145
300	1,13	150
310	1,17	155
320	1,21	160
330	1,25	165
340	1,29	170

Tabla 3: Dosificación de la administración intratraqueal de bleomicina o suero.



Figura 15: Administración intratraqueal de bleomicina empleada en la inducción de fibrosis pulmonar. Rata Wistar Han® (Harlan®) administración intratraqueal de 3.75 UI/Kg de bleomicina.

3.2.1.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

La presente tesis doctoral se dividió en dos estudios, un modelo preventivo y otro curativo. Ambos estudios se realizaron en ratas macho Wistar Han[®] (Harlan[®]) de 9 semanas de edad.

El número inicial de animales en cada grupo fue de 6 sujetos experimentales para disminuir la variabilidad interindividual intraespecie, y porque el modelo animal de fibrosis con bleomicina ofrece aproximadamente un 75 % de supervivencia para los grupos afectados de fibrosis pulmonar. Los animales se pesaron de forma periódica durante todo el experimento. Los grupos control se sometieron al mismo procedimiento experimental, pero se les administró suero salino en todos los casos. Con el fin de evaluar la instauración y evolución de la enfermedad, se realizaron pruebas de ventilación y perfusión mediante las técnicas de SPECT y CT. Las pruebas de SPECT/CT se realizaron a día 0, 7, 14 y 21. A continuación se detallan los grupos experimentales realizados en cada estudio.

A. MODELO PREVENTIVO

Efecto farmacológico de la Cucurbitacina I 1 mg/Kg/día vía intraperitoneal, en fibrosis pulmonar inducida con bleomicina en rata Wistar.

Para llevar a cabo este estudio se emplearon ratas Wistar macho de 9 semanas de edad. En el modelo preventivo, la cucurbitacina I se administra diariamente coincidiendo el inicio de la administración con la administración de bleomicina para la inducción de fibrosis a día 0. Los días 0, 7, 14, 21 se realizaron pruebas de perfusión mediante la administración del radiofármaco constituido por macroagregados de albúmina unidos a tecnecio^{99m} (MAA-Tc^{99m}) vía intravenosa. Todos los grupos experimentales se llevaron a veintiún días como punto final.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Grupos experimentales modelo preventivo:

- Salino i.t + vehículo i.p (n=6).
- Bleomicina i.t + vehículo i.p (n=6).
- Bleomicina i.t + cucurbitacina I 1 mg/Kg/día i.p (n=6).

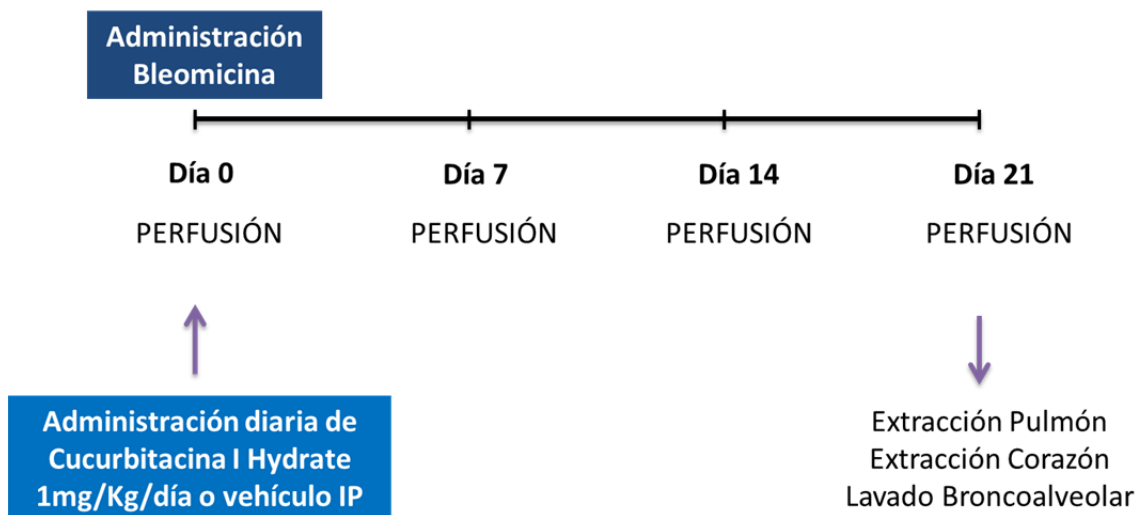


Figura 16: Esquema del procedimiento del modelo preventivo. Inducción de la enfermedad a día 0, administración diaria de 1mg/kg Cul o vehículo intraperitoneal y punto final.

B. MODELO CURATIVO

Efecto farmacológico de la Cucurbitacina I 1 mg/Kg/día vía intraperitoneal, en fibrosis pulmonar inducida con bleomicina en rata Wistar.

Para llevar a cabo este estudio se emplearon ratas Wistar macho de 9 semanas de edad. En el modelo curativo la cucurbitacina I se administra a partir del séptimo día tras la inducción de fibrosis pulmonar con bleomicina. El seguimiento animal se controla mediante técnicas de imagen. Los días previos a la perfusión pulmonar, se realizan pruebas de ventilación pulmonar mediante DTPA asociado a Tc^{99m} (DTPA- Tc^{99m}) inhalado. Los días 0, 7, 14, 21 se

realizaron pruebas de perfusión mediante la administración del radiofármaco constituido por MAA-Tc^{99m} vía intravenosa. Todos los grupos experimentales se llevaron a veintiún días como punto final.

Grupos experimentales modelo curativo:

- Salino i.t + vehículo i.p (n=5).
- Bleomicina i.t + vehículo i.p (n=7).
- Bleomicina i.t + cucurbitacina I 1 mg/Kg/día i.p (n=7).

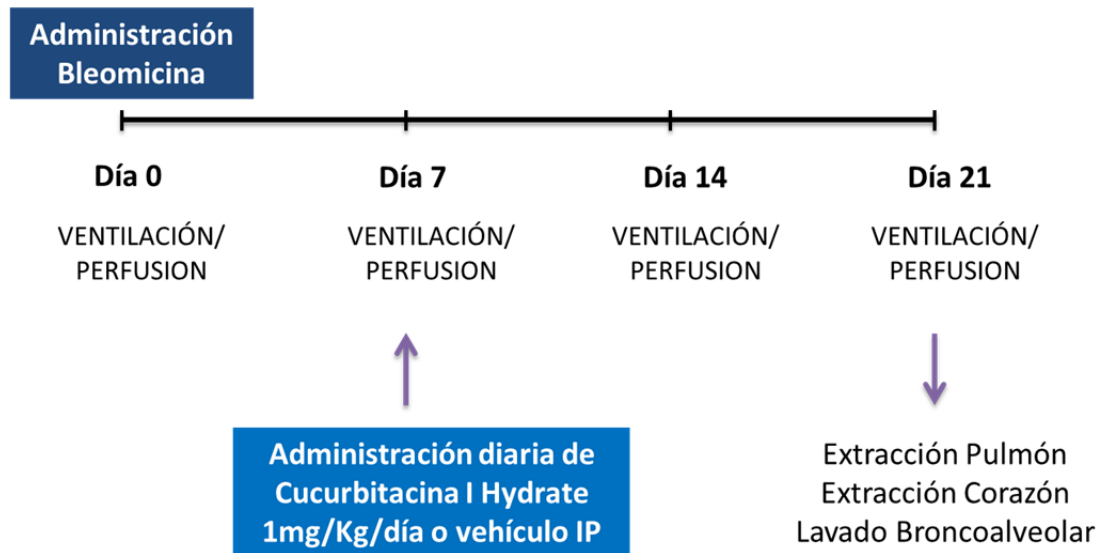


Figura 17: Esquema del procedimiento del modelo preventivo. Inducción de la enfermedad a día 0, administración diaria de 1mg/kg Cul o vehículo intraperitoneal y punto final.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1.3 PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS Y RADIOFÁRMACOS

Fármacos:

- **Bleomicina:** se preparó en solución con suero fisiológico y se administró por vía intratraqueal.
- **Cucurbitacina I:** se preparó en solución salina con DMSO al 20%. La solución se prepara en condiciones estériles en el momento de la administración, agitándose inmediatamente antes de la administración intraperitoneal. La administración intraperitoneal diaria, tanto del medicamento como de la solución salina, se realizó con una jeringa de 1 mL, alternando cada día el lugar de punción.

Radiofármacos:

Los radiofármacos empleados para la adquisición de imágenes de SPECT fueron provistos diariamente por la empresa de medicina nuclear Molypharma.

- **MAA-Tc^{99m}:** a cada sujeto se le administran aproximadamente 500 μ Ci vía intravenosa de radiofármaco para las pruebas de perfusión pulmonar.
- **DTPA-Tc^{99m}:** Aproximadamente 9 mCi de DTPA fueron inhalados por sujeto en las pruebas de ventilación pulmonar.

3.2.1.4 ENSAYOS DE PERFUSIÓN Y VENTILACIÓN PULMONAR

Los ensayos de perfusión y ventilación pulmonar se realizaron mediante el sistema multimodal de adquisición de imágenes PET/SPECT/CT. Para los estudios programados se emplearon las modalidades de SPECT y CT según se detalla a continuación.

- Perfusión:

Previa a la instauración de la enfermedad, se realizaron pruebas de perfusión pulmonar a día 0. Para ello se anestesiaron los sujetos previamente mediante anestesia inhalada con Isoflurano (Arreane®). Se canuló la vena de la cola mediante una cánula de 24G y se introdujeron aproximadamente 500 μCi vía intravenosa de MAA-TC^{99m}. La jeringa que contiene el radiofármaco se midió en el activímetro tras la administración para calcular la dosis exacta de radiofármaco inyectado y se anotó junto con la hora de administración. El sujeto se posicionó decúbito esternal en la camilla de rata estándar del Albira®, equipo multimodal de adquisición PET/SPECT/CT, y se mantuvo anestesiado con isoflurano mediante un sistema de inhalación “nose-only” con una tasa de flujo del 2,5% durante la adquisición. Todas las ratas fueron sometidas a las pruebas de SPECT/CT a día 0, 7, 14 y 21.

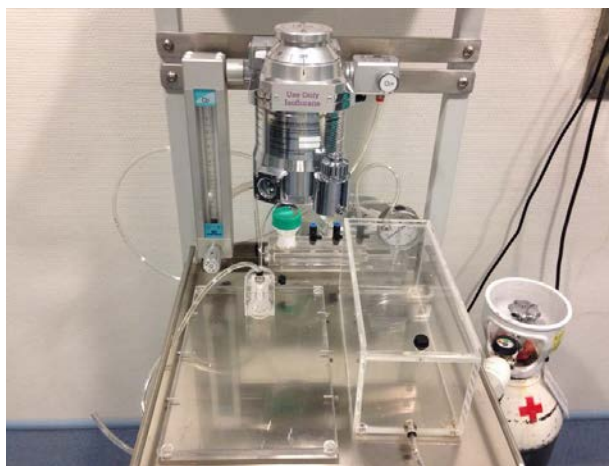


Figura 18: Cámara de inducción de anestesia.

- Ventilación:

La ventilación se realizó únicamente en el modelo curativo de la enfermedad. En este modelo se seleccionaron 2 sujetos del grupo bleomicina + vehículo y 2 sujetos del bleomicina + cucurbitacina I 1 mg/Kg/día. En este caso los sujetos se anestesiaron con ketamina/medetomidina 75/0,5 mg/kg respectivamente y se introdujeron en la cámara de inhalación, un pletismógrafo de doble compartimento con restricción cónica (emka TECHNOLOGIES SA ®). Se midieron aproximadamente 9 mCi de DTPA-Tc^{99m} y se depositaron en la

3. MATERIAL Y MÉTODOS

cámara de nebulización. La jeringa que contiene el radiofármaco se midió en el activímetro tras la administración para calcular la dosis exacta de radiofármaco administrado y se anotó junto con la hora de administración. El procedimiento de ventilación se realizó mediante ciclos de flujo continuo del 0.4 mL/min durante 15 min, alternando la nebulización con aire del ambiente en intervalos de 30-45 segundos. Una vez realizada la ventilación, se posicionó decúbito esternal en la camilla de rata estándar del Albira® para la adquisición SPECT/CT. Las pruebas de ventilación se realizaron el día previo a la perfusión.

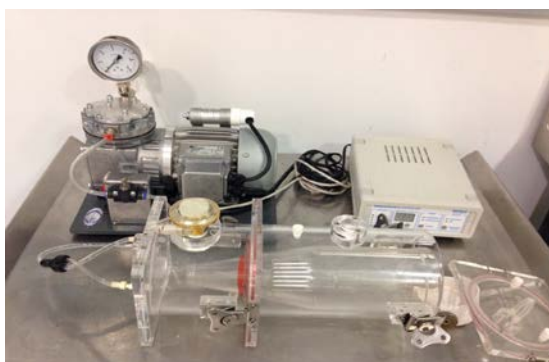


Figura 19: Ventilador animal. Administración inhalatoria de radiofármacos nebulizados.

Una vez finalizadas las adquisiciones, las ratas fueron retiradas de las camillas y depositadas en sus jaulas bajo observación. Las ratas permanecieron estabuladas en la instalación radioactiva con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas hasta el decaimiento del radiofármaco.

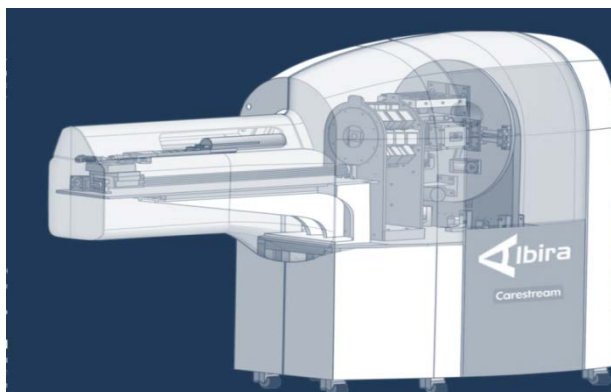


Figura 20: Albira®. Equipo multimodal micro SPECT/PET/CT.

3.2.1.5 ADQUISICIÓN Y RECONSTRUCCIÓN DE IMÁGENES

Tanto para las capturas de ventilación como perfusión, las adquisiciones se realizaron con un offset de la camilla de 115 mm de longitud para capturar pulmón. La captura mediante CT-rayos-X (Carestream Molecular Imaging, Woodbridge, CT) de alta calidad se realizó con la modalidad Step&Shoot de 600 proyecciones. Los rayos X se programaron con 400 μ A de intensidad de corriente, 45 kV de voltaje y un filtro de atenuación de 0,5 mm. Dicha intensidad equivale a una dosis equivalente de 220 mSv y dosis efectiva de 357,4 mSv. Estas dosis son 20 veces inferiores a las dosis reportadas de DL₅₀ [153]. La calibración de las unidades de medida de las imágenes CT, Unidades Hounsfield (HU) se realiza diariamente escaneando un tubo con agua y otro con aire.

En la modalidad de SPECT, los estudios se programaron con un campo de visión (Field Of View (FOV)) de 80 mm, un tiempo de captura de 30 min, 60 proyecciones por segundo y un colimador Pinhole. Las imágenes fueron reconstruidas mediante el algoritmo FBP (Filtered Back Projection) utilizándolos parámetros de reconstrucción estándar del Albira Suite 5.0 Reconstructor. La combinación de la adquisición y la reconstrucción dan lugar a una imagen final de matriz de 255*255*255 y tamaño de pixel de 0.25*0.25*0.25 mm.

Las imágenes de alta calidad del CT se emplearon para el procesamiento y análisis de la ventilación/perfusión (V/Q) para proporcionar información estructural basada en la correlación con las imágenes SPECT, así como para ensayos densitométricos del entorno pulmonar.

3.2.1.6 ANÁLISIS DE IMÁGENES

Las imágenes fueron analizadas y cuantificadas mediante el software de análisis PMOD versión 3.2 (PMOD Technologies LTD, Zurich, Switzerland).

Una vez adquiridas, las imágenes de SPECT/CT fueron reconstruidas y fusionadas. Las imágenes fueron corregidas mediante el algoritmo OSEM. Para las imágenes SPECT se seleccionaron volúmenes de interés (VOI) que comprenden la región captada en pulmón y se procedió a su cuantificación. La

3. MATERIAL Y MÉTODOS

cuantificación de imágenes proporcionó el número de cuentas adquiridas por unidad de pixel. Dicho valor se relativizó por la dosis inyectada.

Las imágenes CT se analizaron tres regiones de interés (ROI) comprendiendo el lóbulo superior, medio e inferior. El mismo plano fue analizado para cada sujeto para sus distintos días de adquisición. Se calculó la media de unidades HU por unidad de pixel.

La adquisición y procesado de las imágenes de ventilación y perfusión se resumen en la tabla a continuación:

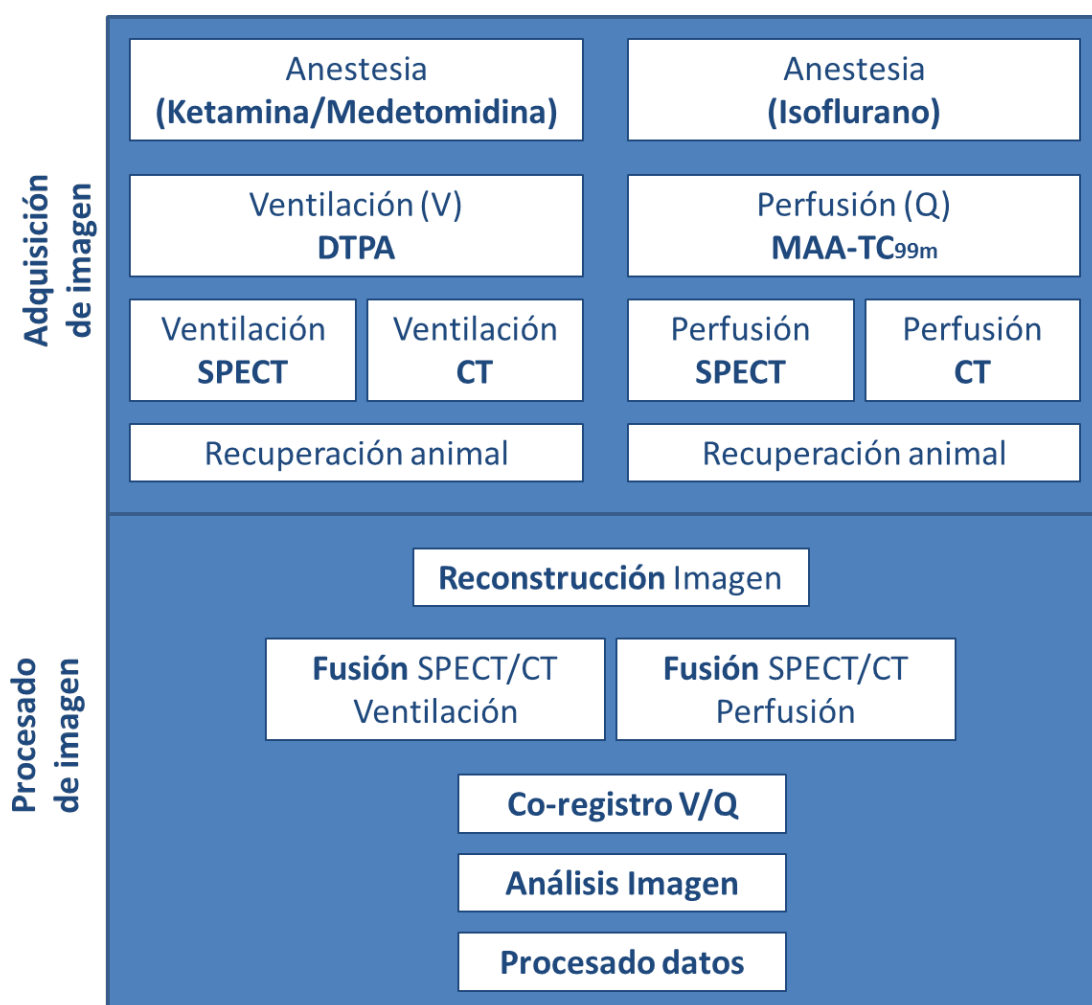


Figura 21: Esquema de adquisición y procesado de imágenes. Protocolo de ventilación y perfusión animal.

3.2.1.7 EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

Una vez transcurridas 20-24 horas de la última dosis, se procedió al sacrificio de los animales mediante una inyección letal intravenosa de 0,5 mL de pentobarbital sódico (200 mg/kg). Se llevó a cabo una traqueotomía para realizar el LBA. Se realizaron 3 lavados de 2 mL con Tampón Fosfatos Salino (PBS) a través de una cánula de 16G. El LBA recogido se empleó para hacer ensayos de recuento y diferenciación celular por una parte; y para la cuantificación de proteínas totales e interleuquinas extravasadas a la luz alveolar. El LBA también se empleó para la determinación de procolágeno tipo III. Para la cuantificación proteica se centrifugó el volumen total de LBA (13000 rpm, 10 min) y el sedimento y el sobrenadante se alicuotaron por separado, se ultracongelaron con nitrógeno líquido inmediatamente y se almacenaron a -80°C.

Se llevó a cabo una toracotomía para extraer el corazón y los pulmones. El corazón se dejó en suero para vaciarlo y posteriormente se separó el ventrículo derecho (VD) del resto del corazón. Se pesaron ambos ventrículos por separado para obtener la relación VD/VI+septo como índice de hipertrofia ventricular derecha. Los pulmones y la tráquea se extrajeron en bloque y se pesó el conjunto; a continuación se separó el pulmón izquierdo para el estudio histológico; éste se dividió en dos, lóbulo inferior y lóbulo superior, y se conservó suspendido en solución fijadora de formaldehído 3.7-4%, evitando el contacto con las paredes del envase, para su posterior inclusión en parafina.

El lóbulo derecho se empleó para expresión génica y proteica. Para ello se diseccionó y almacenó en viales de 2 ml que se ultracongelaron con nitrógeno líquido inmediatamente, y fueron posteriormente almacenadas a -80°C hasta el día del análisis.

3.2.1.8 ENSAYOS DE INFLAMACIÓN PULMONAR

Para determinar la respuesta inflamatoria pulmonar generada en la inducción de la enfermedad y su comparación con el grupo tratado con cucurbitacina, se procedió al recuento de células totales extravasadas, y a la caracterización de las distintas poblaciones celulares.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1.9 RECUENTO DE CÉLULAS TOTALES EN EL LBA

Previa a la extracción de los pulmones, se lavaron ambos pulmones por triplicado con 2 ml de PBS. El volumen recogido de LBA se registró y se separó una alícuota para la diferenciación celular y otra para el conteo celular. El volumen restante se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm para separar las células sanguíneas. El sedimento con las células se alicuotaron en seco para su posterior análisis. El recuento de células totales se realizó en cámara de recuento Bürker.

3.2.1.10 DIFERENCIACIÓN CELULAR

Se tomó una alícuota de LBA bien homogenizado para fijar las células sobre un portaobjetos, utilizando una citocentrífuga (Shandon Cytospin 4, Thermo Electron Corporation) durante 5 minutos a 500 rpm. Se realizó una tinción panóptica (Panreac) de las células fijadas para cuantificar el porcentaje de cada tipo celular mediante microscopía óptica (Eclipse E200, Nikon).

3.2.1.11 PROTEÍNAS TOTALES EN LBA

El contenido total de proteínas en el sobrenadante del LBA se determinó mediante el kit BCA Protein Assay Kit (Pierce Chemical Co, Rockford IL, USA). Este kit basa su cuantificación proteica en la reacción de Biuret en medio alcalino. La reacción de Biuret es una reacción química basada en la adición de un reactivo alcalino a Cu^{+2} . Este reacciona con los enlaces peptídicos de las proteínas reduciéndose a Cu^{+1} . El color púrpura producido por la reacción aumenta proporcionalmente con la concentración proteica, y es detectado a 540-590 nm. Se emplea la albúmina sérica bovina (BSA) como estándar de proteína común para referir las concentraciones de proteínas detectadas.

3.2.1.12 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOTT

En primer lugar se procedió a un homogenado del tejido pulmonar. Para ello se adicionó 500 μL de Buffer C y se lisó todo el tejido pulmonar en el

sistema TissueLyser II (Qiagen®) a una frecuencia de 30 s⁻¹ durante 2 minutos. A continuación se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se sometió a tres ciclos de congelación-descongelación con N₂ líquido y con agitación a 37°C, respectivamente. A continuación se le adicionó NP40 al 1% y durante 15 minutos se mantuvo en hielo con agitación enérgica cada 5 minutos. Finalmente se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min a 4°C y se recogió el sobrenadante para determinar la concentración de proteína total mediante el kit del método de ácido bicinónico (BCA).

Se cargó un total de 30 µg de proteína desnaturalizada, por muestra, en un gel de poliacrilamida y SDS (SDS/PAGE), junto con un marcador de pesos moleculares, Amersham High-Range Rainbow Molecular Weight Markers (Amersham GE Healthcare, Reino Unido). La concentración del gel de acrilamida se preparó en función del peso molecular de la proteína a investigar. Este viene indicado en la tabla 2. Una vez cargado el gel, se le aplicó un voltaje de 100 V durante 1 hora y 30 minutos aproximadamente. Las proteínas se separaron de acuerdo con su peso molecular.

Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane (Amersham GE Healthcare) mediante transferencia semi-húmeda. Se bloqueó la membrana con suero de BSA (Sigma-Aldrich) en solución PBS (PBS, Sigma-Aldrich) con 0,1% de TWEEN®20 (Sigma-Aldrich) durante 3 horas. Transcurrido el bloqueo, se incubó la membrana con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación, se lavó la membrana y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora.

Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane (Amersham GE Healthcare) mediante transferencia semi-húmeda. Se bloqueó la membrana con BSA (Sigma-Aldrich) en solución PBS (Sigma-Aldrich) con 0,1% de TWEEN®20 (Sigma-Aldrich) durante 3 horas. Transcurrido el bloqueo, se incubó la membrana con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación, se lavó la membrana y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con HRP durante 1 hora.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Tras los lavados, se utilizó ECL Plus (Amersham GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante, para la detección de las proteínas. La densitometría de las bandas fue realizada empleando el software Image J 1.42 (disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij> USA). Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se indican en la Tabla 4.

ANTICUERPO PRIMARIO	REFERENCIA	GEL DE RESOLUCIÓN DE ACRILAMIDA	PESO MOLECULAR	DILUCIÓN	ANTICUERPO SECUNDARIO	REFERENCIA	DILUCIÓN
COL-1A	234167 Calbiochem	8%	115 kDa	1:1000	Anti-Rabbit conjugado a HRP	SA1-200 Thermo- Scientific	1:1000
JAK2	NBP1-61916 Novus Biologicals		130 kDa	1:1000	Anti-Rabbit conjugado a HRP	SA1-200 Thermo- Scientific	1:1000
P-JAK2	NB110-57144 Novus Biologicals		131 kDa	1:1000	Anti-Rabbit conjugado a HRP	SA1-200 Thermo- Scientific	1:1000
STAT3	NB100-91973 Novus Biologicals		88 kDa	1:1000	Anti-Rabbit conjugado a HRP	SA1-200 Thermo- Scientific	1:1000
P-STAT3	NB100-80051 Novus Biologicals		88 kDa	1:1000	Anti-Rabbit conjugado a HRP	SA1-200 Thermo- Scientific	1:1000
SMAD	NBP1-19495 Novus Biologicals	10%	48 kDa	1:1000	Anti-Rabbit conjugado a HRP	SA1-200 Thermo- Scientific	1:1000
P-SMAD	NBP1-77836 Novus Biologicals		48 kDa	1:1000	Anti-Rabbit conjugado a HRP	SA1-200 Thermo- Scientific	1:1000
TGF-beta	56E4 Cell Signaling Technology		50 kDa	1:1000	Anti-Rabbit conjugado a HRP	SA1-200 Thermo- Scientific	1:1000
β -ACTINA	A5441 Sigma-Aldrich		42 kDa	1:1000	anti-Mouse conjugado a HRP	SA1-100 Thermo- Scientific	1:1000
CTGF	SC-34772 Santa Cruz Biotechnology	12%	38 kDa	1:1000	Anti-Goat conjugado a HRP		1:1000
ET-1	MA3-005 Thermo Scientific		24 kDa	1:1000	anti-Mouse conjugado a HRP	SA1-100 Thermo- Scientific	1:1000

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para Western Blott.

Los resultados se expresan siempre referenciados al control endógeno β -actina y en el caso de proteínas fosforiladas como es el caso de P-JAK2 a la proteína total JAK2, P-STAT a STAT3 y P-SMAD a SMAD3.

3.2.1.13 HISTOLOGÍA

A partir de la muestra fijada con formaldehído e incluida en parafina se obtuvieron cortes seriados de 5 µm de grosor con un microtomo tipo Minot (Leica® RM 2135). Los cortes obtenidos se emplearon para:

- Inmunohistoquímica
- Tinción hematoxilina-eosina
- Tinción tricrómica de masson

Las tinciones permitieron la identificación al microscopio de las estructuras pulmonares anormales y patológicas. Se captaron fotografías de las muestras de tejido con una cámara (Leica® DFC 350FX) incorporada al microscopio (Leica® CTR6000).

3.2.1.14 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN TOTAL

Para la extracción del ARN total se utilizó el reactivo TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics), que es una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina (Trizol), que permite separar ARN, ADN y proteínas. Se tomaron 20 mg de pulmón conservado a -80°C, se añadió 1 ml de reactivo Tripure y se lisó con el sistema TissueLyser II (Qiagen). A continuación, se separaron las fases con cloroformo y se precipitó el ARN total de la muestra con isopropanol. A fin de facilitar dicha precipitación se le añadió a la fase acuosa 1 µl de glicógeno. Tras una centrifugación de 5 minutos a 7500 rpm, se resuspendió el ARN en 20 µl de agua DEPC.

Tras resuspender el ARN extraído, se procedió a determinar la integridad y concentración del mismo, para lo cual se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 2000C (ThermoScientific) [siguiendo las instrucciones del fabricante]. Este sistema permitió determinar la concentración del ARN total mediante medidas de absorbancia a 260 y 280 nm a partir del

3. MATERIAL Y MÉTODOS

espectro de absorción de las muestras. Se obtuvo el valor de la concentración (ng/ μ L) y el valor de la pureza de las muestras. El ARN extraído se almacenó a -80°C hasta su utilización.

2. RETROTRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT)

En la retrotranscripción inversa, la enzima retrotranscriptasa inversa sintetiza ADN complementario (ADNc) a partir de un ARN molde. Tomando en consideración la cuantificación del ARN extraído, se transformó un total de 300 ng de ARN en ADNc utilizando Taq Man Reverse Transcription Reagents Kit (Applied Biosystems), en un volumen final de 15 μ L. Se realizó este proceso en un termociclador 9800 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems) con los siguientes pasos: incubación durante 10 minutos a 25°C , ciclo de 30 minutos a 48°C , e inactivación de la enzima durante 5 minutos a 95°C . El ADNc sintetizado se almacenó a -20°C hasta su utilización.

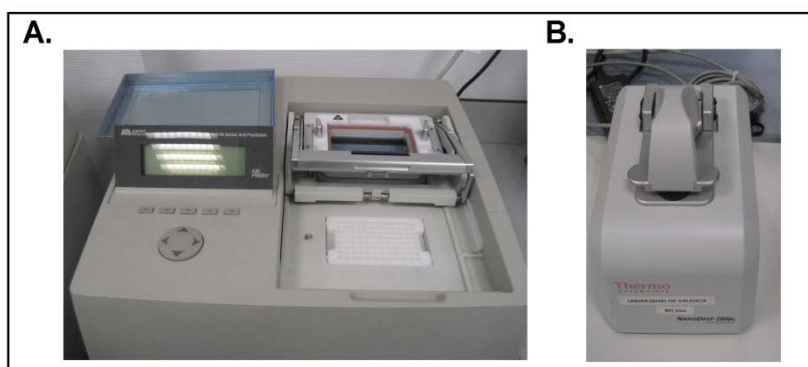


Figura 22. Extracción de ARN total y cuantificación. A. Sistema *ABI Prism TM 6100 Nucleic Acid Prep Station* para la extracción de ácidos nucleicos. B. Espectrofotómetro *NanoDrop 2000C* para la cuantificación de ácidos nucleicos.

3. RT-PCR A TIEMPO REAL

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación selectiva de una región de ADN de interés, utilizando oligonucleótidos como cebadores de la síntesis de ADN. Los cebadores se

unen específicamente a secuencias que flanquean la región que se pretende amplificar. La reacción de amplificación consiste en la repetición de un ciclo integrado por tres etapas: desnaturalización del ADN molde, hibridación de cebadores y elongación. La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial en la cantidad de ADN de la región de interés.

La variante denominada PCR en tiempo real (RT-PCR) constituye una forma precisa de detectar y cuantificar los niveles de ARN mensajero (ARNm). Los equipos de RT-PCR permiten la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción empleando lectores de fluorescencia que permiten medir la fluorescencia emitida durante la reacción. Se utilizaron oligonucleótidos y sondas específicas marcadas con fluorocromos Ensayos de Expresión Génica TaqMan® (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos utilizados se indican en la Tabla 3.

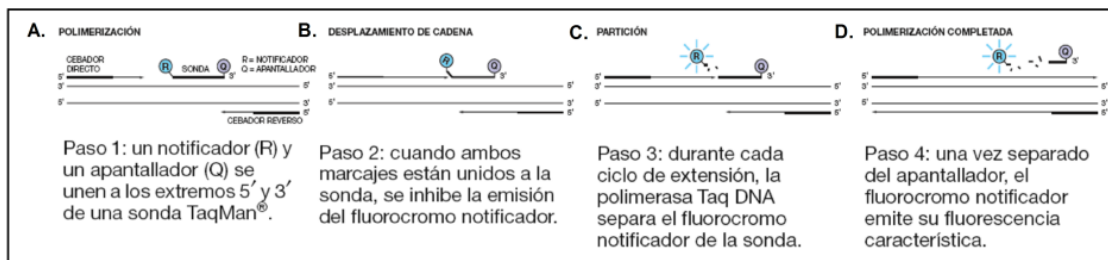


Figura 23. Los reactivos TaqMan utilizan una sonda fluorogénica y la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa de ADN para detectar un producto específico de la PCR a medida que se acumula durante la reacción (Figura adaptada de "Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System: Guía de reactivos" 2006, 2010).

Cada reacción de PCR contenía 1 µL de ADNc sintetizado en la transcripción inversa, 5 µL de FluoCycle™ Mix (Applied Biosystems) para oligonucleótidos Taqman, 0,5 µL de la sonda correspondiente y la cantidad necesaria de agua DEPC para alcanzar un volumen final de 10 µL. La PCR se desarrolló en un termociclador ABI Prism 7900 Sequence Detection System® (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: un paso inicial de 2 minutos a 0°C, 1 ciclo de 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguidos de 1 minuto a 60°C.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

TIPO DE OLIGONUCLEÓTIDO		GEN	ABREVIATURA	REFERENCIA
Oligonucleótidos y sondas Taqman (Applied Biosystems)	Control interno	Glyceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa humano	GAPDH	4352338E
	Genes a estudio	Colágeno tipo I	COL1A1	Rn00301649_m1
		Factor de crecimiento transformante β1	TGF -β1	Rn00572010_m1
		Factor de crecimiento de tejido conectivo	CTGF	Rn00573960_g1
		Endotelina 1	ET1	Rn00561129_m1

Tabla 5: Oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR.

A partir de los datos de fluorescencia registrados, se obtuvieron curvas de amplificación en las que se representaba el logaritmo de la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclos transcurridos. Para medir la expresión de un determinado gen se utilizó el ciclo umbral (Ct), ciclo en el que se alcanza el nivel prefijado de fluorescencia. Cuantas más copias haya de ARNm de partida del gen estudiado, más ADNc se obtendrá en la retrotranscripción inversa y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

La cuantificación relativa de los distintos genes se realizó con el método de comparación de Ct, utilizando el GAPDH como control endógeno y normalizando los resultados al grupo control.

En este método se utiliza la siguiente ecuación: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct1 - \Delta Ct2$. Siendo:

$$\Delta Ct1 = (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia}) \text{ de la muestra 1}$$

$$\Delta Ct2 = (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia}) \text{ de la muestra 2}$$

Para que la determinación a través de esta fórmula aritmética sea válida, debe cumplirse que la eficiencia de la reacción para el gen problema y para el gen de referencia sea aproximadamente igual. El proveedor de las sondas utilizadas en los experimentos garantiza que la eficiencia en las reacciones es de 1.

Se estudió cada muestra por duplicado, se corrigieron los valores frente al gen referencia y se normalizaron frente al grupo control. Se calculó el valor

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ de los distintos grupos y se representó junto al grupo control, cuyo valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ es igual a 1. El valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ equivale a la expresión relativa de ARNm de un determinado gen.

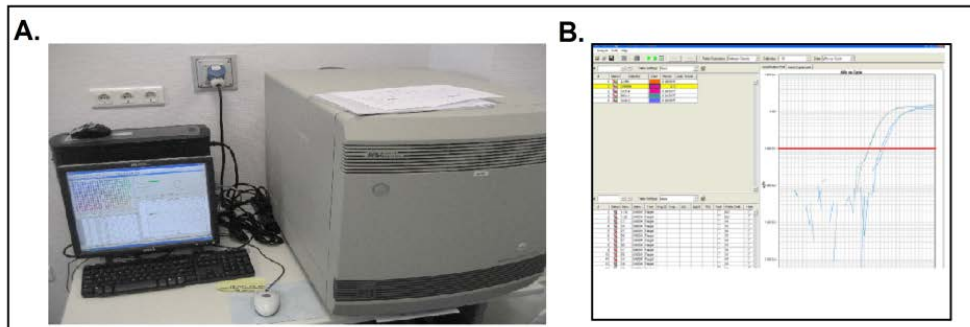


Figura 24. RT-PCR a tiempo real. A. Termociclador 7900HT *Fast Real-Time PCR System* para la realización de la RT-PCR. B. Software *RQ Manager* utilizado para el análisis de las curvas de amplificación obtenidas y la cuantificación de la expresión génica.

3.2.1.15 ENSAYOS ELISA PARA IL-6 E IL-13 EN LBA Y TEJIDO PULMONAR

Se analizó la liberación de IL-6 e IL-13 por las células recogidas en el LBA realizado a los sujetos experimentales del grupo control, FPI y FPI+Cul. Para medir la cantidad de IL-6 e IL-13 se descongeló el sobrenadante del LBA alícuotado a -80°C . Posteriormente, se utilizó el ELISA Kit Rat IL-6 (InvitrogenTM Catálogo nº KRC0061, 96 tests); Este kit se basa en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que permite determinar cuantitativamente los niveles de IL-6 en el sobrenadante de las células, siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura se realizó a 450 nm. Igualmente, para la determinación de IL-13 se empleó el ELISA Kit Rat IL-13 (InvitrogenTM Catálogo nº KRC0132, 96 tests), que permite determinar cuantitativamente los niveles de IL-13 en el sobrenadante de las células, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ambos kits de ELISA se emplearon para la determinación de la concentración de IL-6 e IL-13 en tejido pulmonar. Se descongelaron alícuotas de tejido pulmonar homogenizado y tras determinar la cuantificación de

3. MATERIAL Y MÉTODOS

proteína en cada sujeto mediante la técnica del BCA descrita con anterioridad, se cuantificó la concentración de IL-6 e IL-13 para una misma concentración proteica.

Los kits empleados utilizan la técnica de ELISA cuantitativo en sándwich en una placa incubada con un anticuerpo específico policlonal para IL-6 e IL-13 respectivamente. Se añadieron 50 μ L de diluyente, y posteriormente 50 μ L de estándar (31,2-2000 pg/mL para la curva patrón), controles y de muestra activada. Se incubó la placa durante 1,5 horas, durante las cuales cualquier molécula de IL-6 o IL-13 presente se unió al anticuerpo inmovilizado. Se realizaron lavados, para eliminar uniones inespecíficas, y se añadieron 100 μ L de un anticuerpo policlonal específico para IL-6 o IL-13 conjugado a una enzima, y se incubó durante 30 minutos más. Se realizaron lavados, se añadieron 100 μ L de una solución de sustrato y se incubó 30 minutos en oscuridad. Durante este tiempo se desarrolló una coloración proporcional a la concentración de Tgf- β 1 unida en el paso inicial. Se detuvo la reacción y se midió la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer). A partir de los datos se obtuvo la concentración de Tgf- β 1 (pg/mL) liberado en las distintas condiciones experimentales.

3.2.1.16 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PROPÉPTIDO AMINO TERMINAL INTACTO DE PROCOLÁGENO TIPO III (PIIINP) POR RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

Una alícuota de LBA se empleó para determinar la concentración de PIIINP por radioinmunoensayo cuantitativo (UniQ[®] Orion Diagnostica).

La determinación de los niveles de PIIINP en LBA se realiza mediante radioinmunoanálisis (RIA) de tipo cuantitativo (Orion Diagnostica Uni Q[®] PIIINP RIA) en el que una cantidad conocida de PIIINP marcado con ¹²⁵I y una cantidad desconocida del péptido no marcado, presente en la muestra compiten por la unión a un número limitado de sitios de alta afinidad presentes en un anticuerpo policlonal de conejo anti PIIINP. La muestra se incubó en agitación a 37°C durante 2 horas, tiempo tras el cual se centrifugó 2min a

2000rpm. Tras la inmunoprecipitación se decanta y separando el antígeno libre del inmunocomplejo, y se procede al lavado y al contaje en un contador gamma. La cantidad de PIIINP marcado con ^{125}I es inversamente proporcional a la cantidad de PIIINP presente en la muestra.

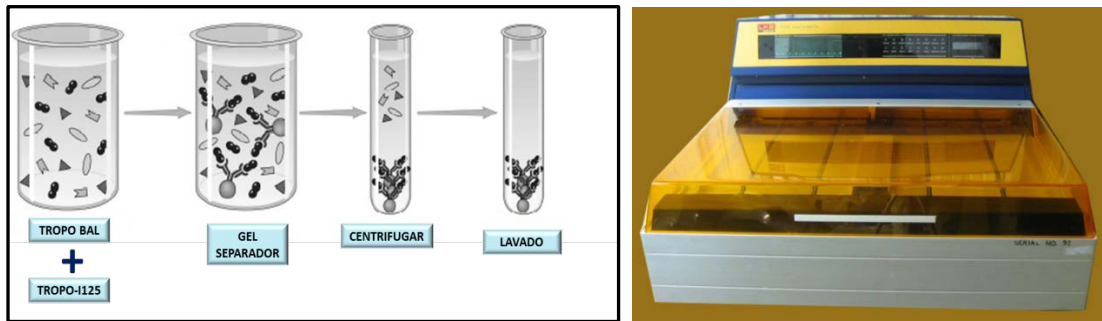


Figura 25: Principio de determinación de Radioinmunoanálisis. (Orion Diagnostica Uni Q® PIIINP RIA) y contador gamma (LKB 1277 GAMMAMASTER®)

Para el análisis de tropocolágeno III, previamente se descongelaron las muestras de LBA a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió el calibrador y las muestras. Para la determinación de tropocolágeno III se emplearon 200 μL de cada muestra. A continuación se añadió 200 μL de trazador y 200 μL de antisuero. Tras agitar los tubos, estos se incubaron a 37°C durante 2 horas. Una vez finalizado el periodo de incubación, se añadieron 500 μL del agente separador y se dejan incubar a 37°C durante 30 min. Posteriormente se centrifugan las muestras a 2000g a 4°C durante 15 min y se decanta el sobrenadante. Una vez secadas las muestras se introducen en el contador gamma que nos proporciona la concentración de tropocolágeno III en las muestras.

3.2.2 ESTUDIO II: EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE JAK2 Y STAT3 EN TEJIDO DE PACIENTES CON FIBROSIS PULMONAR E HIPERTENSIÓN PULMONAR.

3.2.2.1 TEJIDO PULMONAR HUMANO

Los pacientes incluidos en este estudio fueron clasificados en dos grupos: controles y pacientes FPI. El tejido pulmonar de pacientes empleado en este estudio se obtuvo de pacientes sometidos a operación quirúrgica por cáncer de pulmón en el Servicio de Cirugía Torácica del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) durante los años 2009 a 2012. Este proyecto fue aprobado previamente por la Comisión de Investigación y el Comité Ético de Investigaciones Clínicas (CEIC) del CHGUV y se obtuvo el consentimiento informado escrito de cada paciente participante.

Los pacientes FPI fueron diagnosticados de acuerdo con las características descritas en la tabla 6. Las muestras de biopsia de pulmón fibrótico se obtuvieron por cirugía en trasplante pulmonar o pacientes sometidos a cirugía pulmonar para el diagnóstico de la enfermedad. Las muestras de pacientes control provienen de pacientes que fueron sometidos a lobectomía o resección en cuña por lesión tumoral en el pulmón. Las muestras de tejido corresponden a tejido pulmonar no tumoral y fueron obtenidas de la parte distal del pulmón, lo más alejado posible del tumor. Además, todas las muestras de tejido utilizadas fueron revisadas histológicamente utilizando el siguiente criterio de exclusión:

- 1) Presencia de tumor.
- 2) Presencia de neumonía postestenótica.
- 3) Fibrosis del parénquima pulmonar.

Todas las pruebas de función pulmonar fueron realizadas durante los tres meses previos a la operación. Los pacientes fueron clasificados en los distintos grupos de acuerdo a los valores de su función pulmonar. El número de

pacientes incluidos en los estudios, así como sus características clínicas, se detallan en la tabla a continuación.

PARÁMETROS IMPLICADOS	Sujetos control en estudio tisulares de pulmón (n = 21)	Sujetos FPI en estudio tisulares de pulmón (n = 17)
Edad (años)	66 [53–78]	64 [56–75]
Sexo (H/M)	15/6	12/5
Fumadores: No fumadores/Fumadores	9/12	5/12
Paquetes/año	26 [0–32]	27.5 [0–32]
FEV1, % pred	95.2 [90–104]	73.7 [58–103]*
FVC, % pred	96 [93–106]	72.2 [63–98]*
TLC, % pred	95 [92–105]	73.5 [45–89]*
DLco, % pred	94.2 [91–107]	50.4 [32–61]*
%Vidrio deslustrado	0	15 [5–40]*
%Panal de abeja	0	28 [10–40]*
PaO ₂ , mmHg	94 (84–100)	65 (45–88)*
mPAP mmHg/L/min	ND	38.5 [34–44]*
Esteroides (s/n)	0/21	1/15
Azatioprinas (s/n)	0/21	4/17
N-Acetil Cisteína (s/n)	0/21	14/17
Pirfenidona (s/n)	0/21	4/17

Tabla 6 Características clínicas: %predicción (%pred); capacidad de difusión de monóxido de carbono por el pulmón (DLco); Volumen de expiración forzada en un segundo (FEV1); capacidad vital forzada (FVC); no determinado (ND); paquete-año, 1 año fumando 20 cigarros al día; tensión de oxígeno en sangre arterial (PaO₂); capacidad pulmonar total (TLC); % parénquima pulmonar con vidrio deslustrado en imagen CT (Vidrio deslustrado%), % de parénquima pulmonar con panal de abeja en imagen CT (% panal de abeja). Los datos son medias (rango intercuartil) Esteroides / Azatioprinas/ N-acetil cisteína/Pirfenidona hace referencia a pacientes que han recibido dicho tratamiento en el momento de la biopsia pulmonar. . (Los valores de p son significativos cuando p<0,05. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de Student).

Para realizar el análisis por inmunohistoquímica de tejido pulmonar de pacientes Control (n=4) y FPI (n=4) se siguió el procedimiento que se describe a continuación.

El tejido pulmonar se fijó con paraformaldehído 4%, se deshidrató y se procedió a su inclusión en bloques de parafina. A partir de los bloques obtenidos se cortaron secciones (4-6 µm de espesor), que se adhirieron a

3. MATERIAL Y MÉTODOS

portaobjetos. Las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes durante 24 horas a 4°C. Pasado este tiempo, fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente a una concentración 1:200., anti-ratón o anti-conejo, conjugado con un complejo formado por avidina-biotina junto a la enzima peroxidasa de rábano (Vector Laboratoires, Burlingame, CA). Se utilizó el isotipo control inmunoglobulina G (IgG) como control negativo. Las tinciones inmunohistoquímicas fueron analizadas por un anatomopatólogo y observadas bajo un microscopio Nikon Eclipse TE200 (Tokio, Japan). La tabla 4 incluye los anticuerpos primarios y secundarios empleados en la inmunohistoquímica.

3.2.3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante análisis paramétrico o no paramétrico, según corresponda.

Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de grupos experimentales. En el caso de la distribución de datos de pacientes estos se expresaron como el rango intercuartil de la mediana. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el paquete estadístico GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EEUU. La diferencia entre grupos se consideró estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$.

Los resultados de los experimentos in vivo se expresaron como la media (error estándar) de n experimentos. Cuando los resultados siguieron una distribución normal (mediante análisis de histograma y test de Kolmogorov-Smirnov) las diferencias entre grupos se evaluaron mediante el test de ANOVA (para más de dos grupos) seguido de análisis post-hoc de Bonferroni, mientras que la diferencia entre dos grupos se evaluó mediante el test de t-student. Cuando los datos siguieron una distribución no paramétrica las diferencias entre más de dos grupos se evaluaron mediante el test de Kruskal-Wallis seguido de análisis post-hoc Dunn-test; mientras que la diferencia entre dos grupos se realizó mediante test de Mann-Whitney. El análisis de correlación se realizó mediante el test de Pearson.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO I: EFECTO DE LA CUCURBITACINA I HYDRATE EN MODELO DE FIBROSIS PULMONAR ANIMAL

4.1.1 VALIDACIÓN DEL MODELO MURINO DE FIBROSIS PULMONAR INDUCIDA CON BLEOMICINA

El modelo experimental de inducción de fibrosis con bleomicina, es un modelo ampliamente estandarizado en nuestro grupo de investigación a dosis de 3,75 UI en rata [154]. La inducción de la enfermedad ha sido descrita en varios trabajos científicos publicados, en modelo animal tanto en rata como en ratón [128, 129, 131, 154] lo que avala la metodología empleada en este trabajo de investigación. No obstante, para cada ensayo se comprobó que se alcanzaba el estado de fibrosis en el grupo de bleomicina y que existían diferencias significativas respecto al grupo control, tomando como referencia los siguientes indicadores: pérdida de peso corporal, evolución de las imágenes SPECT/CT, hipertrofia ventricular derecha, aumento del peso del pulmón, aumento de células extravasadas en lavado broncoalveolar, aumento de zonas fibróticas y células inflamatorias en pulmón así como depósitos de colágeno.

En los cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina, se observa una marcada desestructuración del parénquima, con lesiones fibróticas, infiltración y engrosamiento septal que reducen de forma considerable el espacio aéreo alveolar.

4. RESULTADOS

4.1.2 MODELO PREVENTIVO

4.1.2.1 Efecto farmacológico de la Cucurbitacina I Hydrate 1mg/Kg/día vía intraperitoneal, en fibrosis pulmonar inducida con bleomicina en rata wistar.

Entre los resultados que nos aportan mayor información del proceso fibrótico se encuentran: la evolución animal mediante la cuantificación de imágenes SPECT/CT; las proteínas totales en pulmón y las proteínas en lavado broncoalveolar que se observan aumentadas ante la inflamación que genera la exposición a bleomicina.

4.1.2.2 La concentración de proteína total en homogenado pulmonar y en lavado broncoalveolar disminuye con el tratamiento de Cul 1mg/kg/día.

En primer lugar se determinó la concentración de proteína total en homogenado de pulmón izquierdo y en el volumen recogido de LBA mediante la técnica del BCA en los grupos control, BLM y BLM+Cul. La administración de Cul 1 mg/Kg/día por vía intraperitoneal, mejora el perfil proteico de los sujetos tratados farmacológicamente, al disminuir la concentración de proteínas tanto en tejido como en LBA.

Los resultados presentados en la figura 26A muestran la concentración de proteína en tejido pulmonar de los tres grupos experimentales. El grupo de FPI inducido con BLM aumenta la concentración proteica en pulmón en un 148,5% frente al grupo control. La administración de Cul 1 mg/Kg/día revierte los valores significativamente disminuyendo la concentración de proteína en un 57,26% con respecto al grupo de FPI sin tratamiento.

La determinación de proteínas totales en lavado broncoalveolar se realizó con el fin de medir la respuesta inflamatoria a la bleomicina. Se produjo un aumento extremadamente significativo en la concentración de proteínas en LBA del grupo de bleomicina con respecto al grupo control, aumentando la concentración proteica en un 202,3%. En paralelo, el grupo tratado con Cul

presentó un restablecimiento de la concentración de proteína total hasta alcanzar los niveles del grupo control, revirtiendo significativamente los valores en un 89.64%. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 26B.

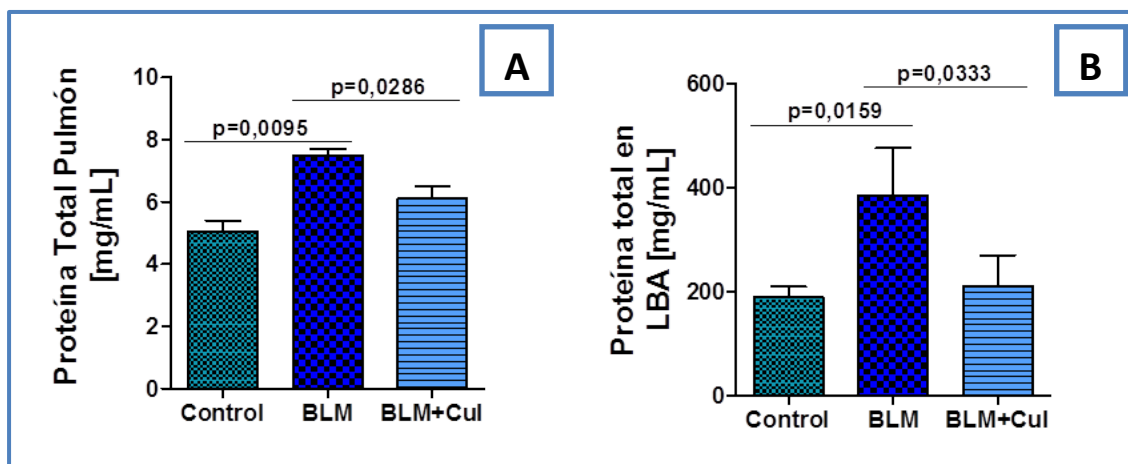


Figura 26. Disminución de la concentración de proteína total en homogenado de tejido pulmonar y el LBA en el grupo tratado con Cucurbitacina 1mg/kg/día. El modelo preventivo consta de tres grupos experimentales: Control (n=6), BLM (n=6) y BLM+Cul (n=6). La FPI fue inducida a día 0 mediante la administración intratraqueal de Bleomicina 3,75UI o salino en el grupo control. Se administró Cul 1mg/kg/día vía intraperitoneal en ratas del grupo BLM+Cul, y la misma cantidad de vehículo en el grupo Control y BLM. Figura A) Comparación de la concentración de proteína total en homogenado de pulmón izquierdo en los diferentes grupos experimentales. Figura B) Comparación de concentración de proteína total en el volumen extraído de LBA. (Los valores de p son significativos cuando $p < 0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

4.1.2.3 Incremento del recuento total de células en LBA y distribución de células inflamatorias en el grupo sin tratamiento. La cucurbitacina reduce los niveles de células inflamatorias.

A los 21 días se procedió al punto final del protocolo experimental. Se realizó el LBA y una alícuota se empleó para el conteo de células inflamatorias extravasadas y la distribución de células inflamatorias obtenidas de cada sujeto experimental. El conteo de células se realizó in situ mediante la cámara Burker

4. RESULTADOS

al igual que el citospín, con su posterior tinción panóptica para la identificación del patrón de distribución de células inflamatorias.

Tal y como se puede apreciar en la figura 27A, el grupo inducido con bleomicina quintuplica el número de células totales en LBA frente al grupo control. El grupo tratado farmacológicamente ve reducido a la mitad el número de células totales extravasadas en pulmón producido por la bleomicina, siendo los resultados obtenidos estadísticamente significativos. El aumento de células inflamatorias se traduce concretamente, en un aumento de neutrófilos, monocitos y más notablemente de linfocitos y macrófagos en los sujetos en ausencia de tratamiento. Las ratas que fueron tratadas con Cul 1mg/kg/día exhiben una disminución estadísticamente significativa en los cuatro tipos celulares: neutrófilos, linfocitos, eosinófilos y macrófagos. También puede observarse la presencia de una pequeña cantidad de eosinófilos y basófilos.

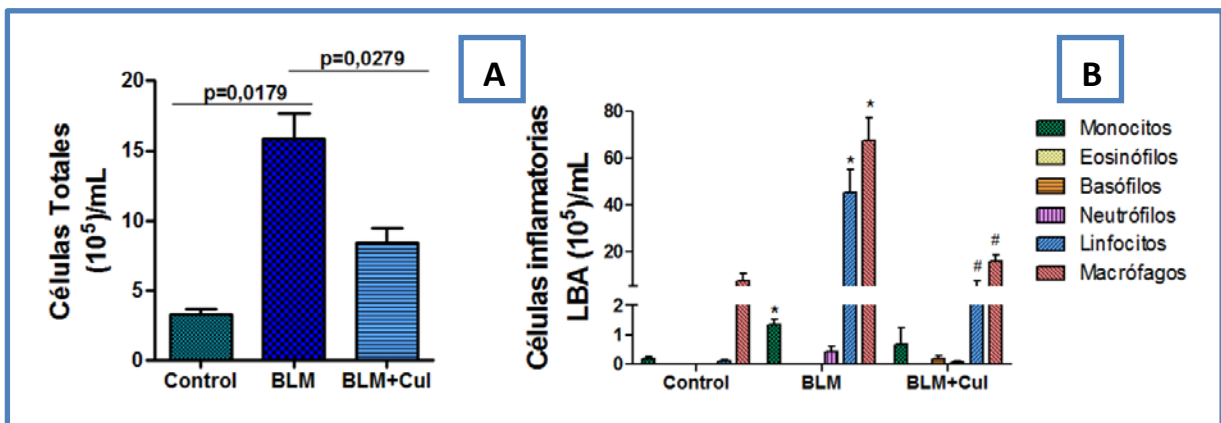


Figura 27: Disminución de las células inflamatorias en lavado broncoalveolar del grupo BLM+Cul frente al grupo BLM. Número de células en LBA de rata a los veintidós días de la inducción de fibrosis pulmonar con 3,75 UI/Kg de bleomicina, en los tres grupos experimentales estudiados: control (n=6), fibrosis (n=6), fibrosis con tratamiento de cucurbitacina 1 mg/Kg/día vía intraperitoneal (n=6). A) Número de células totales (x10⁵) por mL de LBA. B) Comparación de la distribución de células inflamatorias extravasadas por mL de LBA. (Los valores de p son significativos cuando p<0,05. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

4.1.2.4 Progresión de Fibrosis Pulmonar: Cuantificación de tejido fibrótico con la técnica de SPECT/CT. La Cucurbitacina reduce el área fibrótica aumentando la captación pulmonar de aire y de Tc99m frente al grupo de FPI inducido con BLM sin tratamiento.

La combinación de la tecnología multimodal SPECT/CT nos permite evaluar la progresión de la enfermedad así como certificar la correcta inducción de la misma. Las imágenes de SPECT y CT se obtuvieron consecutivamente cada día experimental. Las imágenes obtenidas fueron fusionadas, analizadas y posteriormente cuantificadas.

La figura 28 observamos una representación cuantitativa y cualitativa de la técnica de CT. Se analizaron tres planos en cada imagen obtenida, el plano superior, medio e inferior. Los valores de HU corresponden con la densidad de tejido, oscilando dichos valores entre -1000 HU, que corresponde a la densidad del aire y +1000 HU que corresponde a la densidad hueso. La cuantificación del grupo control muestra como los valores de HU se mantienen constantes en todos los planos a lo largo del procedimiento.

El análisis cuantitativo de los planos superior, medio e inferior mostraron una disminución de las HUs a día 7 correspondiendo con el pico inflamatorio de la enfermedad. Dicha disminución persistió hasta día 21 en el plano superior e inferior en el grupo de enfermedad sin tratamiento. La administración de Cul consiguió reestablecer los niveles de HUs hasta alcanzar los niveles basales.

Sin embargo, en el plano superior, medio e inferior se observa una hipocaptación pulmonar en el grupo con FPI en ausencia de tratamiento. En estos mismos planos observamos como en el grupo tratado con Cul reestablece la captación de aire por el pulmón a día 21.

La captación pulmonar por el grupo control se mantiene constante a lo largo del procedimiento. El grupo control no presenta alteraciones morfológicas ni estructurales por lo que el volumen pulmonar viable se mantiene tal y como se puede observar en la figura.

La figura 28B muestra una imagen representativa de las imágenes CT de los grupos experimentales inducidos con BLM. A día 21, el grupo de BLM sin tratamiento presenta un evidente descenso de la captación de aire por el

4. RESULTADOS

pulmón debido a la destrucción del parénquima sano pulmonar. Se observa la aparición de opacidades en vidrio deslustrado. Estas opacidades observadas e son menos evidentes en el grupo tratado con Cul 1mg/kg/día a lo largo del procedimiento.

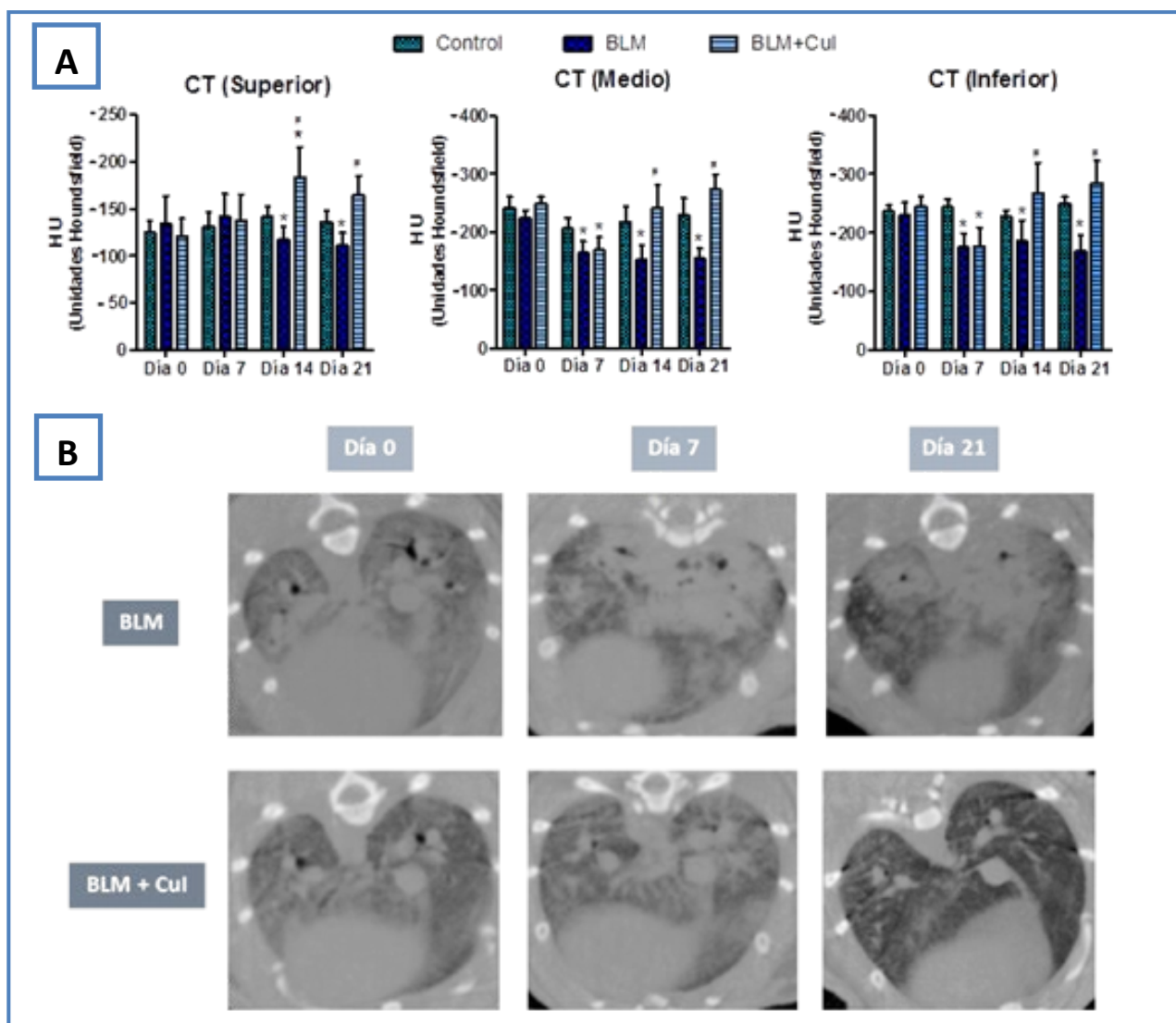


Figura 28. Tomografía Computerizada (CT). Aumento de la captación pulmonar de HU en el grupo tratado farmacológicamente frente al grupo sin tratamiento. El modelo preventivo consta de tres grupos experimentales: Control (n=6), BLM (n=6) y BLM+Cul (n=6). La FPI fue inducida a día 0 mediante la administración intratraqueal de Bleomicina 3,75UI o salino en el grupo control. Se administró Cul 1mg/kg/día vía intraperitoneal en ratas del grupo BLM+Cul, y la misma cantidad de vehículo en el grupo Control y BLM. Análisis cualitativo y cuantitativo de la captación pulmonar de unidades hounsfield en ratas Control (n=6), BLM (n=6) y BLM+Cul (n=6) a día 0, día 7, día 14 y día 21. A) Para cada sujeto se analizaron tres planos, el superior, medio e inferior, siendo cuantificados los mismos planos todos los días de experimento. Para ubicar los mismos planos entre los distintos sujetos se emplearon las regiones óseas de la caja torácica. Los gráficos muestran la representación media de los valores de HU obtenidos en cada plano. B) CT: Imágenes representativas del corte transversal del mismo sujeto del grupo FPI y FPI+Cul a día 0, 7 y 21 de experimento. Las regiones negras muestran la captación del aire por el pulmón, las blancas indican tejido óseo y las regiones intermedias en el pulmón muestran las lesiones fibróticas del pulmón al impedir la captación del aire por el mismo. Las imágenes muestran las lesiones pulmonares a lo largo del procedimiento y como a día 21, la ausencia de captación de aire por el pulmón fibrótico es mucho más acusada que el pulmón tratado con Cul. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni * (*p<0,05 frente a control el mismo día; #p<0,05 frente al grupo de BLM el mismo día. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

4. RESULTADOS

La tendencia observada en la imagen CT es confirmada por la captación pulmonar de Tc^{99m} administrado vía intravenosa. La figura 29A, a continuación, muestra una representación cuantitativa de los valores de Tc^{99m} detectados. La figura 29B representa la captación pulmonar y la fusión de las imágenes anatómicas y funcionales de SPECT/CT.

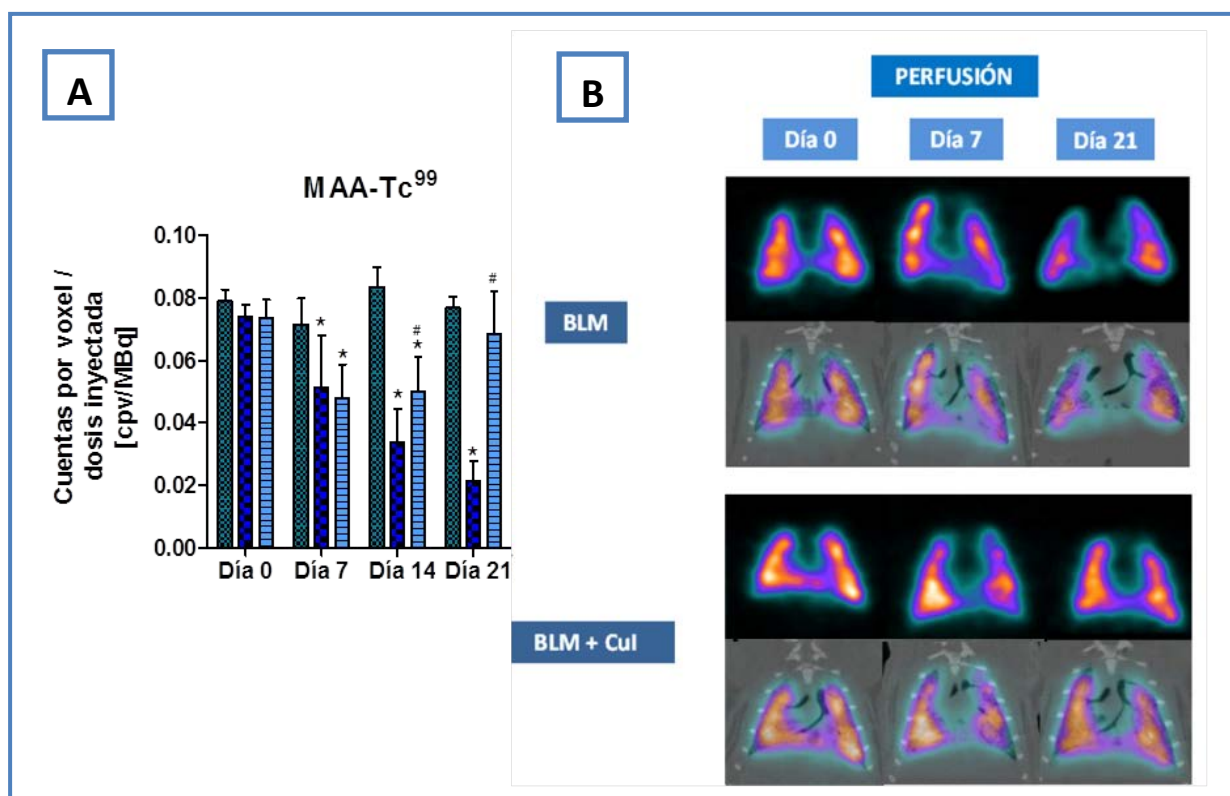


Figura 29: SPECT. Aumento de la captación pulmonar de Tc^{99m} en el grupo tratado farmacológicamente frente al grupo sin tratamiento. Análisis cualitativo y cuantitativo de la captación pulmonar de Tc^{99m} en ratas Control (n=6), BLM (n=6) y BLM+CuI (n=6) a día 0, día 7, día 14 y día 21. En el modelo preventivo se indujo la enfermedad mediante instilación intratraqueal de 3,75UI de BLM. La administración de CuI 1mg/kg/día vía intraperitoneal al grupo BLM+CuI se realizó desde el día 0. Al resto de grupos se administró vehículo. A) SPECT: media de cuentas por voxel (cpv) entre dosis inyectada. La cuantificación se realizó mediante un VOI que engloba la región de captación de MAA- Tc^{99m} por el pulmón. La media de cpv cuantificada se corrigió mediante el cálculo de dosis inyectada corregida por el tiempo de decaimiento del radiofármaco. B) SPECT/CT: Se obtuvieron imágenes de todos los sujetos. La figura muestra una imagen SPECT y la fusión de imágenes SPECT/CT para un mismo sujeto de los grupos BLM y BLM+CuI a día 0, 7 y 21. La combinación de las imágenes SPECT/CT permite localizar la captación de MAA- Tc^{99m} por cada sujeto, situando anatómicamente las regiones hipocaptantes del pulmón. Las imágenes nos permiten visualizar los resultados obtenidos en la cuantificación. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM de n=6 por grupo experimental. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni * (*p<0,05 frente a control el mismo día; #p<0,05 frente al grupo de BLM el mismo día. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

A día 7, la perfusión pulmonar disminuye significativamente en ambos grupos. Mientras que en el grupo BLM las cuentas por voxel van disminuyendo a medida que progresa la enfermedad, en el grupo BLM+Cul se aumenta la captación progresivamente desde el día 14 hasta el día 21. La gráfica muestra como a día 21, el grupo de BLM ha disminuido la captación pulmonar en un 71,6% con respecto a su día 0; en cambio, el grupo BLM+Cul tan solo ha disminuido su captación en un 6,8% desde que se iniciara el procedimiento. El grupo control mantiene los valores de captación pulmonar de MAA-Tc99m a lo largo del procedimiento experimental.

Esta diferencia en la captación pulmonar puede apreciarse de forma cualitativa en la fusión SPECT/CT en la figura 29B. En ella se observa la imagen SPECT y la combinación con la imagen CT de un mismo sujeto experimental del grupo con y sin tratamiento a día 0, 7 y 21. El grupo de BLM va disminuyendo la captación pulmonar a lo largo del procedimiento, mientras que dicha disminución de la captación no resulta tan evidente en el grupo con tratamiento.

4.1.2.5 Histología

I. La administración intraperitoneal de Cul 1mg/kg/día, mejora la histología pulmonar, revierte el remodelado vascular y la hipertrofia del ventrículo derecho.

En el presente trabajo se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina y masson tricrómico para estudiar la histología del tejido pulmonar. Se realizaron cortes de pulmón incluido en parafina de 5µm de espesor y se observó el parénquima pulmonar, los vasos sanguíneos y las vías aéreas.

La tinción de hematoxilina-eosina del grupo control nos permite identificar un parénquima pulmonar sano, vías respiratorias sin deteriorar y vasos sanguíneos de lumen y espesor habitual; en definitiva, una distribución y una arquitectura pulmonar propia de un sujeto sano en ausencia de enfermedad. En el grupo de FPI se observa un predominio del tejido fibrótico así como un engrosamiento de las paredes de las arterias adyacentes a los

4. RESULTADOS

bronquios. Dicho engrosamiento se ve revertido en el grupo tratado con Cul 1mg/kg/día tal y como se ve reflejado en la figura 30A.

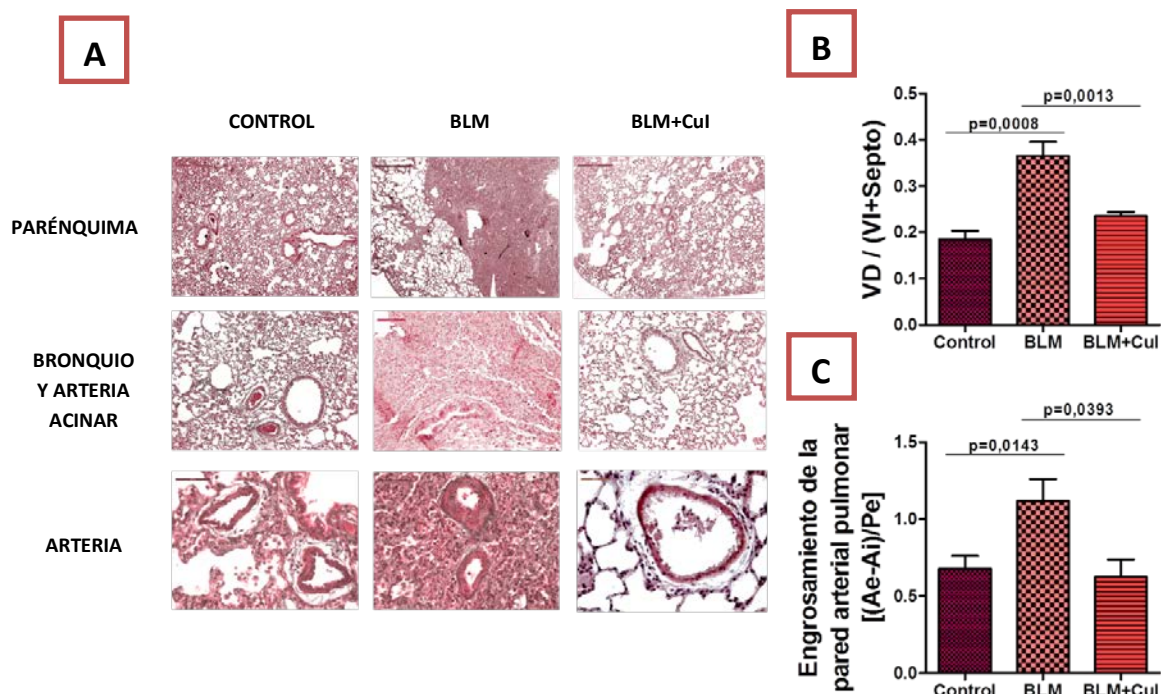


Figura 30: El modelo preventivo mejora la histología de tejido pulmonar revirtiendo las áreas fibróticas, hipertrofia del ventrículo derecho y la cuantificación del remodelado vascular. El modelo preventivo consta de tres grupos experimentales: Control (n=6), BLM (n=6) y BLM+Cul (n=6). La FPI fue inducida a día 0 mediante la administración intratraqueal de Bleomicina 3,75UI o salino en el grupo control. Se administró Cul 1mg/kg/día vía intraperitoneal en ratas del grupo BLM+Cul, y la misma cantidad de vehículo en el grupo Control y BLM.

A) Tinción hematoxilina-eosina: representación del parénquima pulmonar (imagen 5x), bronquios y arterias acinares (imagen 20x), y arterias (imagen 40x), de los grupos control, BLM y BLM+Cul.

B) La hipertrofia del ventrículo derecho se calculó en los grupos control (n=6), BLM (n=6) y BLM+Cul (n=6) mediante el cociente entre el ventrículo derecho y la suma del ventrículo izquierdo y el septo.

C) Engrosamiento de la pared arterial pulmonar de los grupos control, BLM y BLM+Cul. Se midieron 20 arterias acinares en imágenes capturadas a 20x de los distintos grupos experimentales. El engrosamiento de la pared arterial se calculó mediante el cociente del área de la pared arterial y el perímetro externo.

(Los valores de p son significativos cuando $p < 0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

En pacientes con FPI es frecuente la presencia de cor pulmonale derivado del aumento de la presión en las arterias pulmonares que desemboca en hipertensión pulmonar. El lado derecho del corazón presenta mayor dificultad para bombear sangre y si esto se prolonga en el tiempo puede aparecer hipertrofia del ventrículo derecho como consecuencia de la tensión ejercida sobre el lado derecho del corazón. La hipertrofia del ventrículo derecho se calcula mediante el cociente del peso del ventrículo derecho frente al ventrículo izquierdo más el septo. Tal y como se observa en la figura 30B, la hipertrofia del ventrículo derecho en el grupo de BLM sufre un incremento del 166.66% frente al grupo control siendo el resultado estadísticamente significativo. En el grupo tratado farmacológicamente, la hipertrofia del ventrículo derecho se ve revertida en un 83,33% alcanzando prácticamente los valores del grupo control y siendo el resultado estadísticamente significativo.

La figura 30C muestra el engrosamiento de las paredes arteriales. La medida del espesor arterial se realizó mediante el cociente del área de la pared entre el perímetro externo del vaso [155]. En la gráfica puede observarse como las paredes arteriales del grupo que presenta la enfermedad se ven incrementadas dos veces comparado con el grupo control. Dicho engrosamiento de la pared arterial es revertido en el grupo de BLM+Cul hasta alcanzar los valores control.

II. El tratamiento farmacológico con Cul 1mg/kg/día reduce los depósitos de colágeno y el valor de Ashcroft, evaluador del grado de fibrosis pulmonar.

La tinción de masson tricrómico permite identificar, además de la arquitectura bronquial, las fibras de colágeno tipo I en el tejido pulmonar tiñéndolas de color azul oscuro. En ausencia de enfermedad, las fibras de colágeno, se localizan rodeando las paredes del vaso proporcionando una función estructural al tejido pulmonar. Mientras que en la fibrosis pulmonar las fibras de colágeno se multiplican como consecuencia del desarrollo del tejido fibrótico estimulado por el crecimiento y la diferenciación de miofibroblastos.

4. RESULTADOS

En la figura 31A se puede apreciar como las regiones fibróticas expresan regiones azuladas alrededor de las paredes engrosadas de los vasos y en el parénquima pulmonar. Las imágenes histológicas del grupo BLM+Cul presentan una disminución de las áreas fibróticas y de la expresión de colágeno.

La severidad del grado de fibrosis pulmonar se evaluó siguiendo la puntuación de Ashcroft mediante una escala de 0 (tejido pulmonar sano) a 8 (invasión total del tejido fibrótico) [156]. Se evaluaron 10 imágenes representativas de cada grupo experimental. La evaluación se realizó por un mismo individuo ajeno al procedimiento experimental. La figura 31B representa la cuantificación de fibrosis observada en las preparaciones histológicas. El grupo inducido con BLM y sin tratamiento presenta un grado severo de FPI, mientras que el grupo tratado con Cul presenta un estadio de fibrosis mínimo según la puntuación de Ashcroft [156] que se detalla en la tabla 6 a continuación:

Grado de Fibrosis	Características histológicas
0	Pulmón normal
1	Engrosamiento fibrótico mínimo de las paredes alveolares y bronquiales
2-3	Engrosamiento moderado de las paredes sin daño notable de la arquitectura pulmonar
4-5	Aumento de fibrosis con lesiones evidentes de la estructura pulmonar y formación de bandas fibróticas o pequeñas masas fibróticas
6-7	Distorsión severa de la estructura pulmonar y amplias áreas fibróticas; estructura de panal de abeja
8	Expansión total de fibrosis

Tabla 6: Grado de fibrosis según la clasificación de Ashcroft

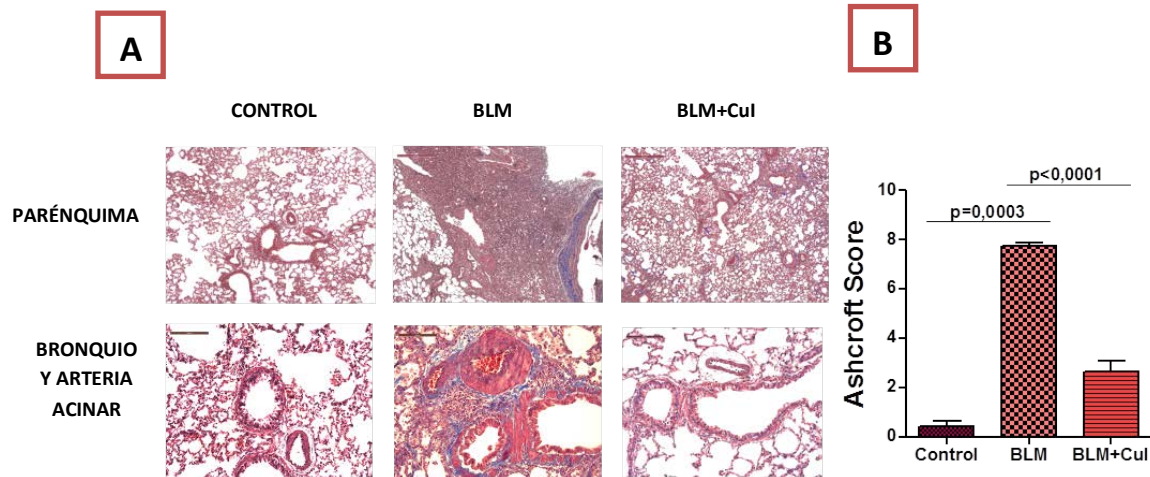


Figura 31. Descenso del depósito de colágeno en las áreas fibróticas y en las paredes de los vasos en el grupo tratado con Cul 1mg/kg/día en cortes histológicos de tejido pulmonar teñidos con masson tricrómico. Evaluación del descenso del grado de fibrosis pulmonar mediante Ashcroft score en el grupo con tratamiento. Se indujo la enfermedad al grupo BLM y BLM+Cul mediante instilación intratraqueal de 3,75 UI de bleomicina, y de salino al grupo control. A día 0 se administró Cul 1mg/kg/día intraperitoneal al grupo BLM+Cul y la misma cantidad de vehículo al resto de grupos. A) Tinción de masson tricrómico: representación del parénquima pulmonar (imagen 5x), y bronquios y arterias acinares (imagen 20x) de los grupos control, BLM y BLM+Cul. La tinción de masson tricrómico marca los depósitos de colágeno de color azul. B) Ashcroft score. 10 imágenes aleatorias de cada grupo experimental fueron evaluadas por un ojo ciego, siguiendo los criterios establecidos en la escala de Ashcroft de 0 a 8. (Los valores de p son significativos cuando $p < 0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

4. RESULTADOS

4.1.2.6 La administración intraperitoneal de Cul 1mg/kg/día reduce la expresión proteica, expresión génica e inmunohistoquímica de Col1A, ET-1, TGF- β 1 y CTGF, marcadores implicados en la formación y progresión de FPI.

En el presente estudio de modelo experimental de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina se estudiaron la expresión proteica y génica de determinadas proteínas implicadas en los procesos de remodelado vascular tales como el Col1A, ET-1, TGF- β 1 y CTGF. Los resultados se expresan en la figura a continuación.

Col1A se encuentra sobreexpresado tanto a nivel génico como proteico en el grupo de fibrosis pulmonar. A nivel proteico los niveles de Col-1 aumentan 1,5 veces frente al grupo control mientras que el grupo BLM+Cul consigue mantener los niveles del control. El aumento es mucho más evidente a nivel génico ya que el grupo fibrótico aumenta 6 veces su expresión vs. el grupo control. El tratamiento con Cul restablece los valores basales. La figura 32C muestra cortes inmunohistoquímicos de Col1A para cada grupo experimental. En la figura control se aprecian regiones marcadas ligeramente con Col1A alrededor de los vasos y los bronquios. El depósito de colágeno se aprecia de forma más notable en el grupo de BLM, con marcaje elevado no solo rodeando los vasos sino también en el parénquima fibrótico. En el grupo con tratamiento farmacológico las áreas marcadas con colágeno son menores y con una distribución similar al grupo control.

Los niveles proteicos de ET-1, TGF- β 1 y CTGF se vieron sobreexpresados en el grupo de fibrosis 1,44, 1,74, y 1,45 veces respectivamente, hecho que se ve revertido con el tratamiento farmacológico, tal y como se muestra la figura 32A. En la figura 32B puede corroborarse los resultados de expresión génica con los resultados de expresión proteica. La expresión génica de ET-1 y CTGF aumenta 1,89 veces en el grupo de BLM mientras que el TGF- β 1 aumenta en un 1,30. Dicha sobreexpresión génica se ve revertida hasta niveles basales en el grupo farmacológico tratado con Cul.

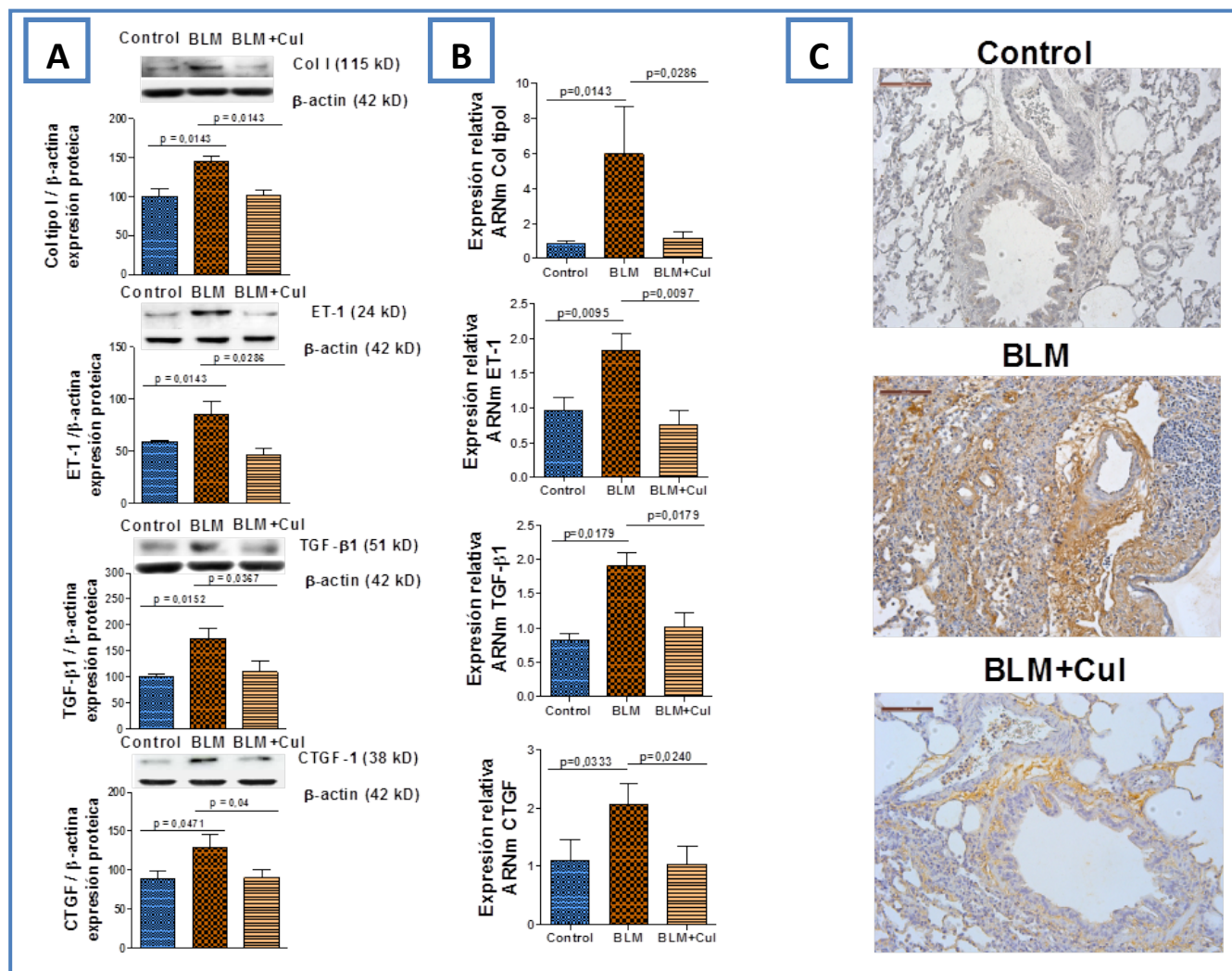


Figura 32: El modelo preventivo reduce la expresión proteica, expresión génica e inmunohistoquímica de Colágeno tipo I (COL1A), Endotelina 1, (ET-1), factor de transformación de crecimiento (TGF-β1) y factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), marcadores implicados en la formación y progresión de FPI. El modelo preventivo consta de tres grupos experimentales: Control (n=6), BLM (n=6) y BLM+Cul (n=6). La FPI fue inducida a día 0 mediante la administración intratraqueal de Bleomicina 3,75UI o salino en el grupo control. Se administró Cul 1mg/kg/día vía intraperitoneal en ratas del grupo BLM+Cul, y la misma cantidad de vehículo en el grupo Control y BLM. A) Expresión proteica de marcadores de fibrosis pulmonar Col-1, ET-1, TGF-β1 y CTGF en sujetos control (n=4), BLM (n=4) y BLM+Cul (n=4). Se muestran las imágenes representativas del western blott. B) Expresión de ARNm en homogenado de tejido pulmonar de Col-1, ET-1, TGF-β1 y CTGF en grupos control (n=6), BLM (n=6) y BLM+Cul (n=6). Los datos se expresan como el ratio a GAPDH para los niveles de ARNm y a β-actina para los niveles de proteína, normalizados al grupo control. Los resultados se expresan como la media (error estándar) de n=6 sujetos por condición. C) Secciones de cortes histológicos en sujetos control, BLM y BLM+Cul fueron inmunomarcados para Col-1 (marrón). Se muestran imágenes representativas (escala 100µm). (Los valores de p son significativos cuando $p < 0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

4. RESULTADOS

4.1.2.7 La expresión proteica e inmunohistoquímica de P-JAK2 y P-STAT3, posibles marcadores implicados en la formación y progresión de FPI, son inhibidos mediante la administración de Cul 1mg/kg/día.

Las proteínas P-STAT3, P-SMAD3 y P-JAK2, implicadas en diversas rutas de activación de fibroblastos, fueron determinadas mediante cuantificación proteica e inmunohistoquímica. Tal y como se muestran en la figura 33, las formas fosforiladas de las tres proteínas se vieron sobreexpresadas en el grupo BLM y dicha condición se inhibió mediante el tratamiento con Cul vía intravenosa. El ratio de expresión de P-STAT3/STAT3 se vio aumentado 10 veces en el grupo de BLM frente al grupo control, 2 veces en P-SMAD3/SMAD3 y 2,5 veces en P-JAK2/JAK2. El grupo tratado farmacológicamente revirtió los niveles en un 65,76%, 113,23% y 85,20% respectivamente

Estos resultados fueron ratificados mediante la técnica de inmunohistoquímica en las que se aprecia como las áreas fibróticas del grupo de BLM tienen un mayor depósito de P-JAK2 y P-STAT que el grupo BLM+Cul; tal y como se muestra en la figura 33B. Los depósitos de las formas fosforiladas en las imágenes del grupo de BLM presentan una distribución en las regiones fibróticas del parénquima pulmonar, en el epitelio del bronquio y en músculo liso bronquial, siendo prácticamente ausentes en los cortes histológicos de BLM+Cul. Por otro lado, la expresión de las proteínas JAK2 y STAT3 se vio aumentada en las preparaciones control y BLM+Cul frente al grupo de BLM. STAT3 y JAK2 se expresa principalmente en el epitelio alveolar.

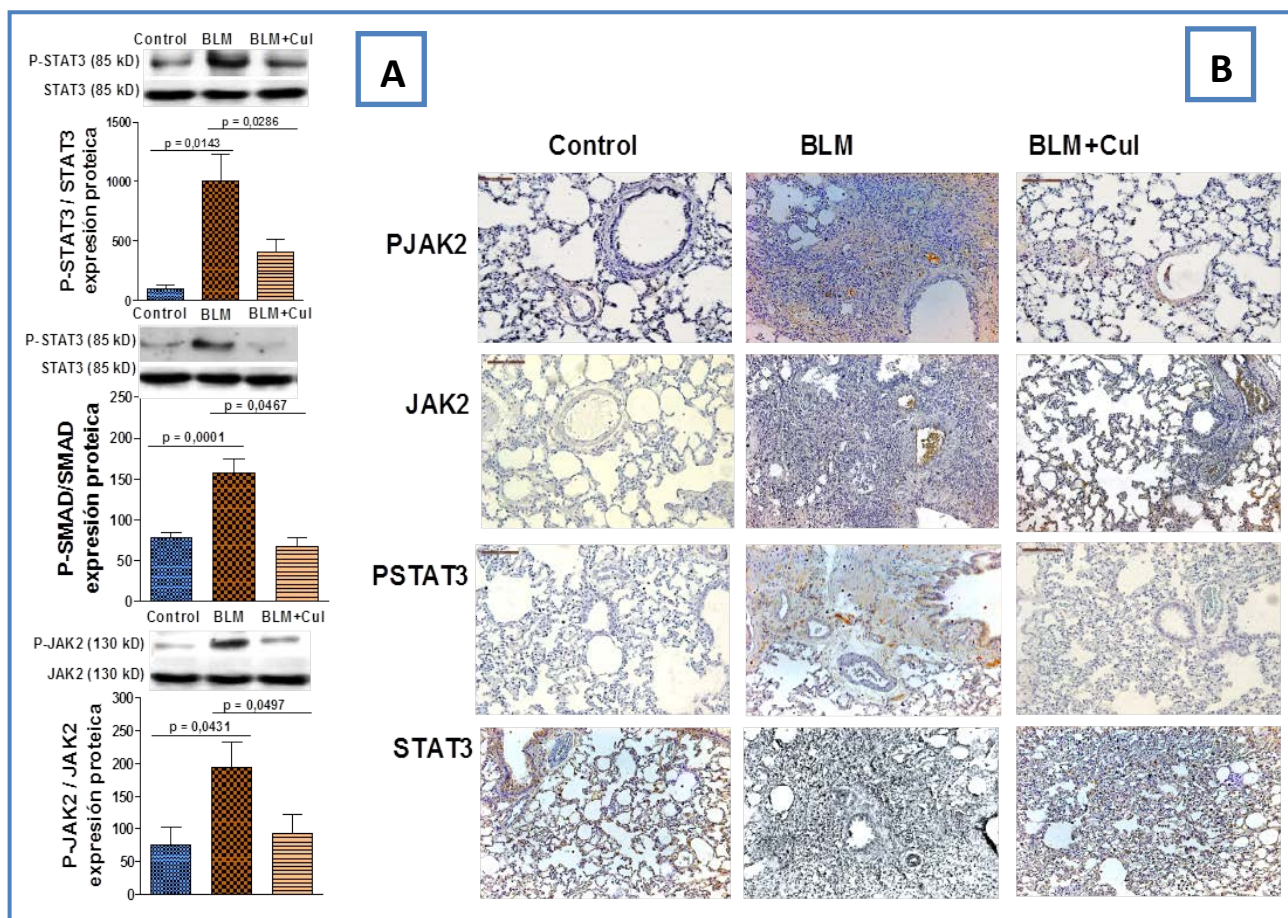


Figura 33: La administración intravenosa de Cul 1mg/kg/día reduce la expresión proteica, e inmunohistoquímica de P-JAK2 y P-STAT3, posibles marcadores implicados en la formación y progresión de FPI. El modelo preventivo consta de tres grupos experimentales: Control (n=6), BLM (n=6) y BLM+Cul (n=6). La FPI fue inducida a día 0 mediante la administración intratraqueal de Bleomicina 3,75UI o salino en el grupo control. Se administró Cul 1mg/kg/día vía intraperitoneal en ratas del grupo BLM+Cul, y la misma cantidad de vehículo en el grupo Control y BLM. A) Expresión proteica de marcadores de fibrosis pulmonar P-STAT3, P-SMA y P-JAK2, en sujetos control (n=4), BLM (n=4) y BLM+Cul (n=4). Cada gráfica va acompañada de su β -actina. Los datos se expresan como el ratio de proteína en su forma no fosforilada, normalizados al grupo control. Los resultados se expresan como la media (error estándar) de n=4 sujetos por condición. Se muestran las imágenes representativas del western blott. B) Secciones de cortes histológicos en sujetos control, BLM y BLM+Cul fueron inmunomarcados para JAK2, P-JAK2, STAT3, y P-STAT3 (marrón). Se muestran imágenes representativas (escala 100 μ m). (Los valores de p son significativos cuando $p < 0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

4.1.2.8 La administración intraperitoneal de Cul 1mg/kg/día inhibe la expresión de IL-6 e IL-13.

En el presente trabajo se determinó la concentración de mediadores inflamatorios en lavado bronqueoalveolar y en homogenado de tejido pulmonar. Las interleuquinas IL-6 e IL-13 son liberadas al medio extracelular cuando se desencadena una respuesta inflamatoria.

La concentración del IL-6 en LBA se vio incrementada cinco veces en el grupo BLM frente al grupo control. Dicho aumento fue revertido en un 62,41% en el grupo tratado con Cul 1mg/kg/día con un p valor significativo. Del mismo modo, se cuantificó los niveles de IL-6 en homogenado de tejido pulmonar con el fin de determinar si la variación de los niveles de interleuquinas también era perceptible en tejido. Los niveles determinados son estadísticamente significativos, aumentado en el grupo BLM en un 120% y revirtiendo en el grupo tratado farmacológicamente hasta niveles del grupo control.

El grupo experimental de FPI inducido por la administración intratraqueal de BLM en ausencia de tratamiento, duplicó la concentración de IL-13 en LBA del grupo control. Estos valores fueron reducidos hasta alcanzar los niveles basales tras la administración del fármaco. La misma tendencia puede observarse en la cuantificación de los niveles de IL-13 en homogenado de tejido pulmonar. En este caso los valores fueron revertidos llegando incluso a concentraciones de IL-13 inferiores a la concentración basal en los grupos control.

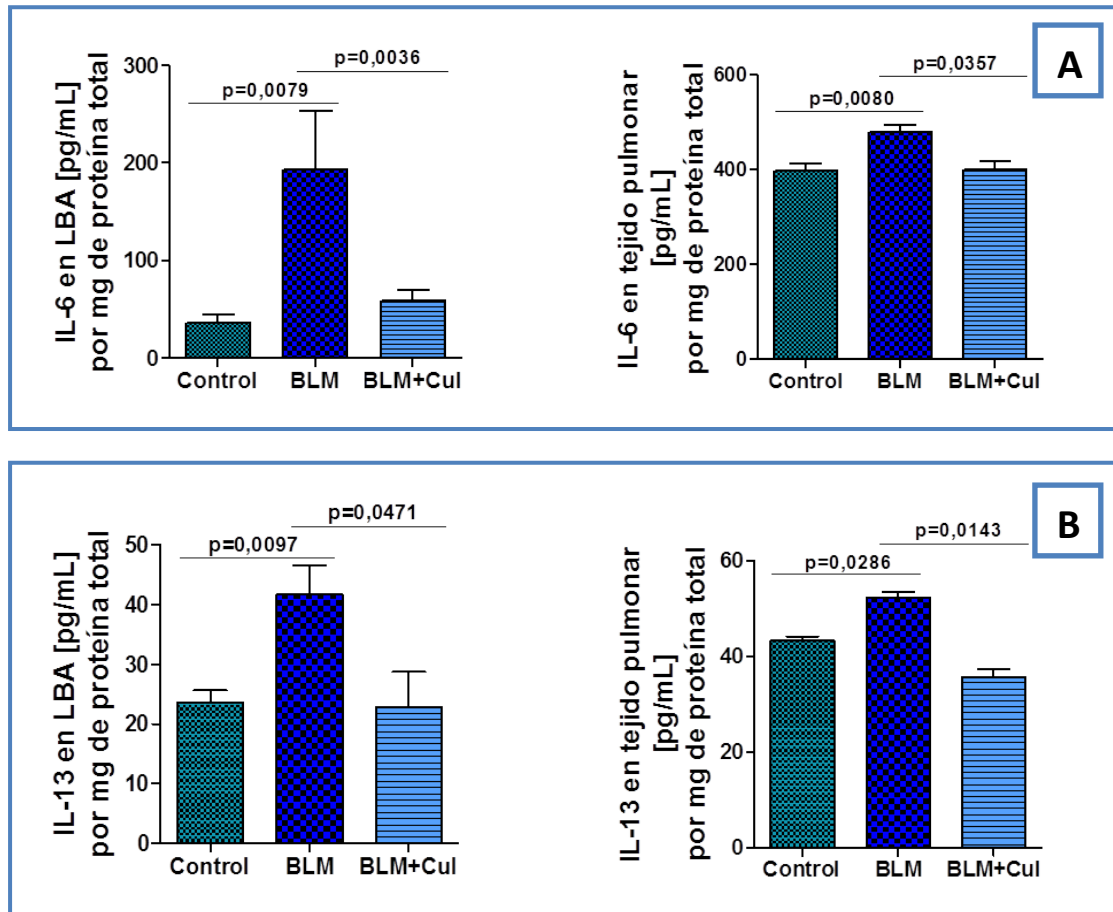


Figura 34: El tratamiento farmacológico con Cul 1mg/kg/día inhibe la liberación de IL-6 e IL-13 en LBA y tejido pulmonar. Se determinaron los niveles de interleuquinas en alícuotas de LBA y en homogenado de tejido pulmonar. El modelo preventivo se realizó en sujetos experimentales del grupo control (n=6), BLM (n=6) y BLM+Cul (n=6) a los que se les indujo la enfermedad con 3,75 UI de BLM para el grupo BLM y BLM+Cul y salino en el grupo control. El grupo con tratamiento recibió 1mg/kg/día de Cul desde el inicio del procedimiento, el resto de grupos recibieron la misma cantidad de vehículo vía intraperitoneal. A) concentración de IL-6 en pg/mL por mg de proteína total, en alícuota de LBA y homogenado de tejido pulmonar. B) concentración de IL-13 en pg/mL por mg de proteína total, en alícuota de LBA y homogenado de tejido pulmonar del grupo control (n=6), BLM (n=6) y BLM+Cul (n=6). Los valores de p son significativos cuando $p < 0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney.

4.1.2.9 Determinación de los niveles de tropocolágeno III (PIIINP) en LBA como marcador molecular de Fibrosis Pulmonar. La Cul 1mg/kg/día inhibe los niveles de PIIINP liberados al medio extracelular.

Los niveles de tropocolágeno III, precursor del colágeno III, que se encuentra sobreexpresado en enfermos de fibrosis pulmonar, fueron determinados mediante la técnica de RIA en muestras de LBA. En la figura 35 se muestran los resultados de la cuantificación de los niveles de tropocolágeno III en los distintos grupos experimentales. Los resultados muestran como tanto en el grupo control como en grupo tratado farmacológicamente, la presencia de tropocolágeno III es inexistente en las muestras de LBA. Sin embargo, en el grupo con FPI, presenta niveles que alcanzan los 0,27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en LBA. Los resultados obtenidos son de relevancia clínica ya que plantean la posibilidad de emplear la determinación de tropocolágeno III en LBA como marcador de FP.

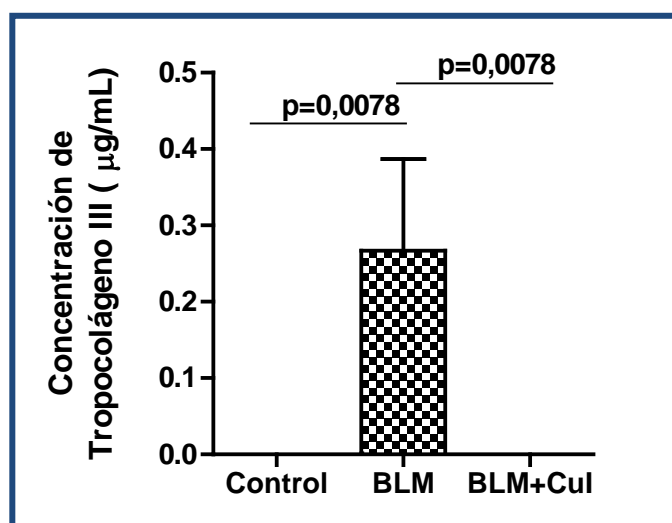


Figura 35: El tropocolágeno III aumenta sus niveles de expresión en LBA del grupo FPI confirmándose su utilidad como marcador de diagnóstico de FP. Se determinaron los niveles de tropocolágeno III en alícuotas de LBA del grupo control (n=4), BLM (n=4) y BLM+Cul (n=4). La técnica de RIA únicamente detectó concentración de tropocolágeno III en el grupo de BLM, careciendo de expresión los grupos control y BLM+Cul. Los valores de p son significativos cuando $p < 0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney.

4.1.3 MODELO CURATIVO

4.1.3.1 Efecto farmacológico de la Cucurbitacina I 1 mg/Kg/día vía intraperitoneal, a los 7 días de la inducción de fibrosis pulmonar con bleomicina en rata Wistar.

Entre los resultados que nos aportan mayor información del proceso fibrótico se encuentran: la evolución animal mediante la cuantificación de imágenes SPECT/CT; las proteínas totales en pulmón y las proteínas en lavado broncoalveolar que se observan aumentadas ante la inflamación que genera la exposición a bleomicina.

4.1.3.2 La administración de Cul 1mg/kg/día a los 7 días de inducción de FPI reduce la concentración de proteína total en homogenado pulmonar y en lavado broncoalveolar.

En concordancia con los estudios anteriores, el grupo expuesto a bleomicina presentó un aumento de la concentración de proteína total tanto el homogenado de tejido pulmonar y en LBA como consecuencia de la inflamación y la hipoxia a la que se ven sometidos los pulmones, con respecto al grupo control. La administración de Cul 1 mg/Kg/día por vía intraperitoneal, presentó una tendencia a mejorar el perfil de la bleomicina mediante significación estadística.

La figura 36A muestra como el grupo de BLM incrementó los niveles de proteína pulmonar en un 161,16% frente al grupo control. Estos valores descendieron en un 65,20% en el grupo experimental que presenta tratamiento.

La determinación de proteínas totales en lavado broncoalveolar se realizó con el fin de medir la respuesta inflamatoria a la bleomicina. Se produjo un aumento estadísticamente significativo en la concentración de proteínas en LBA del grupo de bleomicina con respecto al grupo control, aumentando la concentración proteica en un 225,8%. En paralelo, el grupo tratado con Cul

4. RESULTADOS

restableció los valores de proteína total en LBA en un 90,5% de forma significativa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 36B.

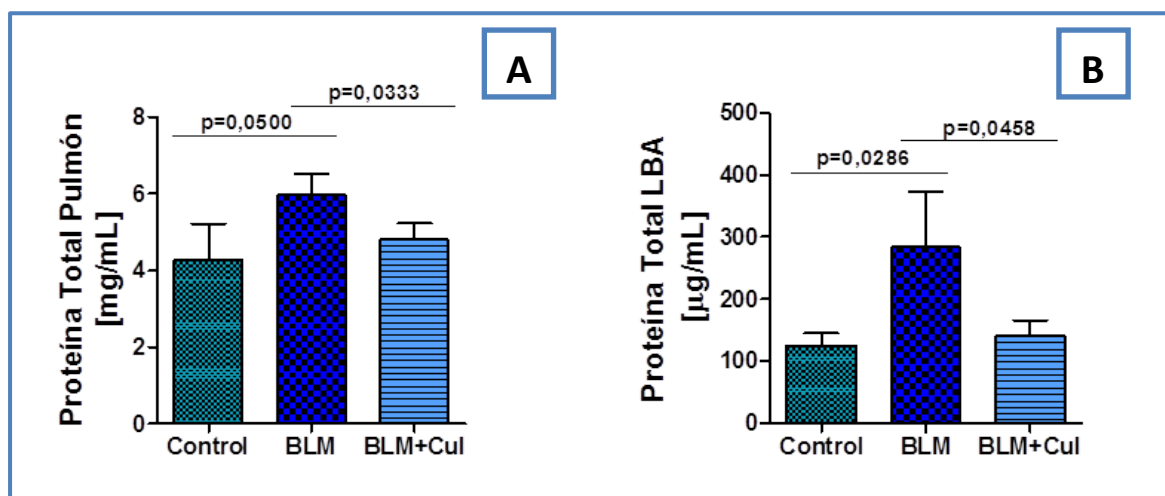


Figura 36. Disminución de la concentración de proteína total en homogenado de tejido pulmonar y el LBA en el modelo curativo. El modelo curativo consta de tres grupos experimentales: Control (n=5), BLM (n=7) y BLM+Cul (n=7). La FPI fue inducida a día 0 mediante la administración intratraqueal de Bleomicina 3,75UI o salino en el grupo control. A los siete días de inducción de la FPI, se administró Cul 1mg/kg/día vía intraperitoneal en ratas del grupo BLM+Cul, y la misma cantidad de vehículo en el grupo Control y BLM. Figura A) Comparación de la concentración de proteína total en homogenado de pulmón izquierdo en los diferentes grupos experimentales. Figura B) Comparación de concentración de proteína total en el volumen extraído de LBA. (Los valores de p son significativos cuando $p < 0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

4.1.3.3 El modelo curativo disminuye el número de células inflamatorias liberadas al medio extracelular.

Una vez finalizado el procedimiento experimental se procedió al sacrificio de los sujetos experimentales y el procesamiento de las muestras. La cantidad recogida de LBA se anotó, se alicuotó y se procedió al recuento celular y el citospin, técnicas empleadas para el conteo de células inflamatorias extravasadas y la distribución de células inflamatorias obtenidas de cada sujeto experimental.

Tal y como se puede apreciar en la figura 37A, el grupo inducido con bleomicina presenta siete veces más el número de células totales en LBA que el grupo control. El grupo tratado farmacológicamente revierte dicho incremento en un 62,61% el número de células totales extravasadas en pulmón producido por la bleomicina, siendo los resultados obtenidos estadísticamente significativos. El aumento de células inflamatorias tiene como significado un aumento de neutrófilos, monocitos y más notablemente de linfocitos y macrófagos en los sujetos en ausencia de tratamiento. Las ratas que fueron tratadas con Cul 1mg/kg/día a los siete días de la inducción de la enfermedad exhiben una disminución estadísticamente significativa en los cuatro tipos celulares: neutrófilos, linfocitos, eosinófilos y macrófagos, llegando estos últimos prácticamente a niveles control. Una pequeña cantidad de eosinófilos y basófilos se encuentran presentes en el grupo con tratamiento farmacológico, tal y como se puede apreciar en la figura 37 a continuación.

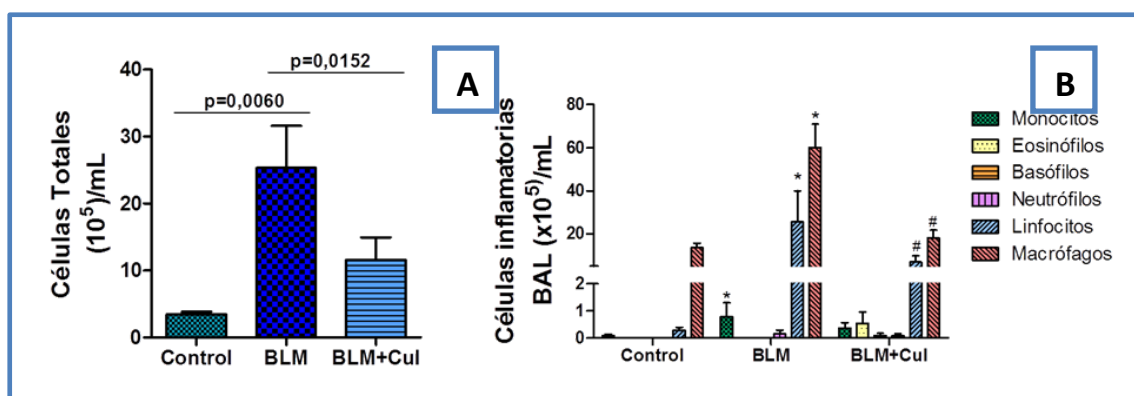


Figura 37: Disminución de las células inflamatorias en lavado broncoalveolar del modelo curativo. Número de células en LBA de rata a los veintidós días de la inducción de fibrosis pulmonar con 3,75 UI/Kg de bleomicina, en los tres grupos experimentales estudiados: control (n=5), fibrosis (n=7), fibrosis con tratamiento de cucurbitacina 1 mg/Kg/día vía intraperitoneal (n=7). A) Número de células totales ($\times 10^5$) por mL de LBA. B) Comparación de la distribución de células inflamatorias extravasadas por mL de LBA. (Los valores de p son significativos cuando $p < 0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

4. RESULTADOS

4.1.3.4 La cucurbitacina I hydrate reduce el área fibrótica aumentado la captación pulmonar de aire y de Tc99m frente al grupo de FPI en el modelo curativo.

La figura 38 representa la valoración cuantitativa y cualitativa de la técnica de CT. Se analizaron tres planos en cada imagen obtenida, el plano superior, medio e inferior. Los valores de HU corresponden con la densidad de tejido, oscilando dichos valores entre -1000 HU, que corresponde a la densidad del aire y +1000 HU que corresponde a la densidad hueso. La cuantificación del grupo control muestra como los valores de HU se mantienen constantes en todos los planos a lo largo del procedimiento.

El análisis cuantitativo de los planos superior, medio e inferior mostraron una disminución de las HUs a día 7 correspondiendo con el pico inflamatorio de la enfermedad en los grupos inducidos con BLM. Dicha disminución persistió hasta día 21 en el plano superior e inferior en el grupo de enfermedad sin tratamiento como consecuencia de una alteración en la morfología y estructura pulmonar, reduciendo el volumen pulmonar viable. A día 7 comienza el tratamiento con Cul 1mg/kg/día en el grupo con BLM+Cul. La administración del fármaco consiguió reestablecer los niveles de captación de HUs comenzado en el día 14 y alcanzando los niveles basales a día 21. Estos resultados se presentan en concordancia con los estudios anteriores.

En el plano superior, medio e inferior se observa una disminución de la captación de aire por el pulmón en el grupo con FPI sin tratamiento. En estos mismos planos observamos como en el grupo tratado con Cul reestablece la captación de aire por el pulmón a día 21. El grupo control, al carecer de alteración morfológica y estructural, mantiene constante el volumen de tejido pulmonar viable, y no presenta alteraciones en la captación.

La figura 38B muestra una imagen representativa de la imagen CT de los grupos experimentales inducidos con la enfermedad. A día 21, el grupo de BLM sin tratamiento presenta un evidente hipocaptación de aire por el pulmón debido a la destrucción del parénquima pulmonar sano. Se observa la aparición de opacidades en vidrio deslustrado, que son menos evidentes en el grupo tratado con Cul 1mg/kg/día durante dos semanas.

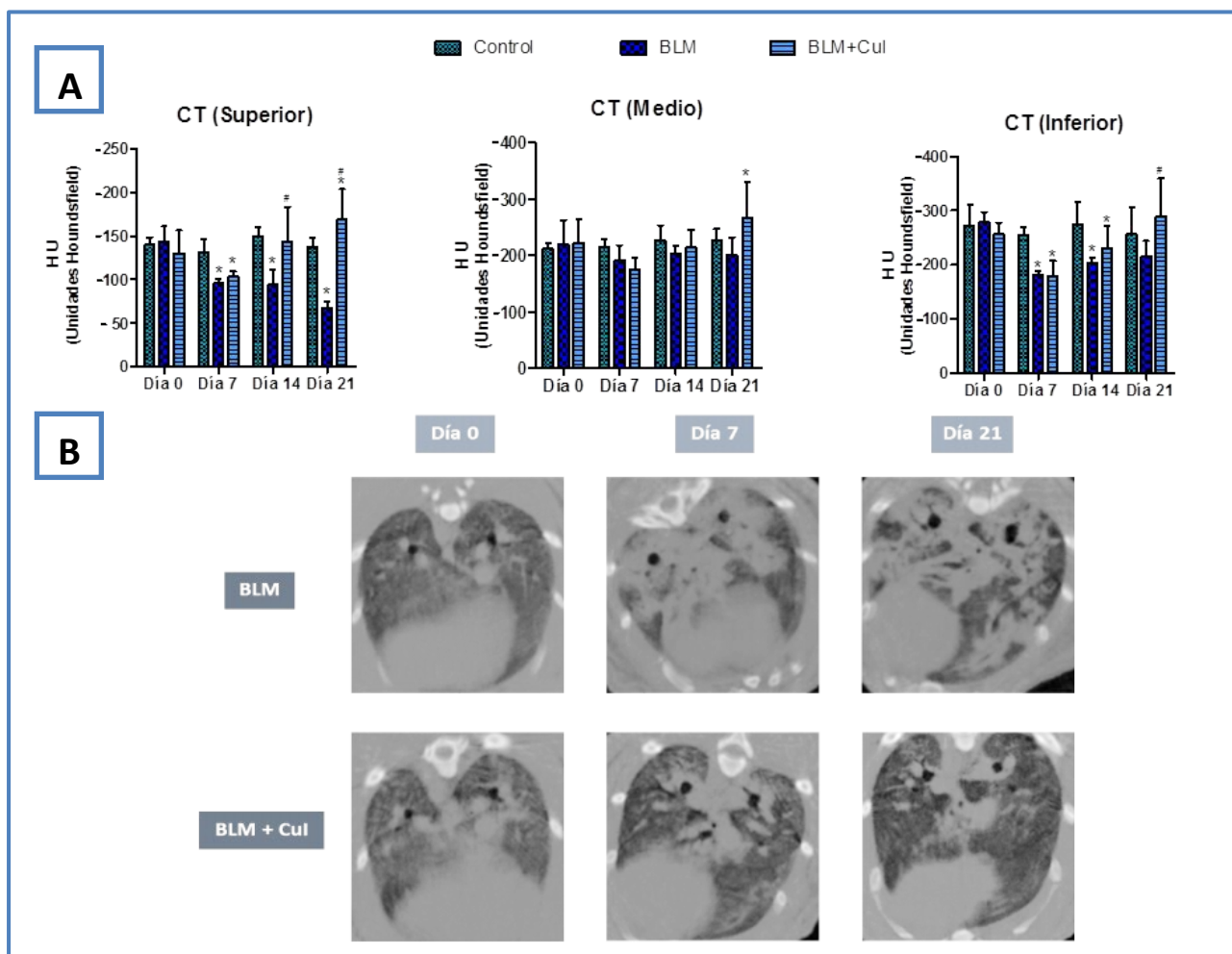


Figura 38. Tomografía Computarizada (CT). Aumento de la captación pulmonar de HU en el grupo tratado farmacológicamente frente al grupo sin tratamiento. El modelo curativo consta de tres grupos experimentales: Control (n=5), BLM (n=7) y BLM+Cul (n=7). La FPI fue inducida a día 0 mediante la administración intratraqueal de Bleomicina 3,75UI o salino en el grupo control. Se administró Cul 1mg/kg/día vía intraperitoneal en ratas del grupo BLM+Cul, y la misma cantidad de vehículo en el grupo Control y BLM. Análisis cualitativo y cuantitativo de la captación pulmonar de unidades hounsfield en ratas Control (n=5), BLM (n=7) y BLM+Cul (n=7) a día 0, día 7, día 14 y día 21. A) Para cada sujeto se analizaron tres planos, el superior, medio e inferior, siendo cuantificados los mismos planos todos los días de experimento. Para ubicar los mismos planos entre los distintos sujetos se tomó como referencia la parrilla costal. Los gráficos muestran la representación media de los valores de HU obtenidos en cada plano. B) CT: Imágenes representativas del corte transversal del mismo sujeto del grupo FPI y FPI+Cul a día 0, 7 y 21 de experimento. Las regiones negras muestran la densidad correspondiente al captación del aire por el pulmón, las blancas indican tejido óseo y las regiones intermedias en el pulmón muestran las lesiones fibróticas. Las imágenes muestran las lesiones pulmonares a lo largo del procedimiento. A día 21, la presencia de lesiones fibróticas en la región pulmonar es mayor en el grupo sin tratamiento, reduciendo el volumen pulmonar viable. La hipocaptación por el pulmón fibrótico es mucho más acusada en el pulmón con FPI que el pulmón tratado con Cul. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni * (*p<0,05 frente a control el mismo día; #p<0,05 frente al grupo de BLM el mismo día. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

4. RESULTADOS

La figura 39A muestra una representación cuantitativa de la captación de MAA-Tc99m por el pulmón a día 0, 7, 14 y 21 en los distintos grupos experimentales del modelo curativo. A los 7 días de la inducción de la enfermedad sin previa administración del fármaco, la captación de la perfusión pulmonar disminuye significativamente en el grupo BLM y BLM+Cul, en concordancia con el pico inflamatorio del modelo de fibrosis pulmonar inducida con bleomicina.

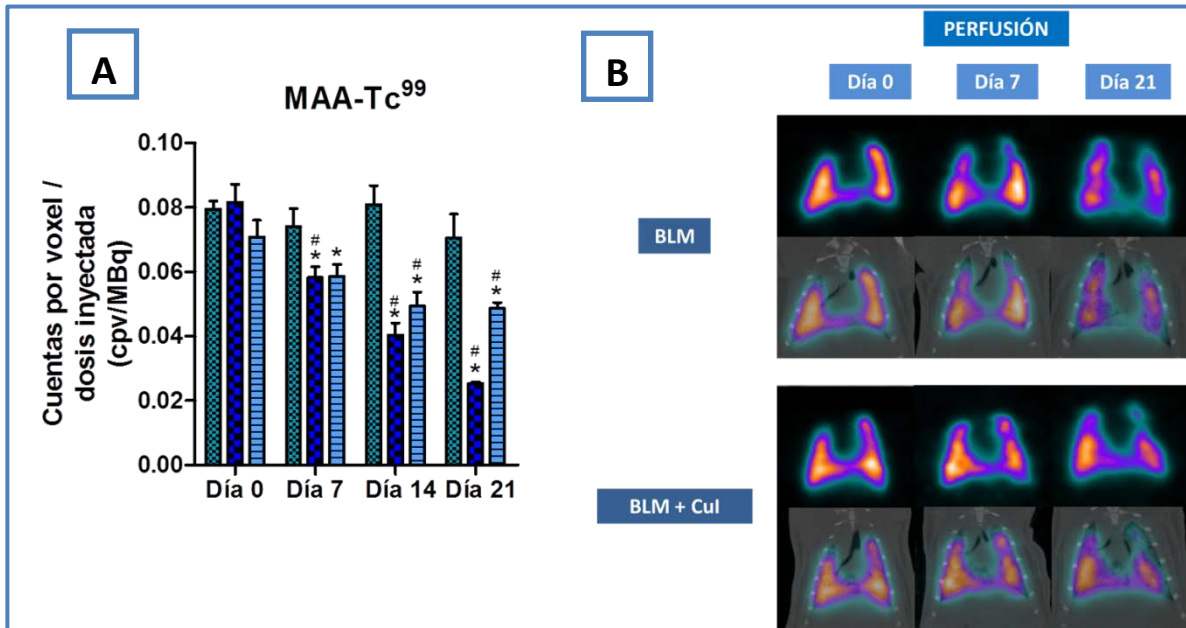


Figura 39: SPECT. Aumento de la captación pulmonar de MAA-Tc^{99m} en el modelo curativo. Análisis cualitativo y cuantitativo de la captación pulmonar de MAA-Tc^{99m} en ratas Control (n=5), BLM (n=7) y BLM+Cul (n=7) a día 0, día 7, día 14 y día 21. A) SPECT: media de cuentas por voxel (cpv) entre dosis inyectada. La cuantificación se realizó mediante un VOI que engloba la región de captación de MAA-Tc^{99m} por el pulmón. La media de cpv cuantificada se corrigió mediante el cálculo de dosis inyectada corregida por el tiempo de decaimiento del radiofármaco. B) SPECT/CT: Se obtuvieron imágenes de todos los sujetos. La figura muestra una imagen SPECT y la fusión de imágenes SPECT/CT para un mismo sujeto de los grupos BLM y BLM+Cul a día 0, 7 y 21. La combinación de las imágenes SPECT/CT permite localizar la captación de MAA-Tc^{99m} por cada sujeto, situando anatómicamente las regiones hipocaptantes del pulmón. Las imágenes nos permiten visualizar los resultados obtenidos en la cuantificación. Los resultados se expresaron como la media +/- SEM de n por grupo experimental. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni * (*p<0,05 frente a control el mismo día; #p<0,05 frente al grupo de BLM el mismo día. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

El grupo BLM presenta una disminución significativa de las cpv a lo largo del procedimiento, llegando a captar un cuarto de su captación inicial a día 0. A día 14, tras una semana de administración de Cul 1mg/kg/día al grupo BLM+Cul, la captación de MAA-Tc99m por el pulmón continúa disminuyendo, aunque de forma menos evidente que el grupo sin tratamiento. A día 21 los niveles de radiotrazador consiguen mantenerse, habiendo conseguido frenar el descenso de la captación pulmonar. Mientras que el grupo sin tratamiento disminuye la captación pulmonar de MAA-Tc99m en un 69,5% desde el día 0, el grupo tratado con Cul 1mg/kg/día a los 7 días de inducción de la enfermedad, disminuye sólo un 42,25%.

Esta diferencia en la captación pulmonar puede apreciarse de forma cualitativa en la fusión SPECT/CT en la figura 39B. La figura muestra como a día 7 ambos grupos presentan una disminución de la captación de carácter similar, mientras que a día 21 el grupo tratado farmacológicamente presenta mayor captación que el grupo de fibrosis.

4.1.3.5 La cucurbitacina mejora el ratio de ventilación/perfusión pulmonar en el modelo de fibrosis pulmonar inducida con bleomicina.

Los ensayos realizados en sujetos del grupo BLM y BLM+Cul permiten establecer la correlación entre la ventilación/perfusión con y sin administración del fármaco. La figura 40A muestra los datos de correlación del día 0 y día 21 de dos sujetos representativos de cada grupo. A día 0, la distribución de las cuentas en ambos grupos es homogénea y lineal, con una correlación en torno a 0,8. A día 21, la correlación del grupo sin tratamiento desciende hasta valores en torno a 0,2 mientras que la administración de Cul revierte los valores hasta 0,78. La representación de las medias de todos los valores de correlación se ven representados en la figura 40C. La administración intraperitoneal de 1mg/kg/día de Cul mejora la ventilación/perfusión hasta niveles control, siendo los resultados estadísticamente significativos. La figura 40B muestra una representación de la ventilación y perfusión pulmonar en un sujeto de cada grupo a día 0 y día 21.

4. RESULTADOS

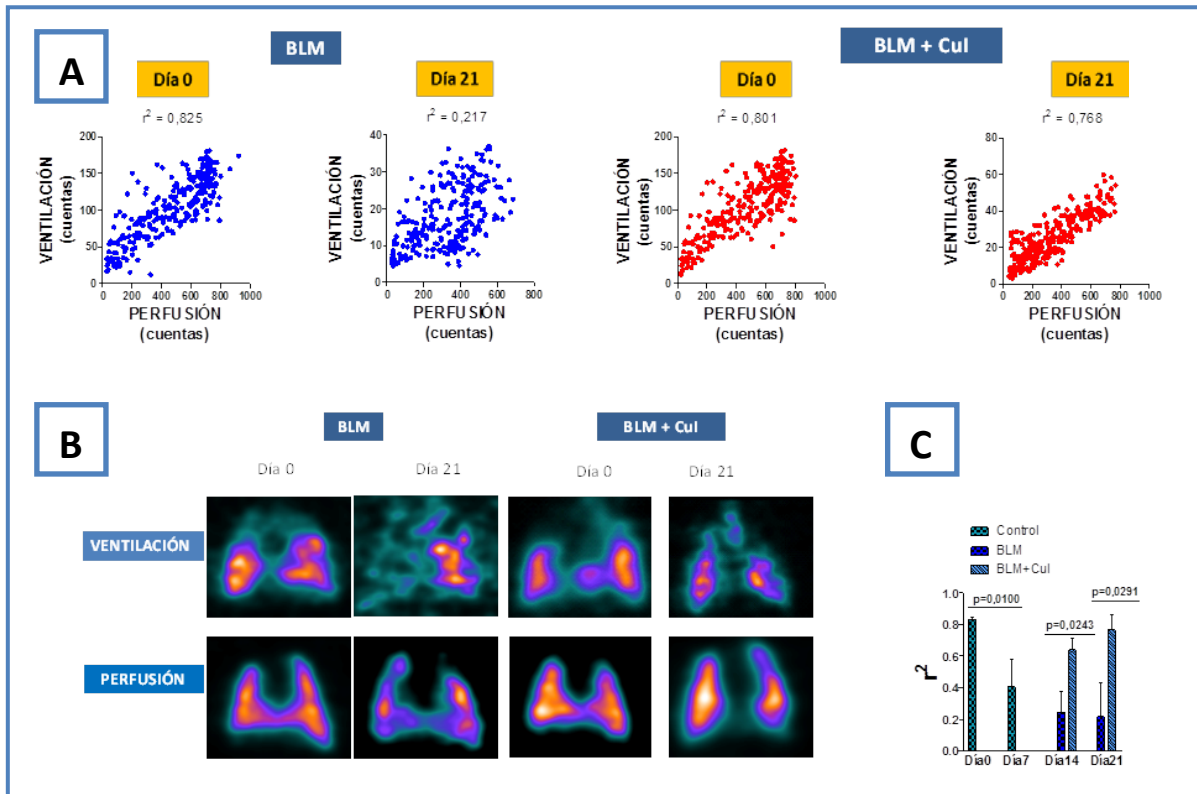


Figura 40: El ratio de ventilación/perfusión mejora con la administración de Cul 1mg/kg/día. El día previo a la administración vía intravenosa de MAA-Tc^{99m}, n=4 ratas del grupo BLM y n=4 del grupo BLM+Cul fueron sometidos a ensayos de ventilación pulmonar. La ventilación se realizó mediante la incorporación de aproximadamente 8mCi de DTPA-Tc^{99m} vía inhalada en sujetos previamente anestesiados con ketamina/medetomidina. El DTPA-Tc^{99m} se administró siguiendo el protocolo de 10 segundos de nebulización y 1 minuto de incorporación y así sucesivamente durante 15-20 minutos. El análisis de los datos se realizó mediante la cuantificación de las imágenes; para ello se identificó previamente un plano representativo de la captación pulmonar para cada sujeto. El mismo plano se identificó en la imagen de ventilación y perfusión a día 0 y a día 21. A dichos planos se les aplicó una cuadrícula de 1x1mm². Se cuantificó una región de 16x16mm² para cada pulmón para las imágenes de ventilación y las de perfusión a día 0 y día 21.

A) Representación de las cuentas de ventilación vs. perfusión a día 0 y día 21 en el grupo BLM y BLM+Cul. La correlación de los datos se obtiene mediante el coeficiente de correlación de Spearman (r).

B) Imágenes representativas de la inhalación de DTPA-Tc^{99m} y la perfusión de MAA-Tc^{99m} en los grupos de BLM y BLM+Cul a día 0 y día 21.

C) Representación del coeficiente de correlación de Spearman a día 0, 7, 14 y 21. (Los valores de p son significativos cuando $p < 0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

4.1.3.6 Histología

I. **La administración intraperitoneal de Cul 1mg/kg/día reduce de áreas fibróticas, el remodelado vascular y la hipertrofia del ventrículo derecho.**

La arquitectura pulmonar de los distintos grupos experimentales puede observarse en la tinción de hematoxilina-eosina de los cortes histológicos de pulmón. El grupo control nos permite identificar un parénquima pulmonar sano, vías respiratorias sin deteriorar y vasos sanguíneos de lumen y espesor habitual en ausencia de enfermedad. En el grupo de FPI inducida con BLM se observa un predominio del tejido fibrótico así como un engrosamiento de las paredes de las arterias adyacentes a los bronquios. El grupo tratado farmacológicamente presenta una disminución de las áreas fibróticas tal y como se puede observar en la figura 41A.

El engrosamiento de las paredes de los vasos es revertido con la administración de Cul 1mg/kg/día. Esto se ve reflejado en la figura 41B que presenta el engrosamiento de las paredes arteriales. Tal y como se ha descrito con anterioridad, la medida del espesor arterial se realizó mediante el cociente del área de la pared entre el perímetro externo del vaso [155]. En la gráfica puede observarse como las paredes arteriales del grupo que presenta la enfermedad duplican el espesor de las paredes arteriales del grupo control. Dicho engrosamiento de la pared arterial es revertido en un 59,22% en el grupo con tratamiento.

La figura 41C es representativa del cor pulmonale que frecuentan los pacientes de fibrosis pulmonar como consecuencia del aumento de la presión pulmonar producido por el engrosamiento de las paredes arteriales. La hipertrofia del ventrículo derecho es indicativa de este aumento de presión de los vasos pulmonares. Para ello se calculó el ratio del peso del ventrículo derecho frente al peso del ventrículo izquierdo y septo. En el grupo de fibrosis aumentó la hipertrofia del ventrículo derecho en un 165,74%, el cual fue

4. RESULTADOS

revertido en un 45,6% mediante la administración intraperitoneal de Cul 1mg/kg/día vía intraperitoneal.

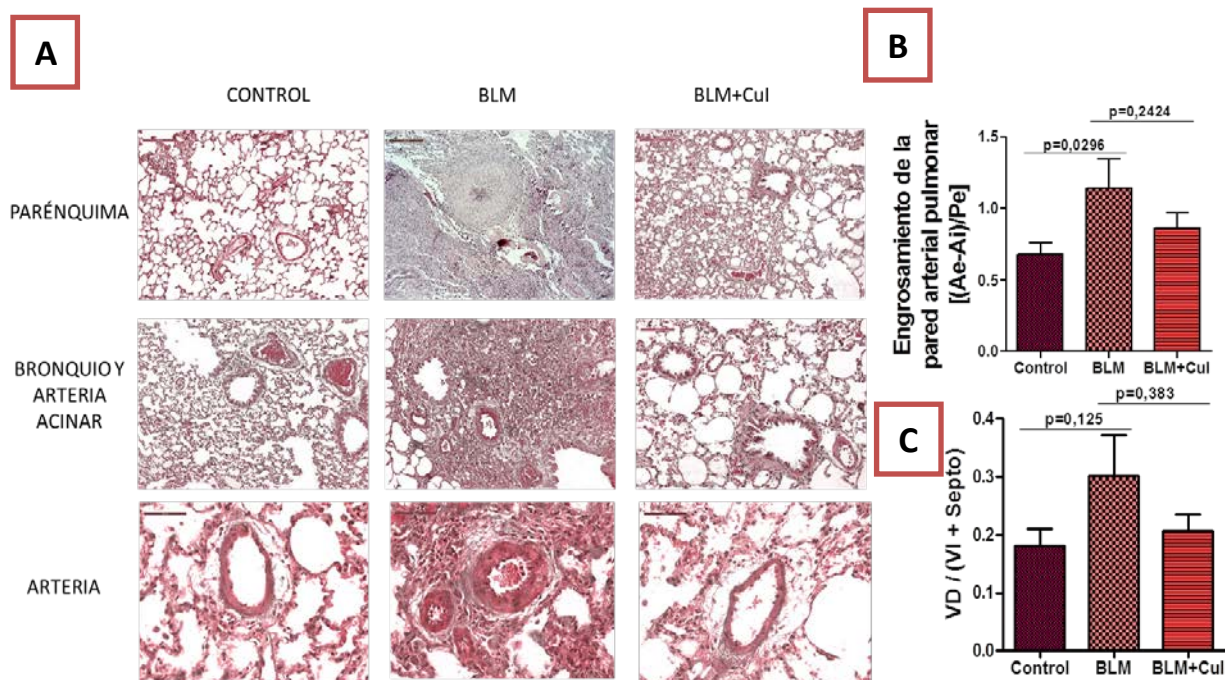


Figura 41: El tratamiento con Cul 1mg/kg/día mejora la histología de tejido pulmonar revirtiendo las áreas fibróticas, la hipertrofia del ventrículo derecho y la cuantificación del remodelado vascular.

El modelo curativo consta de tres grupos experimentales: Control (n=5), BLM (n=7) y BLM+Cul (n=7). La FPI fue inducida a día 0 mediante la administración intratraqueal de Bleomicina 3,75UI o salino en el grupo control. A los siete días de inducción de FPI se administró Cul 1mg/kg/día vía intraperitoneal en ratas del grupo BLM+Cul, y la misma cantidad de vehículo en el grupo Control y BLM.

A) Tinción hematoxilina-eosina: representación del parénquima pulmonar (imagen 5x), bronquios y arterias acinares (imagen 20x), y arterias (imagen 40x), de los grupos control, BLM y BLM+Cul.

B) Engrosamiento de la pared arterial pulmonar de los grupos control, BLM y BLM+Cul. Se midieron 20 arterias acinares en imágenes capturadas a 20x de los distintos grupos experimentales. El engrosamiento de la pared arterial se calculó mediante el cociente del área de la pared arterial y el perímetro externo.

C) La hipertrofia del ventrículo derecho se calculó en los grupos control (n=6), BLM (n=6) y BLM+Cul (n=6) mediante el cociente entre el ventrículo derecho y la suma del ventrículo izquierdo y el septo.

(Los valores de p son significativos cuando $p < 0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

II. El tratamiento farmacológico con Cul 1mg/kg/día reduce los depósitos de colágeno y el valor de Ashcroft del modelo curativo.

Las fibras de colágeno tipo I del tejido pulmonar se tiñen de color azul oscuro al someter los cortes histológicos a la tinción de masson tricrómico. La figura 42A muestra la disposición habitual del colágeno. En ausencia de enfermedad, el colágeno se localiza en las paredes de los vasos sanguíneos y de las paredes aéreas. En el modelo de fibrosis pulmonar inducida con bleomicina, el colágeno se observa además de en las paredes de los vasos, en las áreas fibróticas del parénquima pulmonar que predominan en la arquitectura pulmonar de las preparaciones. En las imágenes se aprecia también un engrosamiento muy marcado de las paredes arteriales que se ve revertido al tratar la fibrosis pulmonar con Cul. El tratamiento farmacológico reduce el depósito de colágeno tipo I, volviendo a una distribución en el tejido pulmonar similar al grupo control. El colágeno se marca principalmente en las paredes de los vasos y bronquios y cesa su marcaje en el parénquima pulmonar.

De nuevo, empleamos la puntuación de Ashcroft mediante una escala de 0 (tejido pulmonar sano) a 8 (invasión total del tejido fibrótico) para evaluar la severidad del grado de fibrosis pulmonar [156]. 10 imágenes representativas de cada grupo experimental fueron analizadas por un individuo ajeno al procedimiento experimental. La figura 42B representa la cuantificación de fibrosis observada en las preparaciones histológicas. El grupo inducido con BLM manifiesta un grado severo de FPI, mientras que el grupo tratado con Cul presenta un estadio de fibrosis equivalente a un grado 2-3 de escala Ashcroft que implica un engrosamiento moderado de las paredes sin daño notable de la arquitectura pulmonar.

4. RESULTADOS

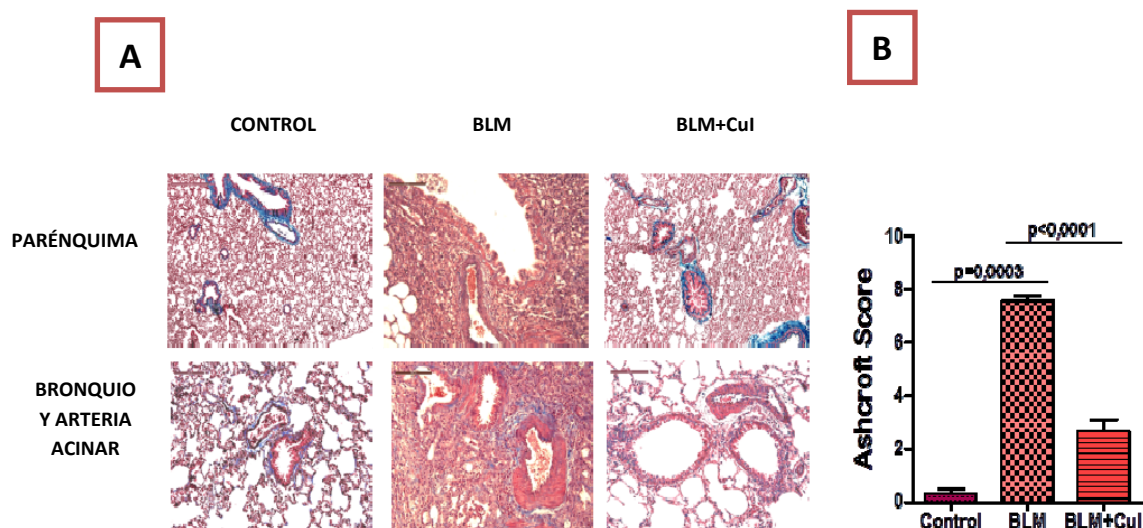


Figura 42. La administración de Cul 1mg/kg/día revierte la sobreexpresión de colágeno y disminuye el grado de fibrosis pulmonar observado en cortes histológicos teñidos con masson tricrómico.

El modelo curativo consta de tres grupos experimentales: Control (n=5), BLM (n=7) y BLM+Cul (n=7). La FPI fue inducida a día 0 mediante la administración intratraqueal de Bleomicina 3,75UI o salino en el grupo control. A los siete días de inducción de FPI se administró Cul 1mg/kg/día vía intraperitoneal en ratas del grupo BLM+Cul, y la misma cantidad de vehículo en el grupo Control y BLM.

A) Tinción de masson tricrómico: representación del parénquima pulmonar (imagen 5x), y bronquios y arterias acinares (imagen 20x) de los grupos control, BLM y BLM+Cul. La tinción de masson tricrómico marca los depósitos de colágeno de color azul. B) Ashcroft score. 10 imágenes aleatorias de cada grupo experimental fueron evaluadas por un ojo ciego, siguiendo los criterios establecidos en la escala de Ashcroft de 0 a 8. (Los valores de p son significativos cuando $p < 0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

4.1.3.7 La administración intraperitoneal de Cul 1mg/kg/día en el modelo curativo reduce la expresión proteica, expresión génica de COL1A, ET-1, CTGF y TGF- β 1, marcadores implicados en la formación y progresión de FPI.

Los marcadores génicos y proteicos implicados en los procesos fibróticos y remodelado vascular en el pulmón fueron determinados tras administrar cucurbitacina una semana después de inducir la enfermedad. El Col1A, ET-1, TGF- β 1 y CTGF son algunos de los marcadores implicados cuyos resultados se expresan en la figura a continuación.

Col1A se encuentra sobreexpresado tanto a nivel génico como proteico en el grupo de fibrosis pulmonar. A nivel proteico los niveles de Col1A aumentan 1,25 veces frente al grupo control mientras que el grupo BLM+Cul consigue reducir la expresión proteica por debajo de los niveles del control. Estos resultados se correlacionan con la expresión génica, que aumenta 1,75 veces en el grupo sin tratamiento y es revertido 1,34 veces al administrar el fármaco ensayado. La figura 43C confirma los resultados obtenidos. En ella se muestran cortes inmunohistoquímicos de Col1A para cada grupo experimental. En la figura control se aprecian regiones marcadas ligeramente con Col1A alrededor de los vasos y los bronquios. El grupo de BLM evidencia los depósitos de colágeno con un marcaje intenso en las áreas fibróticas y en la túnica íntima de los vasos y del epitelio bronquial. El grupo tratado durante 14 días con Cul 1mg/kg/día, reduce las áreas fibróticas del parénquima pulmonar disminuyendo a su vez la cantidad de depósito de colágeno. Las áreas fibróticas continúan estando marcadas con colágeno pero presentan una distribución más escasa que el grupo sin tratamiento.

Los niveles proteicos de ET-1, TGF- β 1 y CTGF se vieron sobreexpresados en el grupo de fibrosis 1,44 2,98 y 1,95 veces respectivamente. El modelo curativo de FPI en el cual se administró el fármaco ensayado durante 14 días revirtió los niveles de sobreexpresión proteica en un 190,31%, 42,51% y 63,84% respectivamente tal y como se muestra la figura 43A. La figura 43B correlaciona los resultados de expresión génica con los resultados de expresión proteica. La expresión génica de ET-1 y CTGF y TGF- β 1 aumenta respectivamente 178,84%, 225,54% y 429,64% veces en el grupo de BLM. El tratamiento con Cul reduce los niveles de sobreexpresión en un 102,87% para la ET-1, en un 97,68% los niveles de CTGF y reduce un 114,89% la sobreexpresión génica de TGF- β 1.

4. RESULTADOS

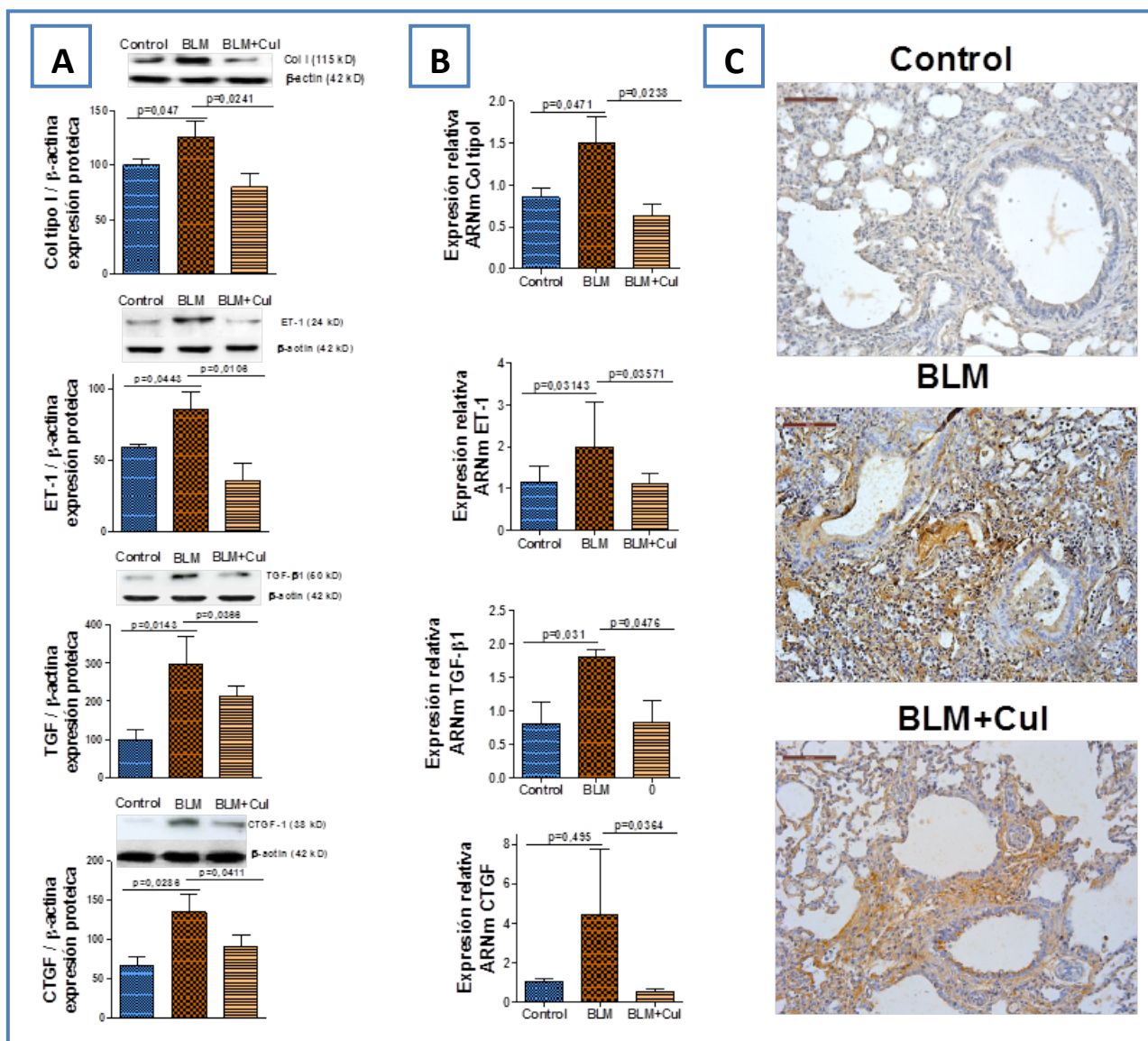


Figura 43: La administración intraperitoneal de Cul 1mg/jg/día en el modelo curativo reduce la expresión proteica, expresión génica e inmunohistoquímica de COL1A, ET-1, TGF- β 1 y CTGF; marcadores implicados en la formación y progresión de FPI.

El modelo curativo consta de tres grupos experimentales: Control (n=5), BLM (n=7) y BLM+Cul (n=7). La FPI fue inducida a día 0 mediante la administración intratraqueal de Bleomicina 3,75UI o salino en el grupo control. A los siete días de inducción de FPI se administró Cul 1mg/kg/día vía intraperitoneal en ratas del grupo BLM+Cul, y la misma cantidad de vehículo en el grupo Control y BLM. A) Expresión proteica de marcadores de fibrosis pulmonar COL-1, ET-1, TGF- β 1 y CTGF en sujetos control (n=4), BLM (n=4) y BLM+Cul (n=4). Se muestran las imágenes representativas del western blott. B) Expresión de ARNm en homogenado de tejido pulmonar de Col-1, ET-1, TGF- β 1 y CTGF en grupos control (n=6), BLM (n=6) y BLM+Cul (n=6). Los datos se expresan como el ratio a GAPDH para los niveles de ARNm y a β -actina para los niveles de proteína, normalizados al grupo control. Los resultados se expresan como la media (error estándar) de n=6 sujetos por condición. C) Secciones de cortes histológicos en sujetos control, BLM y BLM+Cul fueron inmunomarcados para COL-1 (marrón). Se muestran imágenes representativas (escala 100 μ m).

(Los valores de p son significativos cuando $p < 0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

4.1.3.8 La expresión proteica e inmunohistoquímica de P-JAK2 y P-STAT3, posibles marcadores implicados en la formación y progresión de FPI, son inhibidos mediante la administración intraperitoneal de Cul 1mg/kg/día.

La determinación proteica de P-STAT3, P-SMAD3 y P-JAK2, marcadores implicados en diversas rutas de activación de fibroblastos fue acompañada de tinciones inmunohistoquímicas para los mismos marcadores.

Los resultados de los western blott se muestran en la figura 44A. La expresión de las proteínas estudiadas en su forma fosforilada fueron normalizadas frente a la expresión proteica de la proteína sin fosforilar. P-STAT3, P-SMAD3 y P-JAK2 se encuentra aumentadas 1,9, 1,52 y 1,75 veces respectivamente en el grupo de BLM frente al grupo control. El tratamiento con Cul 1mg/kg/día vía intraperitoneal a los 7 días de inducir la enfermedad, consigue reestablecer los valores, reduciendo los ratios de expresión proteica en un 71,02%, 86,6% y 79,47% respectivamente. Los resultados obtenidos presentan significación estadística.

Las imágenes representativas de las tinciones inmunohistoquímicas representadas en la figura 44B están en concordancia con la expresión proteica. En ellas se aprecia como las áreas fibróticas del grupo de BLM tienen un mayor depósito de P-JAK2 y P-STAT3 que el grupo BLM+Cul. Los depósitos de las formas fosforiladas en las imágenes del grupo de BLM presentan una distribución en las regiones fibróticas del parénquima pulmonar, en el epitelio del bronquio y en músculo liso bronquial. En los cortes histológicos del grupo tratado farmacológicamente se aprecian regiones de marcaje de P-JAK2 y P-STAT3 aunque en menor cantidad e intensidad que el grupo sin tratamiento. Sin embargo la expresión de STAT3 se vio aumentada en las preparaciones control y BLM+Cul frente al grupo de BLM.

4. RESULTADOS

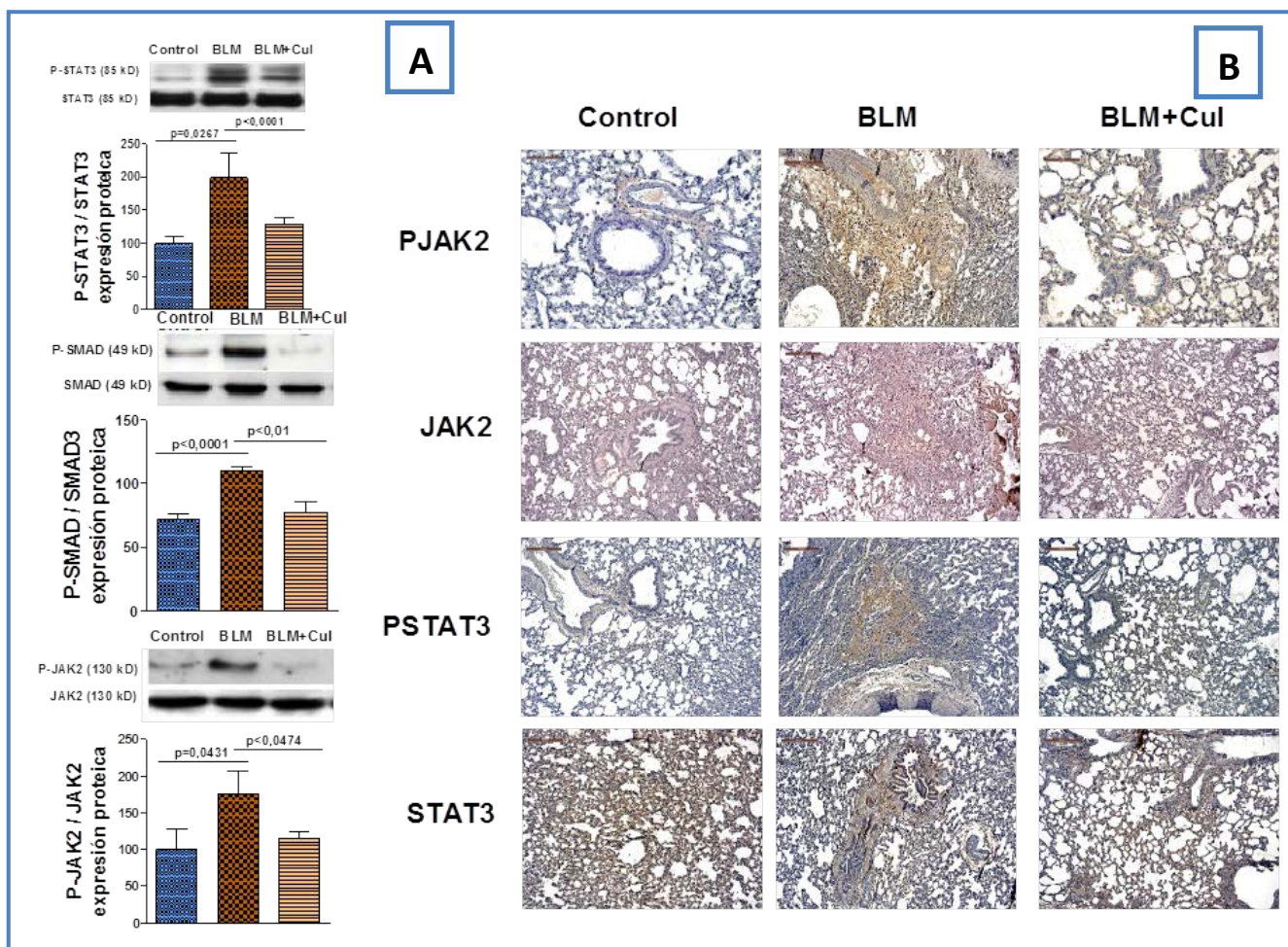


Figura 44: La administración intravenosa de Cul 1mg/kg/día reduce la expresión proteica, e inmunohistoquímica de P-JAK2 y P-STAT3, posibles marcadores implicados en la formación y progresión de FPI.

El modelo curativo consta de tres grupos experimentales: Control (n=5), BLM (n=7) y BLM+Cul (n=7). La FPI fue inducida a día 0 mediante la administración intratraqueal de Bleomicina 3,75UI o salino en el grupo control. A los siete días de inducción de FPI se administró Cul 1mg/kg/día vía intraperitoneal en ratas del grupo BLM+Cul, y la misma cantidad de vehículo en el grupo Control y BLM.

A) Expresión proteica de marcadores de fibrosis pulmonar P-STAT3, P-SMAD3 y P-JAK2, en sujetos control (n=4), BLM (n=4) y BLM+Cul (n=4). Cada gráfica va acompañada de su β -actina. Los datos se expresan como el ratio de proteína en su forma no fosforilada, normalizados al grupo control. Los resultados se expresan como la media (error estándar) de n=4 sujetos por condición. Se muestran las imágenes representativas del western blott.

B) Secciones de cortes histológicos en sujetos control, BLM y BLM+Cul fueron inmunomarcados para JAK2, P-JAK2, STAT3, y P-STAT3 (marrón). Se muestran imágenes representativas (escala 100 μm).

(Los valores de p son significativos cuando $p<0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

4.1.3.9 En el modelo curativo la sobreexpresión de IL-6 e IL-13 es inhibida mediante la administración intraperitoneal de Cul 1mg/kg/día.

Cuando se produce una lesión en el tejido pulmonar, determinadas interleuquinas que median en la respuesta inflamatoria son liberadas al medio extracelular. Las interleuquinas IL-6 e IL-13 participan en la respuesta inflamatoria que se produce como consecuencia de la lesión fibrótica pulmonar. Su concentración se determinó tanto en LBA como en homogenado de tejido pulmonar.

La concentración del IL-6 en LBA se vio incrementada 2,18 veces en el grupo BLM frente al grupo control y fue revertido en un 76,67% en el grupo tratado con Cul 1mg/kg/día con un p valor significativo. Los niveles de IL-6 en homogenado de tejido pulmonar presentaron la misma tendencia que el LBA, aumetando en un 131,25% en ausencia de tratamiento y revirtiendo en un 83,15% en grupo BLM+Cul.

El grupo experimental de FPI inducido por la administración intratraqueal de BLM en ausencia de tratamiento, aumentó la concentración de IL-13 1,65 veces en LBA y 1,5 veces en homogenado de tejido pulmonar frente al grupo control. Estos valores fueron reducidos en un 79,10% y 63,34% respectivamente, presentando los valores significación estadística.

4. RESULTADOS

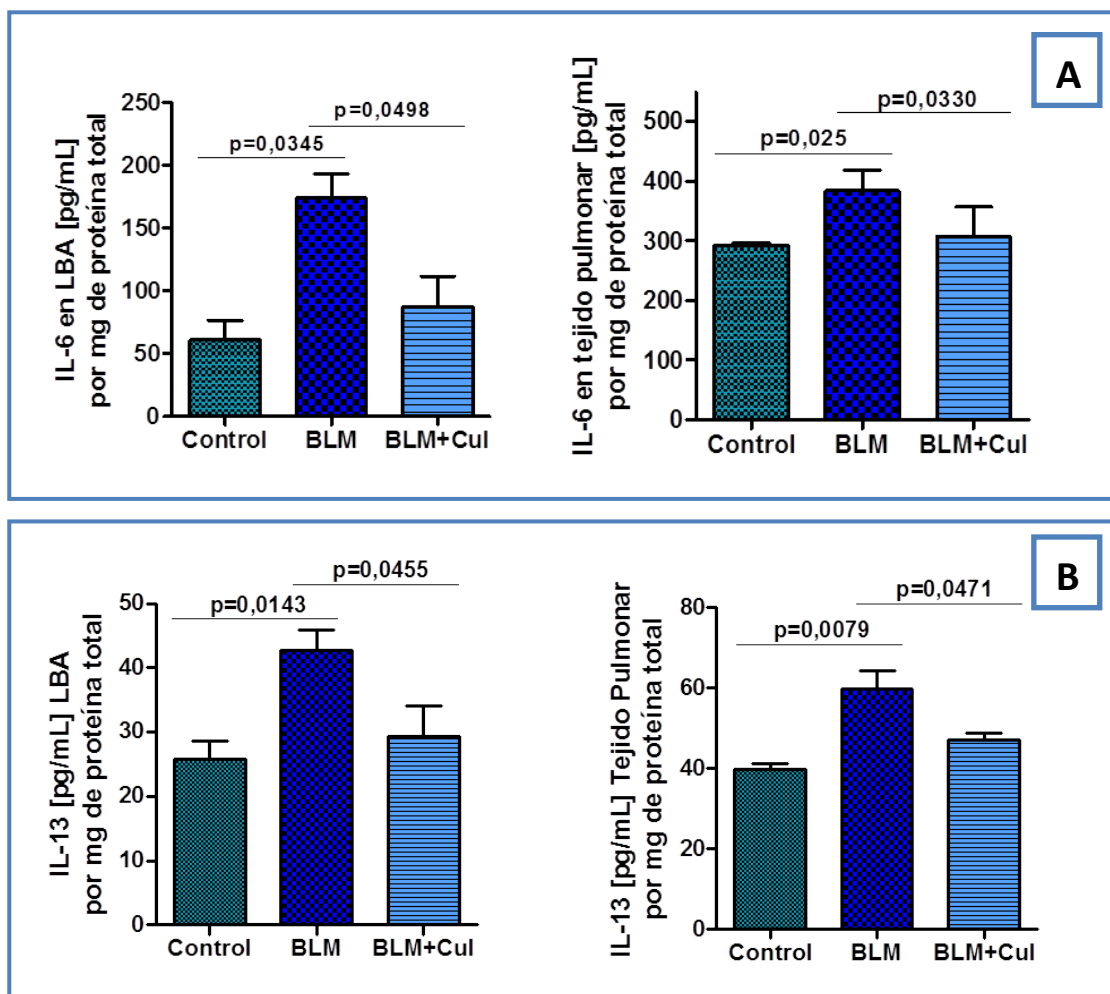


Figura 45: El tratamiento curativo con Cul 1mg/kg/día revierte la liberación de IL-6 e IL-13 en LBA y tejido pulmonar estimulada por la inducción de fibrosis.

El modelo curativo consta de tres grupos experimentales: Control (n=5), BLM (n=7) y BLM+Cul (n=7). La FPI fue inducida a día 0 mediante la administración intratraqueal de Bleomicina 3,75UI o salino en el grupo control. A los siete días de inducción de FPI se administró Cul 1mg/kg/día vía intraperitoneal en ratas del grupo BLM+Cul, y la misma cantidad de vehículo en el grupo Control y BLM.

A) concentración de IL-6 en pg/mL por mg de proteína total, en alícuota de LBA y homogenado de tejido pulmonar para los sujetos experimentales del grupo control (n=6), BLM (n=6) y BLM+Cul (n=6)

B) Concentración de IL-13 en pg/mL por mg de proteína total, en alícuota de LBA y homogenado de tejido pulmonar del grupo control (n=6), BLM (n=6) y BLM+Cul (n=6).

(Los valores de p son significativos cuando $p < 0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney.

4.1.3.10 Determinación de los niveles de tropocolágeno III (PIIINP) en LBA como marcador molecular de Fibrosis Pulmonar. La Cul 1mg/kg/día inhibe los niveles de PIIINP liberados al medio extracelular.

Los resultados de la determinación de procolágeno III en el modelo curativo van en consonancia con los obtenidos en el modelo anterior. Los niveles de tropocolágeno III, precursor del colágeno III, se expresan únicamente en las ratas inducidas con la enfermedad mientras que sus niveles son despreciables por la técnica de RIA en los grupos control y BLM+Cul. La figura 46 muestra los resultados de la cuantificación de los niveles de tropocolágeno III en los distintos grupos experimentales. Esta diferencia estadísticamente significativa destaca la relevancia de la presencia de tropocolágeno III en LBA como marcador de FPI.

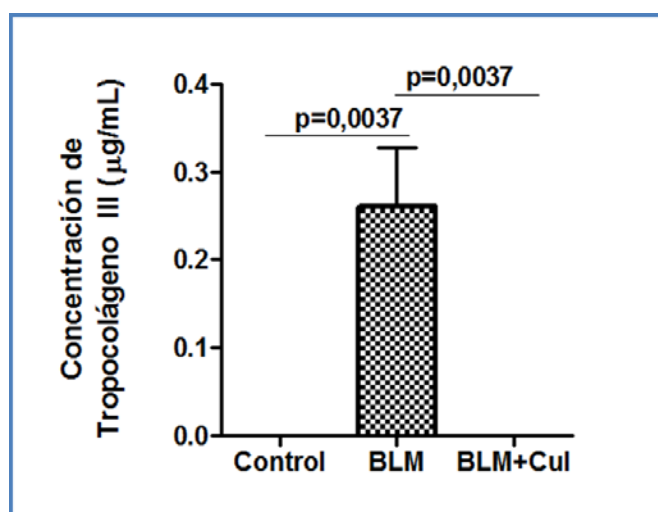


Figura 46. El tropocolágeno III aumenta sus niveles de expresión en LBA del grupo FPI confirmándose su utilidad como marcador de diagnóstico de FP. El modelo curativo consta de tres grupos experimentales: Control (n=5), BLM (n=7) y BLM+Cul (n=7). La FPI fue inducida a día 0 mediante la administración intratraqueal de Bleomicina 3,75UI o salino en el grupo control. A los siete días de inducción de FPI se administró Cul 1mg/kg/día vía intraperitoneal en ratas del grupo BLM+Cul, y la misma cantidad de vehículo en el grupo Control y BLM.

Se determinaron los niveles de tropocolágeno III en alícuotas de LBA del grupo control (n=4), BLM (n=4) y BLM+Cul (n=4). La técnica de RIA únicamente detectó concentración de tropocolágeno III en el grupo de BLM, careciendo de expresión los grupos control y BLM+Cul. Los valores de p son significativos cuando $p < 0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney.

4. RESULTADOS

4.2 RESULTADOS ESTUDIO II: EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE JAK2 Y STAT3 EN TEJIDO DE PACIENTES CON FIBROSIS PULMONAR E HIPERTENSIÓN PULMONAR.

El estudio de la expresión y distribución de JAK2/STAT3 en tejido pulmonar humano nos permite constatar si existe una analogía entre la expresión de dichos marcadores en humano frente al modelo de enfermedad animal estudiado en el presente trabajo. Para ello se estudió la expresión y distribución de JAK2 y STAT3 tanto sus formas activas como inactivas, en secciones histológicas de parénquima pulmonar humano de pacientes sanos, pacientes FPI y pacientes FPI + HP.

A continuación se presentan los resultados de las inmunotinciones con anticuerpos dirigidos a JAK2 y STAT3 en sus formas activas e inactivas obtenidas en el estudio de la expresión y distribución de JAK2/STAT3 en parénquima pulmonar humano.

La figura 47 muestra imágenes de secciones histológicas de tejido pulmonar de pacientes sanos inmunoteñidas con anticuerpos dirigidos a JAK2 en su forma activa (p-JAK2) y en su forma inactiva (JAK2). La figura 48 muestra de nuevo la expresión de ambas proteínas, pero en este caso en secciones histológicas de tejido pulmonar humano de pacientes FPI y FPI + HP.

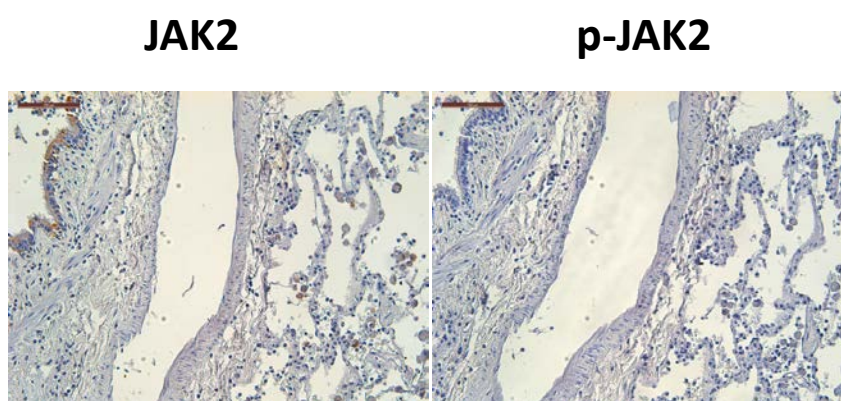


Figura 47: Expresión de JAK2 y pJAK2 en tejido pulmonar de pacientes sanos.

Imágenes de secciones histológicas representativas de tejido pulmonar humano de pacientes sanos. Estas secciones fueron inmunoteñidas con anticuerpos anti-JAK2 y anti-p-JAK2. El tejido fue contrateñido con hematoxilina (estructuras de color azul). La barra de escala corresponde a 50 μ m.

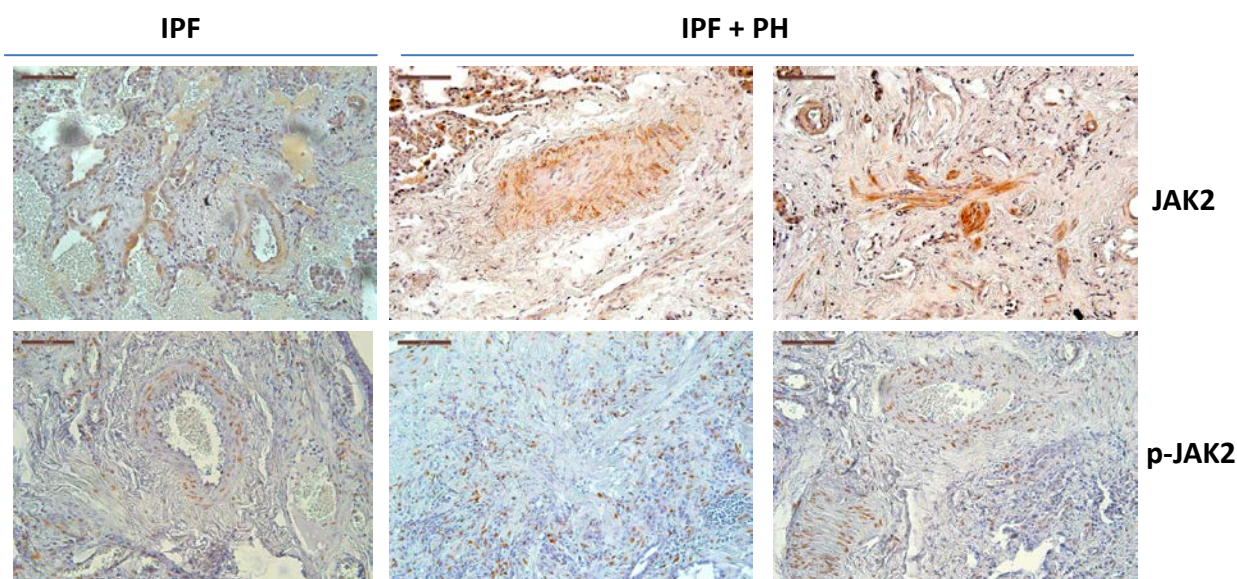


Figura 48: Expresión de JAK2 y pJAK2 en tejido pulmonar de pacientes de Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) y pacientes de FPI con Hipertensión pulmonar asociada (FPI + HP).

Imágenes de secciones histológicas representativas de tejido pulmonar humano de pacientes FPI y FPI + HP. Estas secciones fueron inmunoteñidas con anticuerpos anti-JAK2 y anti-p-JAK2. El tejido fue contrateñido con hematoxilina (estructuras de color azul). La barra de escala corresponde a 50 μ m.

En correlación con los resultados obtenidos en el modelo animal, tal y como hemos venido observando hasta ahora, la figura 47 en representación del parénquima pulmonar de pacientes sano, existe una expresión nula de p-JAK2 a nivel pulmonar. Por el contrario, sí que puede observarse cierta expresión de la forma inactiva de JAK2 a nivel de epitelio bronquial.

En pacientes FPI como de pacientes con FPI e HP asociada (figura 48) se observó una expresión positiva de JAK2 mediante una distribución marcada principalmente a lo largo del citoplasma celular, al contrario que en tejido sano en que su distribución queda restringida al epitelio bronquial. A diferencia de los sujetos FPI, en pacientes con FPI asociada a HP, la expresión de JAK2 se vio incrementada principalmente en células alveolares metaplásicas, células del músculo liso de arteria pulmonar, así como en los focos fibróticos y en los miofibroblastos de arterias totalmente remodeladas y sin luz.

4. RESULTADOS

No se observó expresión de P-JAK2 en tejido pulmonar de sujetos controles. En pacientes con FPI y FPI + HP el patrón de expresión fue muy similar al de JAK2, sin embargo la distribución celular se encontró focalizada en el núcleo.

La expresión de STAT3 se encuentra representada en la figura 49 en la que se muestran imágenes de secciones histológicas de tejido pulmonar de pacientes sanos inmunoteñidas con anticuerpos dirigidos a STAT3 en su forma inactiva (STAT3) y en su forma activa (p-STAT3). Así pues, en la figura 50 se muestra la expresión de ambas proteínas, pero en este caso en secciones histológicas de tejido pulmonar de pacientes FPI y FPI + HP.

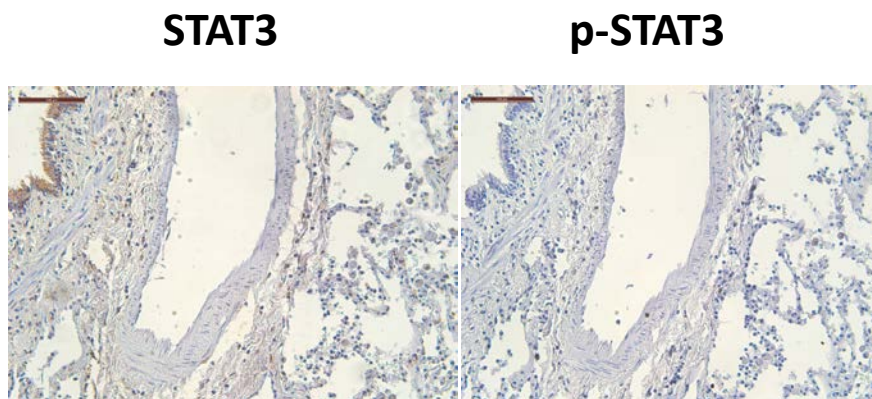


Figura 49: Expresión de STAT3 y p-STAT3 en tejido pulmonar de pacientes sanos.

Imágenes de secciones histológicas representativas de tejido pulmonar humano de pacientes sanos. Estas secciones fueron inmunoteñidas con anticuerpos anti-STAT3 y anti-p-STAT3. El tejido fue contrateñido con hematoxilina (estructuras de color azul). La barra de escala corresponde a 50 μ m.

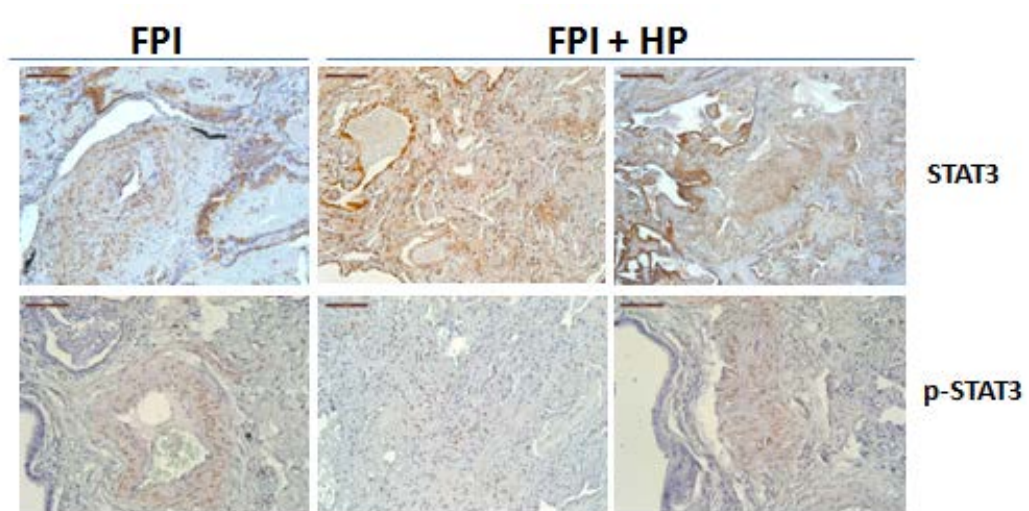


Figura 50: Expresión de STAT3 y p-STAT3 en tejido pulmonar de pacientes de Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) y pacientes de FPI con Hipertensión pulmonar asociada (FPI + HP).

Imágenes de secciones histológicas representativas de tejido pulmonar humano de pacientes FPI y FPI + HP. Estas secciones fueron inmunoteñidas con anticuerpos anti-STAT3 y anti-p-STAT3. El tejido fue contrateñido con hematoxilina (estructuras de color azul). La barra de escala corresponde a 50 μ m.

En la figura 49 se puede observar como en el caso de tejido pulmonar de pacientes sanos, de igual modo que ocurría en el caso de JAK2, lo cual es lógico teniendo en cuenta que JAK2 actúa en un paso previo a STAT3 en la ruta de transducción de señal, puede observarse una expresión nula a nivel pulmonar de la forma fosforilada de STAT3 (p-STAT3), es decir, de la forma activa de STAT3. Por el contrario, sí que pudieron observarse ciertos niveles de expresión de la forma inactiva de STAT3 a nivel de epitelio bronquial principalmente. Para el caso de pacientes FPI y FPI con HP asociada, en la figura 50 se puede observar cómo, de igual modo que ocurría en el caso de JAK2, se muestran niveles elevados de expresión de la forma activa con respecto al caso de tejido de pacientes sanos (figura 49). Cabe destacar los elevados niveles de expresión de p-STAT3 observados en los focos fibróticos, algo ya observado previamente por Pechkovsky *et al.* en 2012 .

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN:

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran la implicación de la ruta JAK2/STAT3 en el desarrollo y progresión de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. La fibrosis pulmonar es una enfermedad de afectación pulmonar crónica que se caracteriza por un cúmulo de matriz extracelular y un remodelado de la arquitectura bronquial. La administración de Cul, molécula inhibidora de la ruta JAK2/STAT3, consigue revertir las alteraciones anatomopatológicas características de la fibrosis pulmonar.

La FPI se inicia como consecuencia del desequilibrio entre la proliferación y la apoptosis de fibroblastos, así como la acumulación y desintegración de matriz extracelular. Dicho desequilibrio se produce como consecuencia de una lesión celular descontrolada, que deriva en una liberación de citoquinas y factores de crecimiento que generan la activación de células epiteliales, endoteliales, fibroblastos/miofibroblastos y leucocitos. Los fibroblastos se diferencian a miofibroblastos y conducen a una lesión de células epiteliales alveolares. Las células alveolares tipo I son sustituidas por células alveolares tipo II hiperplásicas o células bronquiales cuboidales. Una vez desencadenada la lesión celular, el espacio alveolar es invadido por una acumulación de exudado vascular y de células inflamatorias. Los miofibroblastos se aglomeran formando focos fibróticos, el colágeno se deposita formando una matriz de tejido conectivo y la fibrosis queda instaurada en el parénquima pulmonar. La presente tesis doctoral evidencia que tanto a nivel curativo como preventivo, la administración de Cul 1mg/kg/día es capaz de revertir el desequilibrio homeostático producido en la FPI inducida con bleomicina.

En el presente trabajo se determinaron los niveles de células inflamatorias y de citoquinas que participan en la formación de los procesos fibróticos. La inhibición de la ruta celular JAK2/STAT3 disminuye la concentración de las células inflamatorias y de IL-6 e IL-13 (interleuquinas profibróticas que participan en procesos de reclutamiento de fibroblastos macrófagos y miofibroblastos) tanto en tejido pulmonar como en LBA. Se determinaron también la expresión génica y proteica de marcadores implicados en el desarrollo de fibrosis pulmonar, Col1A, ET1, TGF- β 1 y CTGF, cuya expresión se redujo hasta valores control. Estos resultados van en consonancia

5. DISCUSIÓN

con la disminución de la expresión inmunológica de P-JAK2, P-STAT3 y P-SMAD3 en tejido pulmonar. A nivel histológico, la Cul reduce las áreas fibróticas, la expresión de Col1A en la adventicia arterial y mantiene el grosor de las paredes arteriales similares a los sujetos sanos. A nivel funcional, la inhibición de la ruta JAK2/STAT3 previene el desacoplamiento de la ventilación/perfusión evitando el desarrollo de hipertrofia del ventrículo derecho del corazón y reduciendo las zonas arteriales pulmonares lesionadas incapaces de establecer el intercambio gaseoso.

El modelo experimental de inducción de fibrosis con bleomicina, es un modelo ampliamente estandarizado, avalado por numerosos trabajos científicos como el modelo óptimo de traslación de la enfermedad de afectación humana a un modelo animal [152, 157]. El modelo de bleomicina pone de manifiesto las múltiples vías moleculares implicadas en los cambios fisiopatológicos pulmonares de manera consistente a lo que sucede en pacientes con FPI. Estudios comparativos del modelo murino frente a pacientes que sufren la enfermedad han permitido establecer la correlación de los procesos moleculares implicados en ambos grupos, y del mismo modo identificar las debilidades del mismo [152].

La enfermedad inducida mediante la instilación intratraqueal de bleomicina comienza mediante una primera fase inflamatoria que presenta su pico máximo de inflamación a los 7 días. A continuación se desencadena una fase fibrótica activa que alcanza la meseta los 14 días para posteriormente entrar en la fase fibrótica tardía (día 21-35 post-instilación) [152]. La fase inflamatoria se caracteriza por una extravasación de neutrófilos en las vías aéreas así como un aumento de la expresión de los procesos inmunológicos en el tejido pulmonar. Pese a estar descrito que la presencia de neutrófilos en LBA puede correlacionarse con el desarrollo de la enfermedad [158], lo cierto es que esta primera fase inflamatoria no se traslada a los procesos moleculares desarrollados en humanos, por lo que abordar esta enfermedad desde el punto de vista inflamatorio está condenado al fracaso clínico [157]. Otra limitación que presenta el modelo empleado en la presente tesis doctoral, es la imposibilidad de reproducir la instauración progresiva de la enfermedad tal y como sucede en humanos. En murinos, el impacto que la fibrosis tiene sobre la

mecánica funcional pulmonar con el factor tiempo es mucho más limitado al estar ausente el proceso de deterioro progresivo característico de la FPI [159]. Una vez superado el talón de Aquiles del modelo de enfermedad inducida por bleomicina, se procederá a la discusión de las excelencias del mismo.

Estudios de asociación genética de genes implicados en pacientes con FPI frente a murinos inducidos con BLM, revelaron una mimetización en la expresión de genes en ambos grupos. En la primera fase fibrótica del modelo de FPI animal, se observó una sobreexpresión de genes asociados a los procesos celulares iniciales (MMPs, reguladores positivos de TGF- β , SMAD1-3 y genes asociados con la activación de macrófagos) mientras que en la fase de fibrosis tardía, se vieron sobreexpresados genes codificadores para colágeno, señalización Wnt y PI3K, implicados en la cicatrización y ablación del tejido pulmonar [152]. La sobreexpresión de los mismos genes citados está ampliamente descrita en pacientes con FPI [160-162].

En el modelo de FPI inducida por BLM destacan genes implicados en procesos mitóticos, probablemente asociados a la proliferación de las células mesenquimales, así como alteraciones en los genes implicados en las vías señalización asociadas a la proliferación y señalización de fibroblastos en respuesta a los cambios en la matriz extracelular. Estos resultados evidencian la existencia de distintos mecanismos funcionales implicados en el desarrollo de la FPI en humanos [2, 77, 163]. A nivel histológico la bleomicina induce inflamación, fibrosis y remodelado. Se produce una ablación del parénquima pulmonar, una lesión de la arquitectura alveolar e hiperplasia de las células alveolares tipo II. A nivel celular se produce una infiltración de neutrófilos en el LBA. La fibrosis inducida con bleomicina presenta un predominio intersticial con engrosamiento del septo alveolar.

A continuación, se procede a discutir los resultados obtenidos en el presente trabajo. La fisiopatología de la FPI comienza con una lesión pulmonar inicial originada por factores ambientales y susceptibilidad genética. Tal y como se ha descrito con anterioridad, dicha lesión, lejos de remitir y volver a condiciones homeostásicas, desencadena una fase inflamatoria en la que las células inflamatorias se extravasan al lugar de la lesión induciendo la activación de fibroblastos y factores de crecimiento. En pacientes con FPI, se observa un

5. DISCUSIÓN

incremento en la liberación de IL-6 por las células endoteliales pulmonares, siendo responsable de la inflamación persistente y los cambios fibróticos subsecuentes. En el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, se observa un pico inflamatorio a los 7 días de inducir la enfermedad. Estudios realizados con ratones silenciados genéticamente para IL-6 demostraron la implicación de IL-6 en la formación de los focos fibróticos en el parénquima pulmonar [164]. El presente estudio demuestra que la administración de Cul reduce la liberación de IL-6 tanto en LBA como en homogenado de tejido pulmonar.

El papel que desempeña la IL-13, citoquina inmunoreguladora pleiotrópica implicada en la patogénesis de la FPI, también ha sido estudiado en el presente trabajo. Estudios previos describen la IL-13 como potente inductor de la fibrosis pulmonar, encontrándose sobreexpresado en tejido pulmonar de pacientes que presentan la enfermedad. Dicha interleuquina se expresa en condiciones normales en LBA y ligeramente en tejido pulmonar. En pacientes que se sufren FPI se ha visto una sobreexpresión en el músculo liso, epitelio bronquial, macrófagos alveolares y endotelios y fibroblastos [165]. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran la sobreexpresión de IL-13 tanto a nivel de secreción de células inflamatorias en LBA, como en tejido pulmonar. Estudios previos han determinado que la expresión de IL-13, al igual que IL-4, están mediadas por la activación de factores de transcripción [166].

En la actualidad, existe un ensayo clínico en fase II que emplea Lebrikizumab, un inhibidor de IL-13, como posible tratamiento para pacientes con FPI.

La administración intraperitoneal de un inhibidor de JAK2/STAT3 en el modelo de FPI inducido con bleomicina revirtió los niveles de IL-13 hasta valores control. En base a estos resultados podemos determinar que la fosforilación de JAK2 en la FPI influye directamente en la liberación del IL-6 e IL13, citoquinas inductoras de la fibrogénesis. La inhibición de esta ruta disminuye la concentración de dichas citoquinas en pulmón.

Las citoquinas son ampliamente conocidas por sus múltiples respuestas celulares entre los que cabe destacar la proliferación celular, supervivencia e inmunomodulación. Por ello no sorprende que la desregulación de la expresión

de citoquinas y la consecuente inducción de múltiples vías de transducción de señal descendentes, sean comunes en alteraciones patológicas de carácter proliferativo [167]. La activación de la ruta JAK2/STAT3 es una de las señales celulares predominantes potenciada por la activación de las citoquinas. Estudios realizados en la última década muestran el uso de citoquinas para la modulación de la señal de receptores heterólogos implicados en la inmunidad innata, a través de las señales de transducción de STAT1 y STAT3 [167]. La inhibición de dicha ruta celular JAK2/STAT3 también ha presentado resultados altamente satisfactorios en enfermedades con alto componente inflamatorio como es la artritis reumatoide [168] o en la toxicidad hepática inducida [169].

La molécula JSI-124, también conocida como cucurbitacina I, es un inhibidor selectivo dual de la ruta JAK2/STAT3 implicada en la mejora de los procesos inflamatorios, anticancerígenos, angiogénicos y autofágicos [170-173]. Hasta la fecha, se ha descrito su efectividad como antiinflamatorio en un modelo de toxicidad hepática [173] y como antineoplásico [174-176]. En la actualidad se encuentra en un estudio en Fase II para cáncer de mama lo que evidencia su posibilidad como tratamiento farmacológico dada su seguridad y eficacia.

Los resultados obtenidos en el modelo de fibrosis pulmonar del presente trabajo evidencian el papel que desempeña la ruta JAK2/STAT3 en la sobreexpresión de citoquinas inflamatorias y profibróticas. La administración de 1mg/kg/día de JSI-124 reduce la concentración de interleuquinas liberadas tanto al medio extracelular como en el tejido pulmonar, reduciendo la inflamación y por tanto mejorando así la arquitectura pulmonar.

La presente tesis doctoral demuestra la gran utilidad de la técnica TCAR para el diagnóstico clínico de enfermedades pulmonares caracterizadas por la presencia de regiones hipocaptantes. En humanos, es capaz de diagnosticar FPI en un 80% de los casos en los que los rayos X determinaron ausencia de lesión pulmonar [177]. Esta técnica permite identificar patrones reticulares del parénquima pulmonar, con áreas de patrón de vidrio deslustrado, predominantes en pacientes con FPI, que cuando van acompañados de bronquiectasia pulmonar y afectación en panal de abeja, puede diagnosticarse

5. DISCUSIÓN

FPI sin necesidad de biopsia pulmonar. En el 3% de los casos de FPI se produce un tromboembolismo pulmonar agudo que pasa totalmente desapercibido en ausencia de la adquisición TCAR [178]. A su vez permite la identificación de microtrombos como regiones hipocapantes producidas por áreas adyacentes altamente inflamadas. No cabe duda que esta técnica no invasiva es notablemente eficaz en el diagnóstico y pronóstico de la FPI.

En los últimos años, la tecnología SPECT va cobrando fuerza en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la perfusión y ventilación pulmonar, tales como embolismo pulmonar, HP o FPI. El endotelio vascular pulmonar representa un área de superficie importante, responsable de numerosas funciones metabólicas con afectación sistémica. Muchas condiciones patológicas afectan, de forma directa o indirecta la circulación pulmonar. La obtención de imágenes moleculares hace posible un diagnóstico precoz único, permitiendo estudiar la distribución de la perfusión pulmonar y detectar las áreas de baja perfusión [179].

Los MAA marcados con Tc99m constituye el radiotrazador más empleado para medir la perfusión pulmonar. El DTPA-Tc^{99m}, radionúcleo en forma de aerosol, permite medir la permeabilidad de la membrana capilar alveolar y por tanto la ventilación pulmonar [180]. En la actualidad, los estudios de ventilación/perfusión se emplean en el diagnóstico de microembolismo pulmonar, aunque se está considerando su aplicación para el diagnóstico de enfermedades como Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), fallo cardíaco o neumonía [181]. El presente estudio demostró la aplicabilidad del ratio de ventilación/perfusión a ratas inducidas con FPI. Los resultados mostraron un claro desacoplamiento entre la ventilación y la perfusión de los sujetos enfermos tras 21 días de enfermedad, mientras que los sujetos sanos mantuvieron una correlación lineal a lo largo del procedimiento. Estos resultados proporcionan evidencia científica de la aplicabilidad de la técnica de SPECT al diagnóstico y seguimiento de la FPI en humanos.

Tal y como se ha descrito a lo largo de este trabajo, la fibrosis pulmonar se manifiesta histológicamente con un remodelado del tejido pulmonar. El modelo estudiado en este trabajo demuestra como dicho remodelado cursa con

una invasión del parénquima pulmonar por fibroblastos de origen diverso y matriz extracelular, sustituyendo el tejido pulmonar especializado por tejido conectivo. A su vez, se produce un remodelado de los vasos que irrigan las regiones fibróticas, el cual se traduce en un incremento en el número de vasos y un engrosamiento y ablación de la pared vascular. La administración de un inhibidor de la ruta JAK2/STAT3 redujo los focos fibróticos generados en el parénquima pulmonar hasta mantener una arquitectura bronquial próxima al sujeto sano. Las secciones de pulmón teñidas con hematoxilina-eosina y tricrómica de masson, evidencian la efectividad de la Cul en la mejora de la estructura pulmonar. Tanto la administración curativa como preventiva del fármaco merma el remodelado arterial notablemente reduciendo el engrosamiento de las paredes arteriales debido a un menor depósito de colágeno.

La patología que lleva por estudio el presente trabajo, presenta una sintomatología clínica de dificultad respiratoria. La resistencia vascular generada en los vasos pulmonares como secuela del remodelado arterial y la destrucción del parénquima pulmonar, produce un incremento de la tensión circulatoria pulmonar, pudiendo derivar en un cor pulmonale. En condiciones normales, el ventrículo derecho formado por una pared delgada, es capaz de adaptarse al retorno venoso. Ante un aumento de la presión arterial pulmonar, el ventrículo derecho no es capaz de mantener el flujo sanguíneo, dando lugar a cambios hipertróficos que aumentan la contractilidad con el fin de mantener el flujo en función de la demanda periférica [182]. El cuerpo humano desarrolla un mecanismo de compensación ante el incremento de la resistencia vascular, aumentando la contractilidad y el remodelado, resultando en un aumento de la fuerza cardíaca capaz de asumir la perfusión pulmonar necesaria para un intercambio gaseoso óptimo. La hipertrófia del ventrículo derecho se desarrolla ante el aumento de la fuerza contráctil y la pérdida de tensión de la pared ventricular. Este estudio ha medido el grosor de la pared del ventrículo derecho demostrando que la administración de Cul es capaz de revertir el engrosamiento de la pared. Podemos afirmar que la mejora de la arquitectura pulmonar y vascular, reduce la resistencia vascular pulmonar evitando el

5. DISCUSIÓN

engrosamiento del ventrículo derecho cardíaco. Estos resultados pueden trasladarse a enfermedades relacionadas con la FPI como lo es la HP.

Una de las principales comorbilidades asociadas a la FPI es la HP, cuya relevancia clínica requiere la atención de los resultados de obtenidos en este trabajo. Tal y como se ha descrito con anterioridad, como consecuencia del remodelado arterial se produce una hipertrofia del ventrículo derecho, que puede derivar en un angor pectoris [183]. En el 2007 se relacionó por primera vez la posible implicación de la alteración de la familia STAT en el desarrollo de la HP [184] y en la actualidad esta hipótesis va cobrando fuerza. Recientemente se ha descrito la implicación de STAT3 en la hipertrofia del ventrículo derecho como mecanismo compensatorio ante una resistencia vascular pulmonar [45]. La administración de Cul 1mg/kg/día inhibidor de la ruta celular JAK2/STAT3, reduce la hipertrofia del ventrículo derecho, como consecuencia de la recuperación de la función pulmonar.

El desacoplamiento entre la ventilación-perfusión es un factor importante en patologías asociadas a una disfunción pulmonar. En casos de FPI, HP o tromboembolismo pulmonar, se producen anomalías entre la redistribución de Q/V [185]. La técnica de SPECT permite la detección de dicho desacoplamiento de manera óptima ya que permite determinar la correlación entre Q y V al administrar MAA-Tc^{99m} radioactivos en circulación sistémica y vía inhalatoria (se aeroliza el DPTA con Tc⁹⁹). Los resultados presentados del modelo animal muestran como el ratio V/Q es lineal previa a la instauración de la enfermedad. Una vez instaurada la FPI se produce un desacoplamiento entre el ratio V/Q que es revertida con la administración del inhibidor de la ruta JAK2/STAT3. La administración del fármaco ensayado mejora la funcionalidad pulmonar impidiendo el desacoplamiento entre el flujo sanguíneo y el intercambio gaseoso. Esto se traduce en una mejora clínica de la disnea del animal. Dada la consonancia con los resultados de V/Q con discutidos hasta el momento, podemos determinar que la técnica de SPECT mejora el diagnóstico y determinación del desacoplamiento entre en flujo sanguíneo y la ventilación pulmonar tal y como se describe en la reciente literatura científica [186].

La HP cursa con un daño en el endotelio arterial pulmonar cuya reparación tisular parece ser la desencadenante del remodelado vascular que

se observa durante la enfermedad. La relación entre el daño endotelial y la patogénesis de dicho ámbito de la enfermedad permanece desconocido. Estudios realizados en animales de experimentación han determinado como la inducción de hipoxia genera un proceso inflamatorio y la inducción de la apoptosis endotelial que deriva en hipertensión, al igual que se exhibe en humanos [187]. El modelo de BLM presenta la misma analogía con la progresión de la enfermedad por lo que los resultados obtenidos en este trabajo suponen una traslación equiparable a la HP en humanos.

Al igual que la FPI, la HP comparte la característica de un incremento en la proliferación celular de las células pulmonares de músculo liso arterial. Ambos desórdenes presentan un componente inflamatorio. Recientemente se ha demostrado la implicación de STAT3 como mediador de la HP y se ha descrito como posible diana terapéutica. Agentes farmacológicos tales como DHEA o plumbagin han sido capaces de revertir la HP experimental restaurando las anomalías moleculares alteradas como la sobreexpresión de células pulmonares de músculo liso arterial [188, 189]. Se ha visto que STAT3 se encuentra sobreexpresado en células endoteliales aisladas de pacientes con HP y en modelos animales de la enfermedad, lo que sugiere la implicación de STAT3 en enfermedades con lesiones plexiformes [45] y su inhibición como tratamiento farmacológico.

Tal y como se ha descrito previamente, la fosforilación del resto tirosina 705 (PY705) de STAT3 es activado tras la estimulación con IL-6, ET-1, PDGF y Angiotensina II, todos ellos sobreexpresados en HP [45]. En HP las células endoteliales de las arterias pulmonares se encuentran dañadas en los estadios previos de la enfermedad. Esta analogía con la FPI demuestra que el modelo animal de FPI inducida por BLM presenta similitudes comparables a la HP hipóxica o HP de clase 3 (OMS).

Se ha estudiado la implicación de la familia de proteínas JAK en la HP y se han visto que sus niveles de mRNA están sobreexpresados en murinos con HP inducida [190]. La administración de un inhibidor de JAK2 (AG490) revirtió la tasa de proliferación de las células musculares de arterias pulmonares así como el remodelado de las mismas [184]. Los resultados obtenidos en estudios

5. DISCUSIÓN

científicos previos van en consonancia con los obtenidos en el este trabajo. La administración de Cul 1mg/kg/día revierte el engrosamiento de las paredes arteriales mejorando el endotelio vascular pulmonar y reduciendo así la resistencia al flujo sanguíneo, que indirectamente mejora la función cardíaca e impide el desarrollo del cor pulmonale.

Los resultados histológicos obtenidos en el trabajo realizado y representados gráficamente mediante la puntuación de Ashcroft y el análisis morfológico, evidencian que la administración del inhibidor de la ruta JAK3/STAT3 se traduce en una disminución significativa de las lesiones fibróticas, una disminución del engrosamiento de la íntima y una reversión de los daños presentes en la arquitectura tisular pulmonar. La fibrosis del parénquima pulmonar y la invasión del espacio alveolar se ve reducida y las paredes de los vasos confieren un aspecto próximo a los sujetos sanos. Tal y como muestra la tinción tricrómica de masson, se reduce el engrosamiento de las paredes vasculares como consecuencia de la inhibición del depósito de colágeno. Por lo que podemos afirmar que el mecanismo de producción de colágeno está estrechamente relacionado con las rutas de activación JAK2/STAT3.

La FPI es una enfermedad en la que los procesos inflamatorios y fibróticos están ampliamente descritos, sin embargo, los mecanismos implicados en la formación y generación de la enfermedad todavía permanecen desconocidos. Este trabajo pretende identificar el grado de implicación de la ruta JAK2/STAT3 en la formación del proceso fibrótico y de esta forma arrojar luz sobre los mecanismos implicados en la patogénesis de la FPI. Para ello, en la presente tesis se analizaron los marcadores génicos y proteicos Col1A, ET1, TGF- β 1 y CTGF., cuyo grado de implicación en la enfermedad han sido descritos en la literatura y así ha sido reflejado a lo largo de este trabajo.

Estudios realizados tanto a nivel molecular como celular identificaron una serie de factores de crecimiento involucrados en los procesos de fibrosis pulmonar implicados en la síntesis y deposición extracelular de proteínas de la matriz extracelular. CTGF es un péptido rico en cisteína que promueve la proliferación, síntesis de colágeno y la quimiotaxis de células mesenquimales.

CTGF se encuentra sobreexpresado en enfermedades de carácter fibrótico, posiblemente como consecuencia de la activación y producción de TGF- β [191]. La regulación de CTGF se controla aparentemente a nivel de la transcripción, una breve exposición de los fibroblastos a TGF- β es suficiente para inducir la expresión prolongada de CTGF. TGF- β presenta un papel determinante en la morfogénesis y función pulmonar. Está involucrado en los procesos de reparación celular tras una lesión pulmonar, siendo su liberación necesaria para la proliferación de fibroblastos, síntesis de colágeno y la consecuente reparación de tejido [192]. La función de TGF- β es esencial en la mediación del remodelado tisular a través de la estimulación de fibroblastos aumentando la producción de mecanismos implicados en la formación de tejido conectivo [193]. Los resultados presentados en este trabajo demuestran la implicación de estos dos marcadores celulares en los procesos fibróticos y como la administración de Cul consigue disminuir la expresión génica y proteica de ambos, en consonancia con la mejora observada a nivel histológico. La disminución de CTGF y TGF- β se traduce, como es evidente, en una disminución de la concentración proteica y la expresión génica de Col-1A en tejido pulmonar de sujetos tratados con 1mg/kg/día de Cul.

Estudios realizados con anterioridad relacionan la implicación de ET-1, con la FPI y FPI asociada a HP gracias a su efecto mitogénico [194-196]. Se ha observado que en la FPI los niveles de ET-1 periféricos se encuentran incrementados en pulmón [197]. Aparentemente la ET-1 se localiza en células endoteliales de pequeños vasos y se difunden al tejido próximo. En condiciones patológicas se produce una activación descontrolada de ET-1 que tiene como resultado una inducción del proceso fibrótico, así como una disfunción endotelial que da lugar a la HP asociada a FPI [198, 199]. Parl et al. demostraron la implicación de este péptido en un modelo animal de FPI inducida con BLM en la que la administración de un antagonista de los receptores para ET-1 redujo notablemente las áreas fibróticas pulmonares [79]. Los resultados publicados en la literatura confirman los obtenidos en el presente trabajo, relacionando la ET-1 con los procesos fibróticos. En este trabajo se observó que el bloqueo dual de JAK2/STAT3 inhibe la sobreexpresión de ET-1. A este nivel cabría esperar que un antagonista de los

5. DISCUSIÓN

receptores de ET-1 fuera beneficioso en pacientes con FPI con un componente de HP asociada, sin embargo los ensayos clínicos realizados con bosentán en ese tipo de pacientes no mejora ni la progresión ni la mortalidad ni la calidad de vida de los pacientes.

Este trabajo plantea la posible implicación de la ruta de señalización JAK2/STAT3 y SMAD2 en los mecanismos patogénicos responsables de la formación de fibrosis pulmonar mediante la administración un inhibidor de la ruta en un modelo animal de FPI con BLM. Tras la lesión pulmonar inicial se produce un proceso inflamatorio, como consecuencia, los niveles TGF- β 1 se encuentran aumentados, induciendo la activación y proliferación de fibroblastos. La familia de proteínas SMAD están implicadas en los procesos de señalización intracelular de TGF- β 1 que a su vez promueve la transcripción de colágeno tipo I, estimula la transición epitelio-mesenquimal, y la producción de fibronectina en fibroblastos [200]. La activación de receptores tipo I resulta en una fosforilación de SMAD2/3 que forman un complejo heteromérico que se transloca al núcleo. Estudios realizados por *Ge et al.* demuestran que TGF- β 1 induce la fosforilación de SMAD2 al núcleo y su bloqueo reduce los niveles de TGF- β 1 y IL-6 [201].

La ruta de JAK/STAT es una de las rutas de señalización implicadas en la regulación de la expresión de citoquinas, y se ha visto implicada en la fisiopatología de la fibrosis renal [202]. El factor de transcripción STAT3 juega un papel determinante en la regulación de fibroblastos. Hasta la fecha, la ruta más estudiada de activación de miofibroblastos, precursores de los fibroblastos, es a través de la señalización SMAD inducida por TGF- β . Muestras histológicas de enfermos con FPI mostraron una alta concentración de células que sobreexpresan p-STAT3 en las áreas fibróticas densas pero no en los focos de fibroblastos, lo que sugiere su implicación en la formación de las regiones fibróticas [203]. La inhibición de la señalización de STAT3 en fibroblastos aislados de pacientes con FPI reduce la expresión de TGF- β y colágeno, resultados que van en consonancia con la administración de Cul en el modelo de FPI inducida con BLM. Los resultados obtenidos sugieren, dada la implicación de JAK2/STAT3 en procesos de apoptosis, diferenciación y

proliferación celular, que la ruta JAK2/STAT3 está directamente implicada en la desregulación de los procesos fibróticos de la enfermedad.

El presente estudio se evidencia la importancia de la vía de transducción de señal JAK2/STAT3 en la función vascular de pacientes diagnosticados con HP asociada a FPI. Los resultados obtenidos indican que la ruta JAK2/STAT3 es una diana farmacológica de potencial aplicación para el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos al tratamiento de la FPI y la FPI asociada a HP. En la actualidad existen pocos conocimientos acerca de la función tanto de STAT3 como de JAK2 en la FPI e HP asociada. Este trabajo pretende desvelar la implicación de la ruta de transducción de señal en la patología de la FPI e HP asociada. Para ello se analizó la distribución de JAK2 y STAT3 en sus formas constitutivas y activadas en tejido pulmonar de pacientes con FPI e HP asociada.

Cabe destacar que en aquellos pacientes diagnosticados con la patología dual (FPI + HP) se observaron niveles más elevados de remodelado arterial con respecto a los pacientes que únicamente presentaban FPI, pues realmente-y el remodelado arterial ha sido definido como un evento que caracterizan principalmente a la HP desarrollada como consecuencia de una progresión avanzada de la FPI. Por el contrario, en lo que respecta a la distribución de JAK2, p-JAK2, STAT3 y p-STAT3 en tejido pulmonar, se observa una distribución prácticamente idéntica en el caso de pacientes con FPI e HP asociada y pacientes con únicamente FPI. La distribución se localiza principalmente de células alveolares tipo II hiperplásicas, células de músculo liso de arteria pulmonar, focos fibróticos y miofibroblastos de arterias con una remodelación completa y sin luz. Así pues, no se aprecian prácticamente diferencias en los niveles de expresión de ambas proteínas en sus formas activas entre pacientes con FPI + HP asociada y pacientes con FPI. Esto pone en evidencia la importancia de la ruta JAK2/STAT3 no sólo en la HP asociada a FPI sino también en la FPI no asociada a HP, pudiendo proponerse así dicha ruta como una potente diana farmacológica en ambas condiciones patológicas.

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral demuestran la implicación de la ruta de señalización JAK2/STAT3 en el desarrollo de la fibrosis pulmonar. La supresión de la ruta JAK2/STAT3 en un modelo de

5. DISCUSIÓN

fibrosis animal, reduce la concentración de citoquinas implicadas en los procesos inflamatorios, mejorando el remodelado vascular y como consecuencia la función pulmonar asociada. La administración de un inhibidor de Cul, inhibidor de la ruta celular JAK2/STAT3 mejora significativamente el desarrollo de la enfermedad. Estos resultados son de gran relevancia clínica ya que abordan el tratamiento de la enfermedad desde otra perspectiva, siendo la Cul, una posible diana terapéutica. Sin embargo, son imprescindibles futuras investigaciones con el fin de elucidar los mecanismos responsables de la enfermedad, ya que a día de hoy, todavía permanecen desconocidos.

El estudio de la expresión y distribución de JAK2/STAT3 en tejido pulmonar humano destaca que en aquellos pacientes diagnosticados con la patología dual (FPI + HP) se observó un mayor remodelado arterial con respecto a los pacientes que únicamente presentaban FPI, pues realmente el remodelado arterial se define como el evento que caracteriza a la HP desarrollada como consecuencia de una progresión avanzada de la FPI. Por el contrario, en lo que respecta a la distribución de JAK2, p-JAK2, STAT3 y p-STAT3 en tejido pulmonar, se observa una distribución prácticamente idéntica en el caso de pacientes con FPI e HP asociada y pacientes con únicamente FPI. Así pues, no se aprecian prácticamente diferencias en los niveles de expresión de ambas proteínas en sus formas activas entre pacientes con FPI + HP asociada y pacientes con FPI. Esto pone en evidencia la importancia de la ruta JAK2/STAT3 no sólo en la HP asociada a FPI sino también en la FPI no asociada a HP, pudiendo proponerse así dicha ruta como una potente diana farmacológica en ambas condiciones patológica.

En último lugar, se determinaron los niveles de tropocolágeno III, precursor del colágeno III mediante la técnica RIA y se observó que el tropocolágeno III se expresa únicamente en las ratas inducidas con FPI. Estos resultados revelan que la concentración de tropocolágeno III, en suero es un potencial marcador de tipo no invasivo subrogado a la presencia y evolución y de FPI en humano.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El tratamiento farmacológico con Cul mejora el cuadro inflamatorio de la FPI animal, disminuyendo la infiltración de células inflamatorias en tejido y en el LBA así como la liberación de mediadores inflamatorios.
2. La Cul, en animales afectados de fibrosis por bleomicina, mejora el proceso fibrótico, reduciendo las áreas fibróticas, el remodelado vascular y la hipertrofia de ventrículo derecho.
3. El seguimiento animal mediante técnicas de imagen en modelo tanto preventivo como curativo evidencia que la administración de Cul 1mg/Kg/día mejora la función pulmonar, asegurando el acoplamiento V/Q y aumentando la captación de aire en pulmón.
4. La expresión y distribución de JAK2/STAT3 en tejido pulmonar humano permite constatar una analogía entre la expresión de dichos marcadores en humano frente al modelo de enfermedad animal de FPI demostrando una posible translación de los resultados a la clínica.
5. Los resultados demuestran la relevancia de la ruta celular JAK2/STAT3 en la instauración y progresión de la FPI. La administración curativa y preventiva de un inhibidor de la ruta JAK2/STAT3 puede ser un potencial tratamiento para la fibrosis pulmonar, ya que mejora parámetros indicativos de la patología.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Raghu, G., *Idiopathic pulmonary fibrosis: guidelines for diagnosis and clinical management have advanced from consensus-based in 2000 to evidence-based in 2011*. Eur Respir J, 2011. **37**(4): p. 743-6.
2. King, T.E., Jr., A. Pardo, and M. Selman, *Idiopathic pulmonary fibrosis*. Lancet, 2011. **378**(9807): p. 1949-61.
3. Ley, B. and H.R. Collard, *Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis*. Clin Epidemiol, 2013. **5**: p. 483-492.
4. *American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS)*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(2 Pt 1): p. 646-64.
5. *American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(2): p. 277-304.
6. Visscher, D.W. and J.L. Myers, *Histologic spectrum of idiopathic interstitial pneumonias*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(4): p. 322-9.
7. Olson, A.L. and J.J. Swigris, *Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and epidemiology*. Clin Chest Med, 2012. **33**(1): p. 41-50.
8. Raghu, G., et al., *An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(6): p. 788-824.
9. Gribbin, J., et al., *Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK*. Thorax, 2006. **61**(11): p. 980-5.
10. Navaratnam, V., et al., *The rising incidence of idiopathic pulmonary fibrosis in the U.K.* Thorax, 2011. **66**(6): p. 462-7.
11. Lopez-Campos, J.L. and E. Rodriguez-Becerra, *Incidence of interstitial lung diseases in the south of Spain 1998-2000: the RENIA study*. Eur J Epidemiol, 2004. **19**(2): p. 155-61.
12. Olson, A.L., et al., *Mortality from pulmonary fibrosis increased in the United States from 1992 to 2003*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(3): p. 277-84.
13. Meltzer, E.B. and P.W. Noble, *Idiopathic pulmonary fibrosis*. Orphanet J Rare Dis, 2008. **3**: p. 8.
14. Tzilas, V., et al., *Prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Med Sci, 2009. **338**(6): p. 481-5.
15. Bouros, D. and K.M. Antoniou, *Current and future therapeutic approaches in idiopathic pulmonary fibrosis*. Eur Respir J, 2005. **26**(4): p. 693-702.
16. Oh, C.K., L.A. Murray, and N.A. Molfino, *Smoking and idiopathic pulmonary fibrosis*. Pulm Med, 2012. **2012**: p. 808260.
17. Yang, I.V. and D.A. Schwartz, *Epigenetics of idiopathic pulmonary fibrosis*. Transl Res, 2014.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

18. Hubbard, R., et al., *Occupational exposure to metal or wood dust and aetiology of cryptogenic fibrosing alveolitis*. Lancet, 1996. **347**(8997): p. 284-9.
19. Miyake, Y., et al., *Occupational and environmental factors and idiopathic pulmonary fibrosis in Japan*. Ann Occup Hyg, 2005. **49**(3): p. 259-65.
20. Gustafson, T., et al., *Occupational exposure and severe pulmonary fibrosis*. Respir Med, 2007. **101**(10): p. 2207-12.
21. Lee, J.S., et al., *Does chronic microaspiration cause idiopathic pulmonary fibrosis?* Am J Med, 2010. **123**(4): p. 304-11.
22. Ravelli, A.M., et al., *Pulmonary aspiration shown by scintigraphy in gastroesophageal reflux-related respiratory disease*. Chest, 2006. **130**(5): p. 1520-6.
23. Hodgson, U., T. Laitinen, and P. Tukiainen, *Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: evidence of founder effect among multiplex families in Finland*. Thorax, 2002. **57**(4): p. 338-42.
24. Fingerlin, T.E., et al., *Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis*. Nat Genet, 2013. **45**(6): p. 613-20.
25. Noth, I., et al., *Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study*. Lancet Respir Med, 2013. **1**(4): p. 309-17.
26. Vagane, R., et al., *Radiological and functional assessment of radiation-induced pulmonary damage following breast irradiation*. Acta Oncol, 2008. **47**(2): p. 248-54.
27. Wilson, M.S. and T.A. Wynn, *Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation*. Mucosal Immunol, 2009. **2**(2): p. 103-21.
28. Umezawa, H., *[Trends in antibiotic research in Japan]*. Naika, 1963. **11**: p. 813-8.
29. Claussen, C.A. and E.C. Long, *Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin*. Chem Rev, 1999. **99**(9): p. 2797-816.
30. Adamson, I.Y., *Pulmonary toxicity of bleomycin*. Environ Health Perspect, 1976. **16**: p. 119-26.
31. Selman, M., T.E. King, and A. Pardo, *Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy*. Ann Intern Med, 2001. **134**(2): p. 136-51.
32. Strieter, R.M. and B. Mehrad, *New mechanisms of pulmonary fibrosis*. Chest, 2009. **136**(5): p. 1364-70.
33. du Bois, R.M., *Strategies for treating idiopathic pulmonary fibrosis*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(2): p. 129-40.
34. Clark, R.A., *Basics of cutaneous wound repair*. J Dermatol Surg Oncol, 1993. **19**(8): p. 693-706.
35. Wallace, W.A., et al., *Inflammation-associated remodelling and fibrosis in the lung - a process and an end point*. Int J Exp Pathol, 2007. **88**(2): p. 103-10.
36. Basset, F., et al., *Intraluminal fibrosis in interstitial lung disorders*. Am J Pathol, 1986. **122**(3): p. 443-61.
37. Corrin, B., et al., *Fine structural changes in cryptogenic fibrosing alveolitis and asbestosis*. J Pathol, 1985. **147**(2): p. 107-19.

38. Kuhn, C., 3rd, et al., *An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis*. Am Rev Respir Dis, 1989. **140**(6): p. 1693-703.
39. McDonald, J.A., *Idiopathic pulmonary fibrosis. A paradigm for lung injury and repair*. Chest, 1991. **99**(3 Suppl): p. 87S-93S.
40. Strieter, R.M., *Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: the whole story or the last chapter of a long novel*. Chest, 2005. **128**(5 Suppl 1): p. 526S-532S.
41. Strieter, R.M., B.N. Gomperts, and M.P. Keane, *The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 549-56.
42. Loomis-King, H., K.R. Flaherty, and B.B. Moore, *Pathogenesis, current treatments and future directions for idiopathic pulmonary fibrosis*. Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(3): p. 377-85.
43. Todd, N.W., I.G. Luzina, and S.P. Atamas, *Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2012. **5**(1): p. 11.
44. Fernandez, I.E. and O. Eickelberg, *New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis*. Lancet, 2012. **380**(9842): p. 680-8.
45. Paulin, R., J. Meloche, and S. Bonnet, *STAT3 signaling in pulmonary arterial hypertension*. JAKSTAT, 2012. **1**(4): p. 223-233.
46. Lettieri, C.J., et al., *Prevalence and outcomes of pulmonary arterial hypertension in advanced idiopathic pulmonary fibrosis*. Chest, 2006. **129**(3): p. 746-52.
47. Nathan, S.D., P.W. Noble, and R.M. Tuder, *Idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension: connecting the dots*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(9): p. 875-80.
48. Renzoni, E.A., et al., *Interstitial vascularity in fibrosing alveolitis*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(3): p. 438-43.
49. Farkas, L., et al., *Pulmonary hypertension and idiopathic pulmonary fibrosis: a tale of angiogenesis, apoptosis, and growth factors*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **45**(1): p. 1-15.
50. Lee, A.S., et al., *The burden of idiopathic pulmonary fibrosis: An unmet public health need*. Respir Med, 2014.
51. Gomperts, B.N. and R.M. Strieter, *Fibrocytes in lung disease*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(3): p. 449-56.
52. Kasai, H., et al., *TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT)*. Respir Res, 2005. **6**: p. 56.
53. Yao, H.W., et al., *TGF-beta1 induces alveolar epithelial to mesenchymal transition in vitro*. Life Sci, 2004. **76**(1): p. 29-37.
54. Willis, B.C., et al., *Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Pathol, 2005. **166**(5): p. 1321-32.
55. Kim, K.K., et al., *Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 2009. **119**(1): p. 213-24.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

56. Piera-Velazquez, S., Z. Li, and S.A. Jimenez, *Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders*. Am J Pathol, 2011. **179**(3): p. 1074-80.
57. Armulik, A., G. Genove, and C. Betsholtz, *Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises*. Dev Cell, 2011. **21**(2): p. 193-215.
58. Rajkumar, V.S., et al., *Platelet-derived growth factor-beta receptor activation is essential for fibroblast and pericyte recruitment during cutaneous wound healing*. Am J Pathol, 2006. **169**(6): p. 2254-65.
59. Sundberg, C., et al., *Pericytes as collagen-producing cells in excessive dermal scarring*. Lab Invest, 1996. **74**(2): p. 452-66.
60. Lin, S.L., et al., *Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney*. Am J Pathol, 2008. **173**(6): p. 1617-27.
61. Humphreys, B.D., et al., *Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis*. Am J Pathol, 2010. **176**(1): p. 85-97.
62. Fabian, S.L., et al., *Hedgehog-Gli pathway activation during kidney fibrosis*. Am J Pathol, 2012. **180**(4): p. 1441-53.
63. Thomas, A.Q., et al., *Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(9): p. 1322-8.
64. Alder, J.K., et al., *Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(35): p. 13051-6.
65. Cronkhite, J.T., et al., *Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(7): p. 729-37.
66. Chambers, R.C., *Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention?* Br J Pharmacol, 2008. **153 Suppl 1**: p. S367-78.
67. Selman, M. and A. Pardo, *Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(4): p. 364-72.
68. Zhu, Z., et al., *Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production*. J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 779-88.
69. Strutz, F., et al., *TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2)*. Kidney Int, 2001. **59**(2): p. 579-92.
70. Liu, F., et al., *A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator*. Nature, 1996. **381**(6583): p. 620-3.
71. Lan, H.Y., *Diverse roles of TGF-beta/Smads in renal fibrosis and inflammation*. Int J Biol Sci, 2011. **7**(7): p. 1056-67.
72. Sime, P.J., et al., *Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung*. J Clin Invest, 1997. **100**(4): p. 768-76.

73. Knight, D.A., et al., *The role of gp130/IL-6 cytokines in the development of pulmonary fibrosis: critical determinants of disease susceptibility and progression?* Pharmacol Ther, 2003. **99**(3): p. 327-38.
74. Mozaffarian, A., et al., *Mechanisms of oncostatin M-induced pulmonary inflammation and fibrosis.* J Immunol, 2008. **181**(10): p. 7243-53.
75. Maher, T.M., *Idiopathic pulmonary fibrosis: pathobiology of novel approaches to treatment.* Clin Chest Med, 2012. **33**(1): p. 69-83.
76. Lipson, K.E., et al., *CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis.* Fibrogenesis Tissue Repair, 2012. **5 Suppl 1**: p. S24.
77. Scotton, C.J. and R.C. Chambers, *Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus.* Chest, 2007. **132**(4): p. 1311-21.
78. Peacock, A.J., et al., *Endothelin-1 and endothelin-3 induce chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblasts.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1992. **7**(5): p. 492-9.
79. Park, S.H., et al., *Increased endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist.* Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(2 Pt 1): p. 600-8.
80. Loffek, S., O. Schilling, and C.W. Franzke, *Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance.* Eur Respir J, 2011. **38**(1): p. 191-208.
81. Raghu, G., et al., *Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs.* Am Rev Respir Dis, 1985. **131**(2): p. 281-9.
82. Robinson, D.R., Y.M. Wu, and S.F. Lin, *The protein tyrosine kinase family of the human genome.* Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5548-57.
83. Beyer, C. and J.H. Distler, *Tyrosine kinase signaling in fibrotic disorders: Translation of basic research to human disease.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(7): p. 897-904.
84. Czochra, P., et al., *Liver fibrosis induced by hepatic overexpression of PDGF-B in transgenic mice.* J Hepatol, 2006. **45**(3): p. 419-28.
85. Olson, L.E. and P. Soriano, *Increased PDGFRalpha activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis.* Dev Cell, 2009. **16**(2): p. 303-13.
86. Maurer, B., et al., *Vascular endothelial growth factor aggravates fibrosis and vasculopathy in experimental models of systemic sclerosis.* Ann Rheum Dis, 2013.
87. Harris, R.C., E. Chung, and R.J. Coffey, *EGF receptor ligands.* Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 2-13.
88. Suzuki, H., et al., *Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition augments a murine model of pulmonary fibrosis.* Cancer Res, 2003. **63**(16): p. 5054-9.
89. Mishra, R., et al., *TGF-beta-regulated collagen type I accumulation: role of Src-based signals.* Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(4): p. C1361-9.
90. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.* Science, 1994. **264**(5164): p. 1415-21.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

91. Ungureanu, D., et al., *The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(9): p. 971-6.
92. Yamaoka, K., et al., *The Janus kinases (Jaks)*. Genome Biol, 2004. **5**(12): p. 253.
93. Rane, S.G. and E.P. Reddy, *Janus kinases: components of multiple signaling pathways*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5662-79.
94. Cutolo, M. and M. Meroni, *Clinical utility of the oral JAK inhibitor tofacitinib in the treatment of rheumatoid arthritis*. J Inflamm Res, 2013. **6**: p. 129-137.
95. Leaman, D.W., et al., *Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines*. FASEB J, 1996. **10**(14): p. 1578-88.
96. Blaskovich, M.A., et al., *Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice*. Cancer Res, 2003. **63**(6): p. 1270-9.
97. Meraz, M.A., et al., *Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway*. Cell, 1996. **84**(3): p. 431-42.
98. Selman, M., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches*. Drugs, 2004. **64**(4): p. 405-30.
99. Walters, D.M., et al., *Susceptibility of signal transducer and activator of transcription-1-deficient mice to pulmonary fibrogenesis*. Am J Pathol, 2005. **167**(5): p. 1221-9.
100. Lin, L., et al., *Novel STAT3 phosphorylation inhibitors exhibit potent growth-suppressive activity in pancreatic and breast cancer cells*. Cancer Res, 2010. **70**(6): p. 2445-54.
101. Ogata, H., et al., *Loss of SOCS3 in the liver promotes fibrosis by enhancing STAT3-mediated TGF-beta1 production*. Oncogene, 2006. **25**(17): p. 2520-30.
102. Lim, C.P., et al., *Stat3 contributes to keloid pathogenesis via promoting collagen production, cell proliferation and migration*. Oncogene, 2006. **25**(39): p. 5416-25.
103. Arakawa, T., et al., *Activation of signal transducer and activator of transcription 3 correlates with cell proliferation and renal injury in human glomerulonephritis*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(11): p. 3418-26.
104. Kuratsune, M., et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 involvement in the development of renal interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction*. Nephrology (Carlton), 2007. **12**(6): p. 565-71.
105. Ma, X., et al., *Effects of matrine on JAK-STAT signaling transduction pathways in bleomycin-induced pulmonary fibrosis*. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2013. **10**(3): p. 442-8.
106. Sanderson, N., et al., *Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 2572-6.
107. Alghasham, A.A., *Cucurbitacins - a promising target for cancer therapy*. Int J Health Sci (Qassim), 2013. **7**(1): p. 77-89.

108. Lang, K.L., et al., *Synthesis and cytotoxic activity evaluation of dihydrocucurbitacin B and cucurbitacin B derivatives*. *Bioorg Med Chem*, 2012. **20**(9): p. 3016-30.
109. Collard, H.R., et al., *Changes in clinical and physiologic variables predict survival in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. **168**(5): p. 538-42.
110. Flaherty, K.R., et al., *Prognostic implications of physiologic and radiographic changes in idiopathic interstitial pneumonia*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. **168**(5): p. 543-8.
111. Jegal, Y., et al., *Physiology is a stronger predictor of survival than pathology in fibrotic interstitial pneumonia*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. **171**(6): p. 639-44.
112. Latsi, P.I., et al., *Fibrotic idiopathic interstitial pneumonia: the prognostic value of longitudinal functional trends*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. **168**(5): p. 531-7.
113. Eaton, T., et al., *Six-minute walk, maximal exercise tests: reproducibility in fibrotic interstitial pneumonia*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. **171**(10): p. 1150-7.
114. Jawad, H., et al., *Radiological approach to interstitial lung disease: a guide for the nonradiologist*. *Clin Chest Med*, 2012. **33**(1): p. 11-26.
115. Petersson, J., et al., *Physiological imaging of the lung: single-photon-emission computed tomography (SPECT)*. *J Appl Physiol* (1985), 2007. **102**(1): p. 468-76.
116. Johnson, K.A., *Imaging techniques for small animal imaging models of pulmonary disease: micro-CT*. *Toxicol Pathol*, 2007. **35**(1): p. 59-64.
117. Prasse, A., et al., *Serum CC-chemokine ligand 18 concentration predicts outcome in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. **179**(8): p. 717-23.
118. Vij, R. and I. Noth, *Peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Transl Res*, 2012. **159**(4): p. 218-27.
119. Thomeer, M., et al., *Clinical use of biomarkers of survival in pulmonary fibrosis*. *Respir Res*, 2010. **11**: p. 89.
120. *American Thoracic Society. ATS/ERS international multidisciplinary consensus classification of idiopathic interstitial pneumonias*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002(165): p. 277-304.
121. Taniguchi, H., et al., *Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Eur Respir J*. **35**(4): p. 821-9.
122. Collard, H.R., *Idiopathic pulmonary fibrosis and pirfenidone*. *Eur Respir J*. **35**(4): p. 728-9.
123. *Regulatory watch : First drug for idiopathic pulmonary fibrosis approved in Japan*. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. **7**(12): p. 966-7.
124. Flaherty, K.R., et al., *Steroids in idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective assessment of adverse reactions, response to therapy, and survival*. *Am J Med*, 2001. **110**(4): p. 278-82.
125. *American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000(161): p. 646-664.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

126. Davies, H.R., L. Richeldi, and E.H. Walters, *Immunomodulatory agents for idiopathic pulmonary fibrosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2003(3): p. CD003134.
127. du Bois, R.M., *Strategies for treating idiopathic pulmonary fibrosis*. Nat Rev Drug Discov, 2010.
128. Cortijo, J., et al., *Attenuation by oral N-acetylcysteine of bleomycin-induced lung injury in rats*. Eur Respir J, 2001. **17**(6): p. 1228-35.
129. Mata, M., et al., *Oral N-acetylcysteine reduces bleomycin-induced lung damage and mucin Muc5ac expression in rats*. Eur Respir J, 2003. **22**(6): p. 900-5.
130. Serrano-Mollar, A., et al., *P-selectin upregulation in bleomycin induced lung injury in rats: effect of N-acetyl-L-cysteine*. Thorax, 2002. **57**(7): p. 629-34.
131. Serrano-Mollar, A., et al., *In vivo antioxidant treatment protects against bleomycin-induced lung damage in rats*. Br J Pharmacol, 2003. **138**(6): p. 1037-48.
132. Demedts, M., et al., *High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis*. N Engl J Med, 2005. **353**(21): p. 2229-42.
133. Raghu, G., et al., *A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. N Engl J Med, 2004. **350**(2): p. 125-33.
134. Giaid, A., et al., *Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis*. Lancet, 1993. **341**(8860): p. 1550-4.
135. Saito, H., et al., *Percutaneous in vivo gene transfer to the peripheral lungs using plasmid-liposome complexes*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(4): p. L651-7.
136. Hocher, B., et al., *Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(1): p. 19-26.
137. Dhillon, S. and G.M. Keating, *Bosentan: a review of its use in the management of mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension*. Am J Cardiovasc Drugs, 2009. **9**(5): p. 331-50.
138. Raghu, G., et al., *Quality of life and dyspnoea in patients treated with bosentan for idiopathic pulmonary fibrosis (BUILD-1)*. Eur Respir J. **35**(1): p. 118-23.
139. Kubo, H., et al., *Anticoagulant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis*. Chest, 2005. **128**(3): p. 1475-82.
140. Bennett, R.G., *Relaxin and its role in the development and treatment of fibrosis*. Transl Res, 2009. **154**(1): p. 1-6.
141. McCowin, M.J., et al., *Changes in radiographic abnormalities in organ donors: associations with lung transplantation*. J Heart Lung Transplant, 2005. **24**(3): p. 323-30.
142. Orens, J.B. and E.R. Garrity, Jr., *General overview of lung transplantation and review of organ allocation*. Proc Am Thorac Soc, 2009. **6**(1): p. 13-9.
143. Pierson, R.N., 3rd, *Lung transplantation: current status and challenges*. Transplantation, 2006. **81**(12): p. 1609-15.
144. Selman, M., C. Navarro, and M. Gaxiola, *[Idiopathic pulmonary fibrosis: in search of an effective treatment.]*. Arch Bronconeumol, 2005. **41 Suppl 5**: p. 15-20.

145. Serrano-Mollar, A., et al., *Intratracheal transplantation of alveolar type II cells reverses bleomycin-induced lung fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. **176**(12): p. 1261-8.
146. Martinez, F.J., et al., *Randomized trial of acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis*. *N Engl J Med*, 2014. **370**(22): p. 2093-101.
147. Buchdunger, E., T. O'Reilly, and J. Wood, *Pharmacology of imatinib (STI571)*. *Eur J Cancer*, 2002. **38 Suppl 5**: p. S28-36.
148. King, T.E., Jr., et al., *A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. *N Engl J Med*, 2014. **370**(22): p. 2083-92.
149. Richeldi, L., et al., *Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis*. *N Engl J Med*, 2014. **370**(22): p. 2071-82.
150. Han, M.K., et al., *Sildenafil preserves exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and right-sided ventricular dysfunction*. *Chest*, 2013. **143**(6): p. 1699-708.
151. Umezawa, H., et al., *New antibiotics, bleomycin A and B*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1966. **19**(5): p. 200-9.
152. Peng, R., et al., *Bleomycin induces molecular changes directly relevant to idiopathic pulmonary fibrosis: a model for "active" disease*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e59348.
153. Sasser, T.A., et al., *Segmentation and measurement of fat volumes in murine obesity models using X-ray computed tomography*. *J Vis Exp*, 2012(62): p. e3680.
154. Cortijo, J., et al., *Roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor, alleviates bleomycin-induced lung injury*. *Br J Pharmacol*, 2009. **156**(3): p. 534-44.
155. Almudever, P., et al., *Role of tetrahydrobiopterin in pulmonary vascular remodelling associated with pulmonary fibrosis*. *Thorax*, 2013. **68**(10): p. 938-48.
156. Ashcroft, T., J.M. Simpson, and V. Timbrell, *Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale*. *J Clin Pathol*, 1988. **41**(4): p. 467-70.
157. Moeller, A., et al., *The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis?* *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. **40**(3): p. 362-82.
158. Kinder, B.W., et al., *Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Chest*, 2008. **133**(1): p. 226-32.
159. du Bois, R.M., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis: lung function is a clinically meaningful endpoint for phase III trials*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012. **186**(8): p. 712-5.
160. Venkatesan, N., L. Pini, and M.S. Ludwig, *Changes in Smad expression and subcellular localization in bleomycin-induced pulmonary fibrosis*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. **287**(6): p. L1342-7.
161. Coker, R.K., et al., *Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis*. *Am J Pathol*, 1997. **150**(3): p. 981-91.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

162. Swiderski, R.E., et al., *Differential expression of extracellular matrix remodeling genes in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis*. Am J Pathol, 1998. **152**(3): p. 821-8.
163. Wynn, T.A. and T.R. Ramalingam, *Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease*. Nat Med, 2012. **18**(7): p. 1028-40.
164. Saito, F., et al., *Role of interleukin-6 in bleomycin-induced lung inflammatory changes in mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **38**(5): p. 566-71.
165. Park, S.W., et al., *Interleukin-13 and its receptors in idiopathic interstitial pneumonia: clinical implications for lung function*. J Korean Med Sci, 2009. **24**(4): p. 614-20.
166. Schindler, C. and J.E. Darnell, Jr., *Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 621-51.
167. Jenkins, B.J., *Transcriptional Regulation of Pattern Recognition Receptors by JAK/STAT Signaling, and the Implications for Disease Pathogenesis*. J Interferon Cytokine Res, 2014.
168. Malemud, C.J., *Intracellular Signaling Pathways in Rheumatoid Arthritis*. J Clin Cell Immunol, 2013. **4**: p. 160.
169. Hazem, S.H., et al., *The novel Janus kinase inhibitor ruxolitinib confers protection against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity via multiple mechanisms*. Chem Biol Interact, 2014. **220C**: p. 116-127.
170. Kim, H.J. and J.K. Kim, *Antiangiogenic effects of cucurbitacin-I*. Arch Pharm Res, 2014.
171. Yuan, G., et al., *Cucurbitacin I induces protective autophagy in glioblastoma in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2014. **289**(15): p. 10607-19.
172. Kim, H.J., J.H. Park, and J.K. Kim, *Cucurbitacin-I, a natural cell-permeable triterpenoid isolated from Cucurbitaceae, exerts potent anticancer effect in colon cancer*. Chem Biol Interact, 2014. **219C**: p. 1-8.
173. Xu, Y., et al., *STAT3 mediates protection from liver inflammation after partial hepatectomy*. Cell Physiol Biochem, 2009. **23**(4-6): p. 379-86.
174. Gitter, S., et al., *Studies on the antitumor effect of cucurbitacins*. Cancer Res, 1961. **21**: p. 516-21.
175. Chen, X., et al., *Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer*. Anticancer Drugs, 2012. **23**(8): p. 777-87.
176. Jing, N. and D.J. Tweardy, *Targeting Stat3 in cancer therapy*. Anticancer Drugs, 2005. **16**(6): p. 601-7.
177. Orens, J.B., et al., *The sensitivity of high-resolution CT in detecting idiopathic pulmonary fibrosis proved by open lung biopsy. A prospective study*. Chest, 1995. **108**(1): p. 109-15.
178. Camera, L., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis complicated by acute thromboembolic disease: chest X-ray, HRCT and multi-detector row CT angiographic findings*. J Thorac Dis, 2013. **5**(1): p. 82-6.
179. Dupuis, J., F. Harel, and Q.T. Nguyen, *Molecular imaging of the pulmonary circulation in health and disease*. Clin Transl Imaging, 2014. **2**(5): p. 415-426.
180. Mouratidis, B., et al., *Increased pertechnegas lung clearance in interstitial lung disease*. Clin Nucl Med, 1999. **24**(2): p. 105-8.

181. Jogi, J., et al., *The added value of hybrid ventilation/perfusion SPECT/CT in patients with stable COPD or apparently healthy smokers. Cancer-suspected CT findings in the lungs are common when hybrid imaging is used.* Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2015. **10**: p. 25-30.
182. Naeije, R., S. Brimiouille, and L. Dewachter, *Biomechanics of the right ventricle in health and disease (2013 Grover Conference series).* Pulm Circ, 2014. **4**(3): p. 395-406.
183. Paulin, R., J. Meloche, and S. Bonnet, *STAT3 signaling in pulmonary arterial hypertension.* JAKSTAT, 2012. **1**(4): p. 223-33.
184. Masri, F.A., et al., *Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(3): p. L548-54.
185. Tsang, J.Y. and J.C. Hogg, *Gas exchange and pulmonary hypertension following acute pulmonary thromboembolism: has the emperor got some new clothes yet?* Pulm Circ, 2014. **4**(2): p. 220-36.
186. Kan, Y., et al., *The accuracy of V/Q SPECT in the diagnosis of pulmonary embolism: a meta-analysis.* Acta Radiol, 2014.
187. Yamaji-Kegan, K., et al., *Hypoxia-induced mitogenic factor (FIZZ1/RELMalpha) induces endothelial cell apoptosis and subsequent interleukin-4-dependent pulmonary hypertension.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014. **306**(12): p. L1090-103.
188. Kopplow, K., et al., *Dehydroepiandrosterone causes hyperplasia and impairs regeneration in rat liver.* Int J Oncol, 2005. **27**(6): p. 1551-8.
189. Courboulin, A., et al., *Plumbagin reverses proliferation and resistance to apoptosis in experimental PAH.* Eur Respir J, 2012. **40**(3): p. 618-29.
190. Wang, G.S., et al., *[Changes of interleukin-6 and Janus kinases in rats with hypoxic pulmonary hypertension].* Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2003. **26**(11): p. 664-7.
191. Abraham, D.J., et al., *Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts.* J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 15220-5.
192. Bartram, U. and C.P. Speer, *The role of transforming growth factor beta in lung development and disease.* Chest, 2004. **125**(2): p. 754-65.
193. Tzortzaki, E.G., et al., *Effects of antifibrotic agents on TGF-beta1, CTGF and IFN-gamma expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.* Respir Med, 2007. **101**(8): p. 1821-9.
194. Ventetuolo, C.E., S.M. Kawut, and D.J. Lederer, *Plasma endothelin-1 and vascular endothelial growth factor levels and their relationship to hemodynamics in idiopathic pulmonary fibrosis.* Respiration, 2012. **84**(4): p. 299-305.
195. Dupuis, J., et al., *Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1.* Circulation, 1996. **94**(7): p. 1578-84.
196. Pitsiou, G., D. Papakosta, and D. Bouros, *Pulmonary hypertension in idiopathic pulmonary fibrosis: a review.* Respiration, 2011. **82**(3): p. 294-304.
197. Ugucconi, M., et al., *Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis.* J Clin Pathol, 1995. **48**(4): p. 330-4.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

198. Ross, B., P. D'Orleans-Juste, and A. Giaid, *Potential role of endothelin-1 in pulmonary fibrosis: from the bench to the clinic*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **42**(1): p. 16-20.
199. Kim, K.K. and H.A. Chapman, *Endothelin-1 as initiator of epithelial-mesenchymal transition: potential new role for endothelin-1 during pulmonary fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **37**(1): p. 1-2.
200. Massouh, J. and A. Hata, *TGF-beta signalling through the Smad pathway*. Trends Cell Biol, 1997. **7**(5): p. 187-92.
201. Ge, Q., et al., *TGFbeta1 induces IL-6 and inhibits IL-8 release in human bronchial epithelial cells: the role of Smad2/3*. J Cell Physiol, 2010. **225**(3): p. 846-54.
202. Matsui, F. and K.K. Meldrum, *The role of the Janus kinase family/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in fibrotic renal disease*. J Surg Res, 2012. **178**(1): p. 339-45.
203. Pechkovsky, D.V., et al., *STAT3-mediated signaling dysregulates lung fibroblast-myofibroblast activation and differentiation in UIP/IPF*. Am J Pathol, 2012. **180**(4): p. 1398-412.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

8. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

α -SMA	Alpha Actina de Músculo Liso
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADP	Adenosina trifosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATS	American Thoracic Society
BLM	Bleomicina
BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CCEA	Comité Ético para la Experimentación Animal
Col-1	Colágeno tipo I
Col-3	Colágeno tipo III
CT	Tomografía Computerizada
CTGF	Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo
Cul	Cucurbitacina I Hydrate
D _L CO	Capacidad de difusión de monóxido de carbono por el pulmón
DTPA	Pentacetato de dietilentriamina
EBV	Epstein-Barr Virus
ECM	Proteínas de Matriz Extracelular
EGF	Factor de Crecimiento Epitelial
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
EMT	Transición Epitelio-Mesenquimal
EndoMT	Transición Endotelio-Mesenquimal
EPID	Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusas
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ERGE	Reflujo Gastroesofágico
ERS	European Respiratory Society
ET-1	Endotelina 1
FBP	Filtered Back Projection
FDA	Food and Drug Administration
FEV1	Expiración forzada en un segundo
FOV	Field Of View

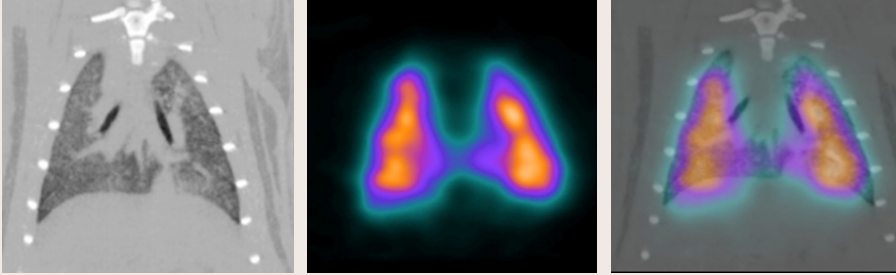
8. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

FPI	Fibrosis Pulmonar Idiopática
FVC	Capacidad Vital Forzada
HPA	Hipertensión Arterial Pulmonar
HP	Hipertensión Pulmonar
HRP	Peroxidasa de Rábano
HU	Unidades Houndsfield
IL	Interleucina
JAK	Janus kinasa
KL	Krebs von den Lungen
LAP	Proteína Asociada a la Activación
LBA	Lavado broncoalveolar
LDH	Lactato Deshidrogenasa
MB	Membrana Basal
MAA	Macroagregados de albúmina
MAP	Proteínas Mitogénicas Activadas
microCT	Tomografía Microcomputerizada
MMP	Metaloproteinasas
NAC	N-Acetilcisteína
OSA	Apnea del Sueño Obstructiva
PIIINP	Procolágeno Tipo III
PASMC	Células Arteriales Pulmonares de Músculo Liso
PBS	Tampón Fosfatos Salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factores de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PET	Tomografía por emisión de positrones
Pi3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
P-STAT	Forma fosforilada de Transducción de Señal de Activación de la Transcripción
PTK	Proteínas Tirosina Quinasas
Q	Perfusión
RIA	Radioinmunoanálisis
ROI	Regiones de Interés
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RT-PCR	Real Time PCR
SEPAR	Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica
SHH	Sonic Hedgehog
SP	Proteína Surfactante

8. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

SPECT	Tomografía computerizada por emisión de fotones simples
SSC	Esclerosis Sistémica
STAT	Transducción de Señal de Activación de la Transcripción
TCAR	Tomografía Computerizada de Alta Resolución
TGF	Factor de Crecimiento Transformante
TLC	Capacidad pulmonar total
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
UIP	Neumonía Intersticial Usual
VD	Ventrículo Derecho
VI	Ventrículo Izquierda
VEGF	Factores de Crecimiento de Endotelio Vascular
V	Ventilación
VOI	Volúmenes de Interés
^{99m} Tc	Tecnecio 99 Metaestable

ESTUDIO DE LA RUTA CELULAR JAK₂/STAT₃ COMO POTENCIAL INHIBIDOR EN EL MODELO DE FIBROSIS PULMONAR



PRESENTADA POR GRACIA HERNÁNDEZ RIBES
DIRIGIDA POR DR. JULIO CORTIJO GIMENO
DR. JAVIER MILARA PAYÁ
DRA. ADELA SERRANO GIMENO
TESIS DOCTORAL DICIEMBRE 2015



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA