



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
Facultad de Medicina
Dpto. de Biología Molecular

**“Fibrosis Pulmonar por Adriamicina.
Implicación de Goodpasture Antigen
Binding Protein (GPBP)
en su patogenia”**

Directores:
Dr. Jesús Merino Pérez
Dr. Ramón Merino Pérez

**Tesis doctoral presentada por Maigualida T. Fernández Rey
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria
Santander, Enero 2013**



Jesús Merino Pérez
Catedrático de Inmunología
Dpto Biología Molecular (Facultad de Medicina)
Vicedecano de Posgrado, Facultad de Medicina
Universidad de Cantabria - IFIMAV
Tf: 942 201956 Faz: 942 201945
e-mail: merinoj@unican.es

Jesús Merino Pérez, Catedrático de Inmunología de la Universidad de Cantabria y Coordinador del grupo de investigación “Inmunopatología”

EXPONE:

Que ha llevado a cabo las funciones de DIRECTOR DE TESIS de la Licenciada en Biología Maigualida T. Fernández Rey durante todos los periodos de su programa de DOCTORADO en el Programa Interdepartamental Biología Molecular y Biomedicina. Durante este periodo ha desarrollado el proyecto de investigación titulado: “Fibrosis Pulmonar por Adriamicina. Implicación de Goodpasture Antigen Binding Protein (GPBP) en su patogenia” compartiendo la dirección científica con el Dr Ramón Merino Pérez, Científico Titular del CSIC, Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, y Profesor Asociado del Dpto de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria.

Lo que hace constar, a efectos de admisión de la Tesis Doctoral, en Santander a siete de enero de dos mil trece.

Fdo: Jesús Merino Pérez



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



INSTITUTO DE BIOMEDICINA Y
BIOTECNOLOGIA DE CANTABRIA

Ramón Merino Pérez, Científico Titular del CSIC, Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, CSIC-Universidad de Cantabria-Sodercan, Profesor Asociado del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICA: que Dña. Maigualida T Fernández Rey, Licenciada en Biología ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado “Fibrosis Pulmonar por Adriamicina. Implicación de Goodpasture Antigen Binding Protein (GPBP) en su patogenia”, cuya parte experimental se ha realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria.

Considero que los objetivos planteados están razonablemente desarrollados y fundamenta las conclusiones a las que se llega. Por lo tanto, el trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación como memoria de doctorado por el interesado, al objeto de poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Santander, 7 de enero de 2013

Ramón Merino Pérez

Ramón Merino
Científico Titular
FACULTAD DE MEDICINA
Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria
merinor@unican.es

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
Avda. Cardenal Herrera Oria, s/n
39011 SANTANDER ESPAÑA
TEL.: 942 201956
FAX.: 942 201903

AGRADECIMIENTOS

En general, a todos los que han andado este camino conmigo, porque todos y cada me habéis enseñado algo. Si no os lo dije nunca, GRACIAS.

A los Dres. Jesús y Ramón Merino, mis directores, por abrirme la puerta de su laboratorio y haber puesto a mi disposición todos los medios necesarios para la realización de esta tesis. Por la paciencia y los ánimos cuando las cosas no estaban bien del todo.

Al Dr Juan Saus y su grupo en Fibrostatin por su generosidad y su inestimable ayuda en el desarrollo de esta tesis. Sin ellos no habría sido posible adentrarse en el mundo de GPBP.

Al Dr. Marcos López Hoyos por su generosidad, su colaboración y su entusiasmo.

Al Dr. Luis Buelta por su ayuda en el análisis de las muestras histológicas, de las que se ven y de las que no se ven (que han sido muchas). Por su buen humor y hacer más fáciles las interminables horas delante del microscopio.

Y ¡cómo no! a mis compañeros de laboratorio, que me han aguantado y de los que he aprendido que con buen ambiente se trabaja mucho mejor. A los que ya no están: a Rosalía, Claudio, Raquel y Kawsar, por hacer menos complicados mis comienzos en el mundo científico. A Esther, por enseñarme la manera correcta de trabajar en un laboratorio y su paciencia explicándome las cosas. A los que están pero no están: a Inés, por su buen humor, su sonrisa constante y todas las risas fuera y dentro del labo. A Ferchu, por ser mi primera compañera de “disfraces para todos los eventos” y las noches de rock. A los que aún comparten poyata conmigo: a Natalia, por ser la máxima experta en el mundo del ratón, por toda su ayuda (que ha sido mucha) y por hacer que las horas del laboratorio sean más amenas (en consejo... Natalia recicla!!! ;D). A Iván, por poner un poco de seriedad en un laboratorio de locos y hacer que sea muy fácil encontrar las muestras que necesito. A Maria, por todos y cada uno de los momentos; por toda la paciencia al explicarme 1001 dudas acerca de la CMF y mi incansable necesidad de intentar detectar “cosas raras” con el citómetro. Por estar a mi lado cuando lo necesito y saber decirme que me calle; por lo vivido y lo que aún nos queda por delante. A Marcos, por estar conmigo desde el principio de esta aventura, por su apoyo, las risas, los bailes y las siestas en el coche, y por su manera única de contar una historia (:D). A Jorge, por ser mi “lado izquierdo” en la mesa, por las noches de baile y por escuchar y compartir mis “rarezas místicas” (¿meditamos? ;)). A los “peques”: Juanje, Thays y Pilar, el futuro está en vuestras manos!!

A nuestros vecinos y compañeros en el “inframundo”. Gracias a todos por ayudarme con el “desagradecido” mundo del WB, por resolver todas mis dudas y entender mis momentos de pánico. A Adán, por su ayuda con los cultivos de ADR y las jornadas de Cine-Forum. A Javi y Ana, por los momentos de ocio fuera y dentro del labo, por hacerme ver que el final de la escritura llega (¡tarde o temprano!). A Lorena, por recibirme siempre con una sonrisa, por cruzar el charco conmigo y las risas durante aquellos días de “book fotográfico urbano” (¡Lorena abre los ojos! :D). A Pauli, la palabra GRACIAS se queda pequeña; por tu apoyo incondicional, por estar a mi lado en todos los momentos buenos y malos; porque sin ti salir a la superficie hubiera sido mucho más difícil; por ayudarme a coger aire, respirar y ver que todo lo malo pasa. Por ser mi AMIGA y una de las personas más importantes en mi vida. Mil gracias pequeña!!

A todo el laboratorio de Bioquímica por recibirme siempre con las puertas abiertas. A los jefes, los Dres. Jose Carlos Rodríguez y Javier León, por la ayuda y todas las veces que he sido “becaria en prácticas” en su laboratorio, y a la Dra Dolores Delgado porque, además, siempre me pregunta “¿qué tal estas?” en el momento oportuno. A Maricarmen (nuestra mañica) porque siempre tiene tiempo para regalar una sonrisa y pararse a ver cómo estoy. A Alfonso y Juan, por estar en los ratos de “esparcimiento ocioso” y hacer que mis conocimientos en cine y manga se incrementen exponencialmente (¡gracias por vuestro lado freak!). A Gabi por introducirme en el mundo de RTqPCR, por ayudarme siempre que lo necesito y por contestar mi larga lista de preguntas (¡Gabi casi podemos ver la línea de meta!). A Manu, mi niño, por conseguir sacarme una sonrisa en cualquier situación; por hacerme sentir especial (aunque sólo sea para escoger una corbata); porque a pesar de la distancia nada ha cambiado y parece que nos veamos cada día; por todas las risas, las noches, las cañas, las meriendas, las películas, las tardes de gym, las discusiones,... Gracias.

A los genéticos, porque siempre me han brindado su ayuda sin dudarlo, por las cenas de becarios compartidas y las noches de fiesta vividas. A Val, porque no hay palabras suficientes; por lo que has sido y por lo que eres ahora; por hacer que nunca me rinda, esta tesis también es tuya; por todos los momentos que has tenido que oír “tengo que ir al labo” y pese a todo devolverme una sonrisa; por tu paciencia infinita y hacerme sentir que por encima de todo eres mi amigo (el mejor de los amigos); soy la persona que soy gracias a tí y un millón de gracias serían insuficientes; por todo y más... Gracias.

A las chicas de Matxalen: Anabel, Delfina, Coral y en especial a Esther, por su apoyo dentro y fuera del labo, por todos los momentos compartidos y por los que nos quedan por compartir (aunque a veces no nos pongamos de acuerdo con el día! :D).

A la gente de micro, en especial a Raquel y Lilian por dedicarme siempre una sonrisa.

A los chicos/as del laboratorio del Dr Juan Carlos Zabala: Javi, Gerardo, Raquel, Laura y Begoña por su ayuda. Danel, por ser mi primer “maestro”, y Xabi, por plantarme en el despacho del “enemigo”.

En general, a todos los del piso de arriba por dejarme usurpar el termociclador de qPCR y devolverme una sonrisa.

Gracias también a Clara, por las infinitas vivencias juntas; por los días de playita y camping, y los “piques” jugando al Tetris; por hacer posibles mis continuos cambios de look y soportar mis “lo quiero más corto” :D. A Maripi porque, aunque estemos meses sin vernos, las cosas nunca cambian entre nosotras, por todas las maneras que tiene de demostrarme su cariño. A Maria Risoto, por todos los momentos de “evasión”, por las pelis y las cenitas en su casa; porque, a pesar de ser “doña pupas”, siempre tiene una sonrisa en la cara. A Rober, por todos y cada uno de los momentos vividos (¡y los que nos quedan!); por las noches “vagabundeando” la ciudad (¿seré una mala influencia? :D); por enseñarme un montón de cositas de mi Tierra... incluso cómo llegar del punto A al B aunque lo haya recorrido 1000 veces (gracias por el mapa de carreteras!! :D). A Irene, por tu buen rollo, los ratos de risas y los bailes (¡aún hoy hay canciones con las que te veo delante de mi moviendo los brazos!). A Nurita e Isma por compartir cenitas “marisqueras” en Santander, pitas y tzatziki por las calles de Atenas, tardes de lluvia y amaneceres en Santorini, noches japonesas en Nueva York, cenitas hogareñas en Londres y además ser capaces de esperarme con una sonrisa cuando “me pierdo” con mi cámara.

A la gente del Pájaro, las Bad Girls y los hermanos Catalán, por todas las risas (que son muchas) y hacer que me olvide de la tesis, al menos un rato. Ya está chicos!

A Angel Laarbi y todas las personas que forman el grupo de eneagrama (mi Tarika) por ayudarme a recorrer uno de los caminos más difíciles de mi vida, conocerme a mí misma. Por que a través de su amor me han hecho ver que podemos ser capaces de todo y que el simple aleteo de una sola mariposa puede cambiar el mundo.

A Mariam por aceptarme desde el principio, con todas mis virtudes y defectos, y hacerme sentir parte de su familia.

A la familia Fernández-Lanza en toda su amplia totalidad. Mil gracias a todos por haberme permitido ver lo grande que es la magia que os rodea y cual es el significado de “formar parte de una familia” que es como una piña. En especial, gracias a Vicente por decirme tantas veces que tengo un duende especial y hacerme sentir como su hija; por ser una de las mejores personas que conozco. Y a Maika, por ser mi segunda mamá y mi amiga; por quererme como me quiere y apoyarme en todo momento; por animarme a seguir luchando en todos los ámbitos de mi vida; por regalarme un sinfín de besos y abrazos eternos y enseñarme que cuando quieres a alguien

hay que decírselo sin ponerte colorado. Gracias.

¡Como no! A mi familia, porque no hubiera llegado hasta aquí sin ellos. A mis padres, por todos los sacrificios hechos, por haber confiado en mí de forma incondicional y hacerme ver que la vida no te regala nada y que el trabajo dignifica; por todas las palabras de consuelo, los abrazos, los besos y las 1000 maneras que tienen que demostrarme su amor. Pero sobre todo, por hacerme sentir que se sienten orgullosos de su hija, sin importar lo lejos que llegue. A Mai “el hermano artista” y a Kimani “el hermano guapo” por aceptarme (a la “hermana cerebrita”) tal y como soy. A Lloana, mi tía-hermana mayor, por estar siempre a mi lado, creer en mí y enseñarme que “El polvo así esté en el aire sigue siendo polvo y el diamante así este en el barro sigue siendo diamante”.

A Igor, por quererme como me quiere. Por bajar al pozo conmigo para levantarme y ayudarme a salir de él; por todos días en los que quería bajarme del mundo y él estaba ahí para enseñarme a llevarlo mejor, con una sonrisa en la cara. Por lidiar con todas mis subidas y bajadas, y pese a todas ellas seguir viendo algo especial en mí. Por hacerme sentir su princesa y complementarme hasta límites insospechados. Por todas “las mañanas de verano” y por recorrer junto a mí el camino a Ítaca. Por todo tu amor... Gracias.

*Para mi familia,
porque siempre veis en mí algo mejor
de lo que yo misma soy capaz de ver.*

*“El mundo en un grano de arena, el paraíso en una flor,
la eternidad en una hora y todo lo existente en la palma de mi mano”*

William Blake

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.

1	La unidad alveolocapilar	29
2	La enfermedad pulmonar intersticial (fibrosis)	30
3	La fibrosis pulmonar idiopática	33
	3.1 Anatomía patológica.....	33
	3.2 Características clínicas.....	34
	3.3 Pronóstico.....	34
	3.4 Tratamiento.....	35
4	Modelos animales de fibrosis pulmonar	36
	4.1 Fibrosis por administración de Bleomicina.....	36
	4.2 Administración IT de FITC.....	37
	4.3 Irradiación.....	38
	4.4 Inhalación de irritantes: Silica y asbesto.....	38
	4.5 Fibrosis pulmonar en animales transgénicos.....	38
	4.6 Adriamicina (ADR), un potencial agente profibrótico en pulmón.....	39
5	Mecanismos patogénicos en la fibrosis pulmonar	40
	5.1 Papel de la TEM y TEndM en la fibrosis pulmonar.....	40
	5.2 Inflamación y fibrosis pulmonar.....	45
	5.2.1 Inmunidad innata y fibrosis.....	45
	5.2.2 Inmunidad adaptativa y fibrosis.....	52
	5.2.2.1 Los linfocitos B y la fibrosis.....	52
	5.2.2.2 Los linfocitos T y la fibrosis.....	53
	• Diversidad funcional de los linfocitos T CD4 ⁺	53
	○ Paradigma TH1/TH2.....	54
	○ Células TH1.....	55
	○ Células TH2.....	55
	○ Células TH17.....	56
	○ Células TH foliculares (THf).....	58
	○ Células T reguladoras (Treg).....	59
	○ Células T reguladoras naturales (nTreg).....	60
	○ Células T reguladoras inducidas (iTreg).....	61
	○ Las células TH1 muestran una actividad anti-fibrótica.....	62
	○ La respuesta tipo TH-2 es un potente promotor de fibrosis.....	63

○ La respuesta tipo TH17 es pro-inflamatoria y pro-fibrótica.....	64
○ Las células Treg pueden tanto suprimir como promover fibrosis.....	65
5.3 Estrés oxidativo y fibrosis pulmonar.....	66
6 Nuevas dianas terapéuticas en fibrosis tisular.....	69
6.1 El Síndrome de Goodpasture.....	69
6.2 GPBP (Goodpasture antigen Binding Protein).....	69
6.2.1 Isoformas de GPBP.....	71
6.2.2 GPBP y glomeruloesclerosis autoinmune.....	72
II. OBJETIVOS.....	73
III. MATERIAL Y MÉTODOS.	
1 Ratones.....	79
1.1 Ratones consanguíneos.....	79
1.2 Ratones mutantes.....	79
1.3 Ratones Knock-out.....	79
2 Mantenimiento y manipulación de los animales.....	79
3 Inducción de fibrosis pulmonar por administración de Adriamicina (ADR).....	80
4 Producción de anticuerpos monoclonales de rata.....	80
4.1 Purificación de los anticuerpos obtenidos por ascitis.....	81
5 Tratamientos.....	81
5.1 Bloqueo <i>in vivo</i> de la acción de las citocinas IL-6 y TGF- β 1.....	81
5.2 Bloqueo <i>in vivo</i> de GPBP.....	81
5.3 Administración de fármacos moduladores de la actividad de GPBP.....	81
6 Estudios anatomopatológicos.....	82
7 Ensayos con suspensiones celulares frescas.....	83
7.1 Lavado bronquio-alveolar.....	83
7.2 Obtención de suspensiones celulares simples de pulmón.....	83
7.3 Recuento de células viables por exclusión de Azul Tripán.....	84
7.4 Detección y cuantificación de poblaciones linfoides mediante citometría de flujo.....	84
7.5 Detección de poblaciones celulares mediante la tinción May-Grünwald-Giemsa.....	86
8 Purificación de ARNm total.....	86
8.1 Determinación de la concentración, pureza e integridad del ARN total.....	87
9 Síntesis de ADNc.....	87
10 Estudios de expresión por RT-PCR cuantitativa a tiempo real (RTqPCR).....	88
11 Estudios <i>in vitro</i> con macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs).....	91

11.1 Diferenciación de BMDMs.....	91
11.1.1 Preparación del medio condicionado L929.....	91
11.1.2 Aislamiento y diferenciación de macrófagos.....	91
11.2 Inducción in vitro de NFkB y NALP3.....	92
11.3 Medida de ROS en BMDM.....	92
11.4 Inmunodetección de NFkB y NALP3 en lisados celulares por Western Blot.....	93
12 Cuantificación de GPBP-1 circulante (cGPBP-1).....	95
12.1 Obtención de muestras de suero.....	95
12.2 ELISA para cuantificación de GPBP-1.....	95
13 Reactivos.....	95
13.1 Tampones.....	95
13.2 Geles.....	96
13.3 Soluciones.....	97
13.4 Medios de Cultivo.....	97
14 Análisis estadístico.....	98

IV. RESULTADOS.

1 Desarrollo del modelo de fibrosis pulmonar por ADR (FPA)	101
1.1 El modelo de fibrosis cutánea inducida por ADR como punto de partida.....	101
1.2 Efectos de la administración intratraqueal de ADR sobre la supervivencia de los animales y las lesiones anatomopatológicas de los pulmones.....	102
1.3 Aumento en la expresión de colágeno I y colágeno IV en el pulmón de los animales tratados con ADR.....	105
2 Estudio de las poblaciones celulares presentes en el exudado pulmonar tras la administración intratraqueal de ADR	106
2.1 Composición celular del BALF de ratones tratados con ADR.....	107
2.2 Estudio de las poblaciones celulares totales aisladas del pulmón completo.....	110
3 Análisis de la expresión de citocinas en el modelo de FPA	112
3.1 Citocinas de la respuesta inmune innata.....	112
3.2 Citocinas y factores de transcripción que caracterizan los subtipos TH1 y TH2.....	113
3.3 Citocinas y factores de transcripción que caracterizan a los subtipos TH17 y Tregs.....	115
4 Papel de la población TH17 en el desarrollo de FPA	117
5 Análisis de la activación <i>in vitro</i> de NFkB en macrófagos estimulados con ADR	119
6 Secreción de IL-1β y análisis de la activación in vitro de Caspasa-1 en macrófagos estimulados con ADR	121

7 Implicación de GPBP en el patogenia de la fibrosis pulmonar inducida por ADR.....	123
7.1 Aumento de la expresión de GPBP durante la inducción de FPA.....	123
7.2 Efectos del tratamiento con AcM específicos anti-GPBP en el desarrollo de FPA.....	124
7.3 Efectos sobre el desarrollo de FPA tras la administración de Pinacidil y Myricetin, dos fármacos inhibidores de GPBP <i>in vitro</i>	127
V. Discusión.....	137
VI. Conclusiones.....	159
VII. Bibliografía.....	163
VIII. Anexos: Publicaciones.....	193

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.1. Estructura de la unidad alveolocapilar.....	30
Figura 1.2. Fibrosis y TEM.....	41
Figura 1.3. La señalización profibrótica de TGF- β es dependiente de la vía Smad.....	44
Figura 1.4. La inflamación y la fibrosis pulmonar.....	46
Figura 1.5. Inmunidad innata y fibrosis.....	50
Figura 1.6. Diferenciación funcional de los linfocitos TH: Modelo clásico del linaje.....	54
Figura 3.1. Modelo de fibrosis cutánea por administración intradérmica de ADR.....	102
Figura 3.2. Efectos de la administración i.t. de ADR en la supervivencia.....	103
Figura 3.3. Apariencia histológica de los pulmones tras la administración de ADR por vía i.t.....	104
Figura 3.4. La elaboración de un score histológico cualitativo muestra que las lesiones son dependientes del tiempo.....	104
Figura 3.5. El desarrollo de lesiones pulmonares tras la administración de ADR es dosis-dependiente.....	105
Figura 3.6. Expresión de colágeno de tipo I y de tipo IV tras la administración de ADR.....	106
Figura 3.7. Las T-CD4 ⁺ presentes en el BALF de pulmones tratados con ADR presentan un fenotipo activado.....	109
Figura 3.8. La tinción Giemsa en el BALF de ratones control y tratados con ADR revela un cambio en las poblaciones presentes en el pulmón.....	110
Figura 3.9. La instilación de ADR conlleva un aumento de la expresión de las citocinas pro-inflamatorias y pro-fibróticas.....	113
Figura 3.10. Aumento de la producción de citocinas TH1 y TH2 tras administración de ADR.....	114
Figura 3.11. Efectos de la administración i.t. de ADR en la expresión de las citocinas TH17 y Tregs.....	116
Figura 3.12. Influencia de la ausencia del receptor de IL-17 y del tratamiento con anti-IL-6 en la curva de mortalidad en los ratones con FPA.....	118
Figura 3.13. Tras la instilación de ADR las lesiones pulmonares presentes en los ratones WT y los ratones IL17R-KO son similares.....	118
Figura 3.14. La sobre-expresión de colágeno tipo I tras la administración de ADR es similar en ratones WT e IL17R-KO.....	119
Figura 3.15. La ADR induce activación de NF κ B <i>in vitro</i>	120
Figura 3.16. La presencia de ADR produce un aumento de la producción de ROS en BMDM <i>in vitro</i>	121
Figura 3.17. La presencia de ADR no induce la producción de IL-1 β y la maduración de Caspasa-1 en BMDMs.....	122
Figura 3.18. La fibrosis asociada a la instilación de ADR por vía endotraqueal conlleva un aumento en la expresión de GPBP.....	124
Figura 3.19. Influencia del tratamiento con anti-GPBPs en la curva de mortalidad en los ratones con FPA....	125
Figura 3.20. Tras la instilación de ADR las lesiones pulmonares presentes en los ratones tratados con AcM específicos anti-GPBP-1 son menores.....	126
Figura 3.21. La sobre-expresión de colágeno tipo I tras el tratamiento con anti-GPBP aparece fuertemente disminuida.....	127

Índice de figuras y tablas

Figura 3.22. Ensayo HTS para actividad quinasa / autofosforilación de GPBP en presencia de distintos fármacos pertenecientes a la Prestwick Chemical Library® (realizado en el lab. del Dr. J. Saus).....	128
Figura 3.23. El fármaco Pinacidil es capaz de reducir las lesiones pulmonares provocadas por ADR, siendo más eficiente a dosis bajas.....	129
Figura 3.24. La expresión de colágeno I se ve reducida tras el tratamiento con dosis bajas de Pinacidil.....	130
Figura 3.25. El tratamiento con Pinacidil reduce la mortalidad inducida por FPA.....	130
Figura 3.26. El área de parénquima afectado tras la administración de ADR se ve disminuido de manera importante cuando administramos el fármaco Myricetin.....	132
Figura 3.27. La expresión de colágeno I disminuye tras el tratamiento con Myricetin.....	133
Figura 3.28. La administración de Myricetin prolonga la supervivencia de los ratones en la FPA.....	133
Figura 3.29. La combinación de Pinacidil y Myricetin no actúa de forma sinérgica en la disminución de colágeno.....	134
Tabla 2.1. Anticuerpos monoclonales para citometría de flujo.....	85
Tabla 2.2. Cebadores para RTqPCR.....	90
Tabla 2.3. Anticuerpos para <i>Western Blot</i>	94
Tabla 3.1. Poblaciones celulares caracterizadas en el BALF de pulmones control y pulmones tras instilación de ADR.....	108
Tabla 3.2. Poblaciones celulares caracterizadas por CMF tras la digestión con colagenasa del pulmón completo en ratones control y ratones tratados con ADR por vía intratraqueal.....	111

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	Concepto
Ac	Anticuerpo
AcM	Anticuerpo monoclonal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ADR	Adriamicina
Ag	Antígeno
APCs	Células presentadoras de antígeno
APC	Alofocianina
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
BALF	Fluido de Lavado Broncoalveolar
BSA	Albúmina sérica bovina
CARD	Dominio de activación y reclutamiento de caspasas
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
DAMPs	Patrones moleculares asociados a peligro
DC	Célula dendrítica
DEPC	Dietil pirocarbonato
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Enzimo-inmunoensayo
EPID	Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa
ET-1	Endotelina 1
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FPA	Fibrosis Pulmonar inducida por Adriamicina
FPI	Fibrosis Pulmonar Idiopática
GAPDH	Enzima Glicer aldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
GPBP	Goodpasture Antigen Binding Protein
H&E	Tinción hematoxilina eosina
IFN	Interferón

Abreviaturas

IL	Interleuquina
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratraqueal
iTreg	Células T reguladoras inducidas
LAP / LTBP s	Proteínas de unión al TGF- β latente
MBA	Membrana basal alveolar
MBG	Membrana basal glomerular
MDP	Muramil dipéptido
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Mss	Tinción tricrómico de Masson
Myr	Myricetin
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NIU	Neumonía Intersticial Usual
NK	Célula asesina natural
NLRs	Receptores tipo NOD
NMS	Suero normal de ratón
NODs	Receptores con dominio de oligomerización de nucleótidos
nTreg	Células T reguladoras naturales
NZW	Ratón <i>New Zealand White</i>
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE	Ficoeritrina
PerCp	Peridin-clorofila α -proteína
PFA	Paraformaldehído
Pin	Pinacidil
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRRs	Receptores de reconocimiento de PAMPs
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
qPCR	PCR cuantitativa
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Temperatura ambiente

SAS	Sulfato amónico saturado
s.c.	Subcutáneo
SI	Sistema Inmune
TBE	Tampón Tris-borato-EDTA
TCR	Receptor antigénico de los linfocitos T
Tg	Transgénico
TGF	Factor de crecimiento transformante
Tfh	Células T <i>helper</i> foliculares
Th	Linfocitos T-CD4 ⁺ colaboradores o <i>helper</i>
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
Treg	Células T reguladoras
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WT	Cepa silvestre (<i>wild type</i>)

INTRODUCCIÓN

1. La unidad alveolocapilar.

La unidad alveolocapilar es la unidad funcional y estructural del pulmón, ya que es el lugar de intercambio gaseoso (Figura 1.1). Los alvéolos, de los que se calcula un número promedio de 480 millones en el adulto, están casi en su totalidad cubiertos por los capilares pulmonares (pudiendo existir hasta 280 millones, o sea, de 500 a 1000 capilares pulmonares por alvéolo). El resultado de este impresionante número de alvéolos y capilares pulmonares es un extenso área de contacto entre unos y otros, probablemente de 50 a 100 m² de superficie disponible para el intercambio gaseoso por difusión.

La superficie alveolar está compuesta principalmente por una fina capa de células epiteliales escamosas, las células alveolares de tipo I, cuyas extensiones protoplásmicas largas tapizan casi por completo la superficie alveolar. Esta célula, cuya función es el sostén mecánico, rara vez se divide y no es muy activa desde un punto de vista metabólico. Las células cúbicas alveolares de tipo II están intercaladas entre ellas, son más grandes y producen la capa líquida que tapiza los alvéolos (el surfactante), siendo metabólicamente más activas. Un tercer tipo de células, el macrófago alveolar fagocítico, se encuentra en números variables en la cubierta extracelular de la superficie alveolar. Estas células patrullan la superficie de los alvéolos fagocitando las partículas extrañas y las bacterias.

El espacio comprendido entre el epitelio vascular y el endotelio capilar es lo que se conoce como intersticio. Se trata de una estructura delgada que consiste en una fusión de las membranas basales de las capas epitelial y endotelial, a un lado del capilar, y la presencia de fibrillas de colágeno y elastina, al otro lado. El tejido intersticial se encuentra en todo el pulmón, especialmente en los espacios perivasculares y peribronquiales. Después de diversas agresiones patológicas este tejido puede engrosarse por deposición de colágeno y elastina, volviéndose rígido o cicatricial. Debido al engrosamiento del tabique alveolar la capacidad de difusión del oxígeno hacia el capilar sanguíneo disminuye. El resultado final es el aumento del trabajo respiratorio y una oxigenación defectuosa de la sangre, característicos de la insuficiencia respiratoria.

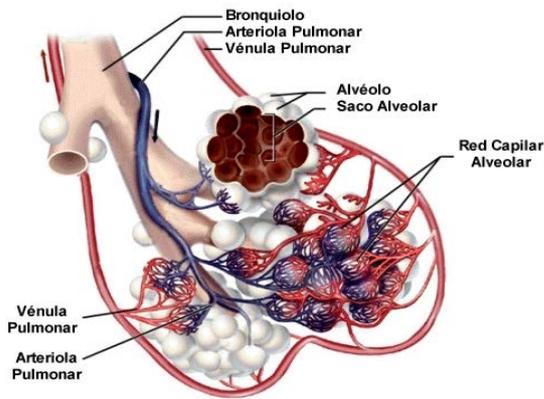


Figura 1.1. Estructura de la unidad alveolocapilar. Cada saco alveolar, o alvéolos, está rodeado por uno o más capilares pulmonares. Esta unidad alveolarcapilar es donde tiene lugar el intercambio gaseoso entre el oxígeno (O_2) y dióxido de carbono (CO_2) con la atmósfera.

2. La enfermedad pulmonar intersticial (fibrosis).

El intercambio gaseoso entre los alvéolos y la sangre capilar pulmonar tiene lugar por difusión. Esta difusión del oxígeno y el dióxido de carbono se produce de forma pasiva, según sus gradientes de concentración a través de la barrera alveolocapilar. Dichos gradientes deben mantenerse en equilibrio gracias a la ventilación de los alvéolos y la perfusión de los capilares pulmonares. Sin embargo, en algunas enfermedades la barrera hematogaseosa se halla engrosada y la difusión está tan retardada que es posible que el equilibrio sea incompleto, contribuyendo a la hipoxia. Estas enfermedades se conocen como enfermedades pulmonares intersticiales y cursan con inflamación o cicatrización (fibrosis) de los pulmones. La fibrosis es un trastorno por el cuál el tejido conectivo fibroso prolifera y se disemina sobre las estructuras orgánicas normales reemplazándolas; dicha reacción es inespecífica y suele ser la consecuencia de un proceso inflamatorio más o menos importante.

Las causas que llevan al desarrollo de las enfermedades pulmonares intersticiales son múltiples, sin bien en febrero de 2002 se alcanza un consenso entre clínicos, radiólogos y patólogos de la *American Thoracic Society (ATS)* y de la *European Respiratory Society (ERS)* que propone la siguiente clasificación según si los mecanismos etiológicos son conocidos o no (2002):

1. Las que tienen una causa identificable o asociadas con otras enfermedades:
 - Neumonitis por hipersensibilidad o alveolitis alérgica extrínseca. Se trata de una reacción de hipersensibilidad que afecta a las zonas más distales del pulmón y que se produce como respuesta a la inhalación de una serie de antígenos. La exposición por lo común es ocupacional e intensa, siendo un buen ejemplo el pulmón del granjero.

- Causadas por polvos inorgánicos (neumoconiosis), como la asbestosis, la silicosis, la siderosis y aquella desarrollada por los mineros del carbón.
 - Inducidas por fármacos o radioterapia. Se ha estimado que entre el 5 y 10% de los pacientes sometidos a quimioterapia desarrollan enfermedad pulmonar relacionada con la misma. Entre los que podemos destacar el tratamiento con Bleomicina, cuya incidencia global de lesión pulmonar es entorno al 10%. Por otro lado, se han descrito casos de toxicidad pulmonar tras la administración de G-CSF / Adriamicina y tras el tratamiento con ciclos de CAF (Ciclofosfamida, Adriamicina, 5-Fluorouracilo), caracterizada por una pérdida de la capacidad de difusión del pulmón para el monóxido de carbono y la inducción de una respuesta celular inflamatoria (Bhalla et al., 2000), (Eisenbeis et al., 2001).
 - Asociadas a colagenopatías. Estas son un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizado por una inflamación secundaria a procesos de origen inmunológico, que pueden afectar a diversos órganos, siendo frecuente la afectación pulmonar. Entre otras enfermedades del tejido conectivo que pueden producir fibrosis pulmonar figuran la esclerodermia, el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide. En los pacientes con esclerodermia (esclerosis sistémica) es posible observar fibrosis intersticial con un patrón restrictivo típico, afectando en torno al 40% de los pacientes. Por otro lado, la afectación pulmonar asociada a la artritis reumatoide se manifiesta sobre todo como pleuritis, nódulos reumatoides y todo un espectro clínico que abarca desde la neumonitis subclínica a la fibrosis intersticial con enfermedad restrictiva (indistinguible de la forma idiopática), vasculitis e hipertensión pulmonar.
2. Las que no tienen causa conocida o neumonías intersticiales idiopáticas:
- La fibrosis intersticial difusa, que incluye la fibrosis pulmonar idiopática y la neumonía intersticial. Se explicará en detalle en el siguiente apartado.
 - La bronquiolitis respiratoria con enfermedad pulmonar intersticial y las neumonías intersticiales, como la neumonía intersticial descamativa y la neumonía intersticial linfocítica, forman un subgrupo de enfermedades raras que comparten una relación clara con el tabaquismo. Los síntomas son leves e incluyen disnea y tos pero puede observarse disnea severa o hipoxemia y no suele observarse hipocratismo.
 - La neumonía organizada criptogénica, cuyo cuadro morfológico muestra una reparación tisular inespecífica con ocupación de espacios aéreos distales por yemas

de tejido fibroinflamatorio laxo que se extiende de un alvéolo a otro, ocasionando una distribución de la afectación parcheada en torno a pequeñas vías aéreas.

3. Primarias o asociadas a otros procesos que no se hallan bien definidos:

- Sarcoidosis. Es una enfermedad multiorgánica que se caracteriza por la presencia de tejido granulomatoso epitelioides en los ganglios linfáticos, los pulmones, la piel, los ojos, el hígado y/o el bazo. Su etiología es desconocida, aunque parece probable que exista una base inmunológica. Además, en la mayoría de las ocasiones presenta una resolución espontánea o mediante el tratamiento con corticoides.
- La proteinosis alveolar. Es una rara enfermedad en la cual un tipo de proteína se acumula en los alvéolos pulmonares, dificultando la respiración. En algunos casos, se desconoce la causa y en otros se encuentra asociada con una infección o un problema inmunitario.
- La microlitiasis alveolar. Se trata de una enfermedad poco frecuente, de causa desconocida y que se caracteriza por la acumulación difusa de cuerpos nodulares calcificados microscópicos, compuestos de fosfato de calcio, conocidos como calcosferitas. Éstos se encuentran inicialmente dentro de los espacios alveolares, presentándose fibrosis intersticial en las etapas de progresión de la enfermedad.
- La linfangiolemiomatosis pulmonar. Es una enfermedad muy rara que afecta sólo a mujeres en edad fértil y que se caracteriza por una proliferación excesiva de músculo liso intersticial pulmonar y la formación de quistes. No se conoce su incidencia y prevalencia, pero probablemente represente menos del 1% de los casos de enfermedades pulmonares difusas.
- Las eosinofiliias pulmonares. Son un grupo heterogéneo de enfermedades que tienen en común la presencia de infiltrados eosinófilos aumentados en sangre periférica y/o parénquima pulmonar. Son enfermedades poco frecuentes y de diagnóstico complejo.

Entre las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes con enfermedad pulmonar intersticial la disnea es la más frecuente, habitualmente acompañada de tos y acentuada con el ejercicio. En las pruebas de esfuerzo, los pacientes muestran una tolerancia reducida al ejercicio a consecuencia de la pérdida del lecho capilar pulmonar, del incremento del grosor de la barrera alveolo-capilar y la reducción del volumen de sangre del capilar pulmonar. La suma de todas estas alteraciones ocasiona un empeoramiento de la mecánica ventilatoria y una disminución de

la eficacia del intercambio gaseoso, que impide que se alcance la ventilación requerida por el incremento metabólico que exige la realización del ejercicio.

3. La fibrosis pulmonar idiopática.

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI), también conocida como fibrosis pulmonar difusa, neumonía intersticial o alveolitis fibrosa criptogénica, es un tipo de enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID) de etiología desconocida y que se caracteriza por el patrón histológico de neumonía intersticial. Algunos médicos reservan el término “fibrosis” para estadios finales de la enfermedad.

La FPI es la más frecuente de las EPID, con una prevalencia estimada entre 5 a 15 casos de cada 100.000 personas y cerca de 175 por cada 100.000 en la población anciana (Rogliani et al., 2008) siendo ésta mayor en los hombres. Además, la supervivencia media estimada es de 3 a 5 años desde el diagnóstico, con escasa o nula respuesta al tratamiento esteroideo e inmunosupresor, siendo la principal causa de muerte la insuficiencia respiratoria.

La etiología de la FPI es desconocida aunque se piensa que sea consecuencia de la interacción de factores ambientales en individuos genéticamente predispuestos. Entre los factores ambientales relacionados con la FPI, cabe destacar el hábito tabáquico, la exposición a polvos de madera y determinados metales y algunos virus (virus de la hepatitis C, adenovirus y virus Epstein-Barr). Se ha postulado que el reflujo gastroesofágico (RGE) podría constituir un factor de riesgo para el desarrollo de FPI debido a que más del 80% de los pacientes con FPI presentan RGE (Adamson, 1976), (Bringardner et al., 2008).

3.1. Anatomía patológica

El patrón histológico típico de la FPI es el de neumonía intersticial usual (NIU), que se caracteriza por una desestructuración difusa de la arquitectura pulmonar, con engrosamiento del intersticio de la pared alveolar, presencia de áreas de depósitos gruesos de haces de colágeno (fibrosis), lesiones quísticas fibróticas (áreas de “panal de abejas”) y la presencia de focos de proliferación fibroblástica (que parecen ser el preámbulo del proceso fibrótico) (Katzenstein and Myers, 1998), (Travis et al., 2000). Cool y cols. postulan además que dichos focos aparecen conectados en un complejo reticular que se extiende desde la pleura interna, sugiriendo que no existen sitios individuales de lesión (Cool et al., 2006).

La inflamación parenquimatosa suele ser leve o moderada, con infiltración de los septos alveolares por linfocitos, células plasmáticas e histiocitos asociados a hiperplasia de los neumocitos tipo II. En algunos pacientes se observa, además, un exudado celular consistente en macrófagos y otras células mononucleares en el interior de los alvéolos en los primeros estadios de la enfermedad; que se denomina “descamación”. Las lesiones son parcheadas y heterogéneas alternando zonas de pulmón normal, con áreas de inflamación, fibrosis y de proliferación fibroblástica (Katzenstein and Myers, 1998), (Travis et al., 2000).

3.2. Características clínicas

Al igual que ocurre en el resto de enfermedades pulmonares intersticiales, en la FPI es imprescindible llevar a cabo una anamnesis exhaustiva y una historia clínica detallada. La historia familiar puede proporcionar información útil (se estima que un 5% de los pacientes con FPI tienen algún otro miembro de la familia afecto). En cuanto a la edad y al sexo, la FPI suele aparecer por encima de los 50 años y es más frecuente en varones. El inicio de la enfermedad suele ser insidioso, siendo la disnea de esfuerzo el síntoma cardinal (Turner-Warwick et al., 1980b). El paciente lo suele atribuir a “la edad” o “no estar en forma”. Por lo general, la disnea es lentamente progresiva, mayor de 3- 6 meses de duración, lo que hace que el enfermo acuda al médico después de semanas o meses de iniciado el proceso patológico. Esto conlleva un retraso diagnóstico en la mayoría de los casos. El otro síntoma destacado que refieren la mayoría de los pacientes es una tos seca, irritativa y molesta, que no suele mejorar tras la toma de fármacos antitusígenos. Por lo general, se auscultan crepitaciones finas en ambos pulmones, sobre todo hacia el final de la inspiración; que en algunas ocasiones pueden acompañarse de un cuadro pseudogripal con fatiga, pérdida de peso y dolores musculares y articulares. La radiografía de tórax convencional muestra típicamente un patrón intersticial o infiltrados reticulonodulares de distribución bibasal y periférica (subpleural).

En la exploración física los pacientes presentan acropaquias o “dedos en palillo de tambor” entre el 20 y el 50% de los casos (Xaubet, 2003). A medida que la enfermedad progresa suelen aparecer signos de insuficiencia cardíaca derecha y de hipertensión pulmonar.

3.3. Pronóstico

Dentro de las neumopatías intersticiales idiopáticas, la FPI es la de peor pronóstico. Trabajos clásicos sobre supervivencia, como el llevado a cabo por el grupo del Royal Brompton Hospital de Londres en 1980, estimaban una supervivencia de un 50% a los 5 años y de un 25%

a los 8 años. El 57% de los pacientes tratados con corticoides manifestaba una mejoría subjetiva de su disnea y, en un 17%, se constató una mejoría objetiva adicional (Turner-Warwick et al., 1980b), (Turner-Warwick et al., 1980a). Desgraciadamente hoy día sabemos que la FPI es una enfermedad progresiva y letal, con un pronóstico infausto y que conduce a la muerte del paciente en la mayoría de los casos. En trabajos recientes, la supervivencia media estimada desde el diagnóstico de los pacientes con FPI es inferior a 3 años, significativamente peor que en otros subgrupos de neumopatías intersticiales crónicas (Hubbard et al., 1998), (Rudd et al., 2007).

3.4. Tratamiento

No existe ningún tratamiento que modifique el pronóstico de la enfermedad. Además, se puede afirmar que no hay evidencia suficiente que justifique el uso rutinario de ningún esquema terapéutico en el manejo de la FPI. Las teorías fisiopatológicas clásicas consideraban que la inflamación pulmonar crónica era el paso previo al desarrollo de fibrosis. Por este motivo durante las últimas décadas el tratamiento de la FPI se ha basado en el uso de fármacos antiinflamatorios (corticosteroides) asociados o no a inmunosupresores (azatioprina o ciclofosfamida). Sin embargo, a pesar de este tratamiento, la mayoría de los pacientes experimentan un deterioro clínico progresivo que les conduce a la muerte en un periodo relativamente corto de tiempo. El documento de consenso elaborado por la ATS y la ERS en el año 2000 estableció como recomendación el uso de corticoides asociados a azatioprina o ciclofosfamida en el tratamiento de la FPI (Zisman et al., 2000). Sólo del 10 al 30% de los pacientes responde a dichos tratamientos y la toxicidad a la que se ven sometidos es sustancial, dando lugar a respuestas parciales o transitorias. Incluso entre aquellos pacientes que responden bien al tratamiento, las recaídas o la progresión de la enfermedad posterior a una respuesta inicial son frecuentes, lo que requiere un tratamiento prolongado (pudiendo desarrollar hepatotoxicidad, osteoporosis, ganancia de peso, hiperglucemia y cataratas). En la mayoría de los casos, los pacientes son remitidos a una unidad de trasplante pulmonar.

Actualmente se considera que el acontecimiento principal en el desarrollo de la FPI es la lesión celular del epitelio alveolar, que estimula el desarrollo de fibrosis, y que la inflamación representa un proceso secundario. En el desarrollo de la fibrosis pulmonar intervienen numerosas citocinas, como la interleuquina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). La liberación de estas citocinas proinflamatorias con capacidad fibrogenética en las fases iniciales de la FPI hace que un objetivo lógico del tratamiento sea una actuación directa en ese nivel, existiendo ensayos clínicos con

fármacos anti-TNF- α , Interferón gamma-1 (IFN- γ 1b), pirfenidona y antagonistas de la endotelina I (bosentán) .

La mejora en la comprensión de la patogénesis de la FPI permite identificar nuevas dianas terapéuticas en la búsqueda de fármacos con propiedades antifibróticas y poner en marcha ensayos clínicos rigurosos y bien diseñados en esta enfermedad.

4. Modelos animales de fibrosis pulmonar

Dado que en humanos el estudio de la FPI es complicado, debido a la multitud de factores desencadenantes y la evolución diferencial de las lesiones, es necesario recurrir al uso de modelos animales que nos permitan identificar los mecanismos implicados en el desarrollo de la fibrosis y desarrollar estrategias terapéuticas más eficaces.

Existen diversos modelos animales de fibrosis pulmonar (o en un sentido más amplio de fibrosis tisular) basados en el empleo de fármacos o de agentes profibróticos o en el desencadenamiento “espontáneo” de fibrosis tras manipulación genética.

4.1. Fibrosis por administración de Bleomicina.

Es el modelo de fibrosis pulmonar más utilizado en la investigación médica y de cuyos mecanismos se tiene un conocimiento más amplio. Dicho fármaco pertenece a un grupo de antibióticos de la familia de las antraciclinas y se aisló originariamente de *Streptomyces verticillatus* (Adamson, 1976), siendo su uso efectivo en la terapia contra linfomas, carcinomas de células escamosas, cáncer testicular, carcinoma esofágico, tumores ováricos de células germinales, osteosarcomas y tumores de piel (Umezawa, 1974), (Bringardner et al., 2008), entre otros. Su mecanismo de acción se sustenta en su capacidad para promover rotura en las cadenas de ADN por la quelación de los átomos de hierro (Lown and Sim, 1977) y daño oxidativo (Sausville et al., 1976). Una producción elevada de especies reactivas de oxígeno puede provocar toxicidad pulmonar mediante una respuesta inflamatoria exacerbada, activación de fibroblastos y consecuente desarrollo de fibrosis (Chaudhary et al., 2006); siendo dicha toxicidad dependiente de la dosis administrada del fármaco.

La Bleomicina induce fibrosis pulmonar en una amplia variedad de animales, entre los que se incluyen ratones, ratas, hámsteres, conejos, perros y primates, cuando se administra por cualquiera de las vías intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intratraqueal (Moore and

Hogaboam, 2008); siendo esta última la más empleada y mejor caracterizada. No obstante, este modelo tiene ciertas limitaciones, especialmente en las diferencias que presenta con respecto a la FPI en cuanto a cronicidad y patogénesis. El desarrollo de fibrosis en este modelo puede observarse tanto bioquímica como histológicamente a día 14 tras la instilación del fármaco, con una respuesta máxima entre los días 21 y 28 (Phan et al., 1983), (Schrier et al., 1983a), (Janick-Buckner et al., 1989b), (Izbicki et al., 2002). Algunos autores apuntan que esta fibrosis se mantiene hasta 60-90 días (Starcher et al., 1978), (Goldstein et al., 1979), (Thrall et al., 1979). En cambio otros encuentran que la respuesta fibrótica inducida por la Bleomicina comienza a resolverse a partir de este período (Phan et al., 1983), (Gharaee-Kermani et al., 2005), (Lawson et al., 2005).

4.2. Administración IT de FITC.

El modelo de fibrosis pulmonar inducida por instilación intratraqueal de FITC fue inicialmente descrito por Robert y cols. en 1995; siendo desarrollado posteriormente por Christensen y cols., quienes demostraron que tanto la estirpe C57BL/6 como BALB/c son susceptibles de evolucionar hacia un estado fibrótico, si bien el último presenta un mayor grado de afectación (Christensen et al., 1999). La instilación de una sola dosis de FITC conlleva un daño pulmonar resultado de la infiltración del intersticio pulmonar por mononucleares y neutrófilos, afectándose principalmente los bronquiolos, que desemboca en un aumento del contenido de colágeno en el pulmón (Christensen et al., 1999), (Moore and Hogaboam, 2008). Esto lleva, en última instancia, al desarrollo de una fibrosis pulmonar parcheada, persistente (al menos 6 meses) y no autolimitante; si bien, no es progresiva como ocurre en la FPI humana. Además, dicha fibrosis es T-independiente, como lo demuestran estudios de depleción de células CD4⁺ o el empleo del modelo en ratones inmunodeficientes (SCID y RAG-KO) (Christensen et al., 1999).

Como inconvenientes de este modelo cabe destacar que la respuesta por parte del pulmón a la instilación del compuesto puede variar dependiendo del lote del producto y que la preparación de la solución es técnicamente complicada, al requerir ciclos de sonicación y agitación (Moore and Hogaboam, 2008), (Degryse and Lawson, 2011).

4.3. Irradiación.

La fibrosis y el daño pulmonar derivados de la aplicación de radiaciones ionizantes están bien descritos en humanos, caracterizándose por edema pulmonar, aumento de la permeabilidad vascular e incremento en el número de leucocitos y macrófagos alveolares (McDonald et al., 1995). En el modelo animal la administración de una dosis única de 12-15 Gy de radiación total desencadena fibrosis pulmonar a las 20 semanas de la exposición (McDonald et al., 1993). La respuesta fibrótica a la radiación viene regulada tanto por la dosis como por el fondo genético del animal, siendo las estirpes más resistentes C3H/HeJ y CBA/J, mientras que C57BL/6 es más sensible (Sharplin and Franko, 1989), (Franko et al., 1996). Además, en este último caso, las hembras son más propensas a desarrollar fibrosis que los machos (Haston and Travis, 1997). En dicho modelo se ha constatado una elevación en los niveles de TGF- β , RANTES (CCL-5), CXCL-10, CCL-2 (MCP-1), CCL-7 y MIP-1y (Johnston et al., 1998), (Johnston et al., 2002). Por otro lado, parece que TNF- α podría estar actuando como un factor regulador, ya que en los ratones C3H aparece sobre-expresado, al contrario de lo que ocurre en los ratones C57BL/6 (Moore and Hogaboam, 2008).

4.4. Inhalación de irritantes: Silica y asbesto.

La instilación de fibras minerales en el pulmón de roedores tiene como resultado la formación de nódulos fibróticos con características similares a los encontrados en humanos. La administración de la sílice en el ratón puede realizarse por vía intranasal (D'Armiento et al., 1992), (Davis et al., 1998), intratraqueal (Olman et al., 1995), (Barbarin et al., 2005) o aspiración orofaríngea (Lakatos et al., 2006). Como ocurre en otros modelos animales, existe debate acerca de la vía de administración óptima y, mientras que unos autores apuntan a que el desarrollo de la fibrosis se produce dentro del primer mes tras la exposición (Lardot et al., 1998), (Lakatos et al., 2006), otros sostienen que son necesarios al menos 65 días (Barbarin et al., 2005). En el caso de la fibrosis inducida por asbesto en ratones, las lesiones se restringen al área subpleural con formación de algún nódulo ocasional y calcificaciones.

4.5. Fibrosis pulmonar en animales transgénicos.

Desde sus comienzos, los modelos con animales transgénicos se han considerado una herramienta particularmente atractiva y han revelado algunas de las consecuencias fisiopatológicas de la sobreexpresión de genes humanos o murinos sobre el desarrollo de fibrosis. Existen numerosos ejemplos, pero los más citados incluyen la sobreexpresión de TGF- β

humano dirigida por el promotor de la *proteína C* del surfactante pulmonar (Korfhagen et al., 1994), la sobreexpresión de PDGF-B dirigida por el promotor SP-C (Korfhagen et al., 1994) y la sobreexpresión de IL-11 e IL-13 dirigida por el promotor CC10 (Zhu et al., 1999). Cada una de estas estirpes altera un elemento clave para la remodelación pulmonar y el desarrollo de fibrosis, que en el caso de la IL-13 lleva a unas altas tasas de morbilidad y mortalidad en el ratón. El mayor inconveniente del empleo de ratones transgénicos en modelos de fibrosis pulmonar es que en la mayoría de ellos se genera un ambiente pulmonar “artificial”, que podría tener poco que ver con la naturaleza multifactorial de la fibrosis pulmonar humana.

Como se ha podido apreciar por lo anteriormente expuesto, una de las mayores desventajas de la ausencia de un modelo experimental estándar en la inducción de fibrosis pulmonar en animales es la variabilidad intrínseca en los resultados y su limitada aplicación a la enfermedad humana. Algunos de estos modelos mimetizan el perfil de citocinas o las manifestaciones anatomopatológicas, mientras que otros reproducen las poblaciones celulares observadas en la FPI humana. Sin embargo, ninguno de ellos es capaz de recrear el patrón clínico completo. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos modelos experimentales de fibrosis pulmonar tiene un gran interés.

4.6. Adriamicina (ADR), un potencial agente profibrótico en pulmón.

La ADR, también conocida como Doxorubicina, es otro antibiótico de la familia de las antraciclinas que también tiene aplicación en quimioterapia antitumoral. Se usa habitualmente en el tratamiento de algunas leucemias y en el linfoma de Hodgkin, así como en otros tipos de cáncer. Ataca sólo a células que están en ciclo celular, a través de un efecto directo en la doble cadena de ADN. Su uso clínico se ve limitado principalmente por la toxicidad cardíaca aguda y crónica (Singal et al., 1987), (Singal and Iliskovic, 1998). Además, la toxicidad de la ADR puede implicar también a otros tejidos como la piel, los riñones, los pulmones, el hígado y el músculo esquelético (Julicher et al., 1988), (Minchin et al., 1988), (Meadors et al., 2006), (Injac and Strukelj, 2008). Robert T. Dorr y cols. ya describieron en 1980 que la administración intradérmica de ADR en ratones provoca toxicidad tisular en la piel, con un engrosamiento de la dermis similar a la observada en humanos. Por lo tanto, aunque hay escasos datos en la literatura sobre la capacidad de la ADR para inducir fibrosis pulmonar, es un fármaco con un potencial interés experimental en este sentido.

5. Mecanismos patogénicos en la fibrosis pulmonar.

Independientemente de la causa de la enfermedad, una característica común a todos los tipos de fibrosis, incluida la FPI, es la expansión y activación de miofibroblastos responsables directos de la producción y acúmulo excesivo de matriz extracelular (MEC) (Postlethwaite et al., 2004), (Herzog and Bucala, 2010). El origen exacto de dichos miofibroblastos no está perfectamente caracterizado aunque puede ser múltiple. Por un lado, puede ser secundario a la proliferación y activación de fibroblastos residentes en el estroma o en las áreas perivasculares de los tejidos afectados en respuesta a las agresiones externas (Postlethwaite et al., 2004). Un segundo origen potencial es mediante el reclutamiento de precursores fibroblásticos que emigran desde la médula ósea en respuesta a la liberación de factores quimiotácticos por parte del tejido afectado. Estos precursores, denominados fibrocitos, representan una población de células CD34⁺ capaces de producir colágeno de tipo I (Bellini and Mattoli, 2007), (Herzog and Bucala, 2010). Por último, los miofibroblastos implicados en la patogenia de los procesos fibróticos pueden proceder de la transformación fibroblástica de células de los epitelios y/o endotelios de los tejidos afectados mediante una serie de procesos globalmente conocidos como transición epitelio-mesénquima (TEM) o endotelio-mesénquima (TEndM) (Chapman, 2011), (Piera-Velazquez et al., 2011).

5.1. Papel de la TEM y TEndM en la fibrosis pulmonar.

La TEM es un proceso biológico que permite la conversión de células epiteliales polarizadas que interaccionan con membranas basales en células mesenquimales con capacidad migratoria e invasiva, con una alta resistencia a la apoptosis y productoras de componentes de la MEC tales como colágeno I, III y IV, fibronectina, lamininas, elastina y tenacina (Kalluri and Neilson, 2003). Este fenómeno indicativo de la gran plasticidad fenotípica de las células epiteliales, es frecuente durante el desarrollo de los vertebrados (TEM de tipo I) y se mantiene silente en la etapa adulta de los organismos. No obstante puede reactivarse en diferentes procesos fisiológicos o patológicos tales como la cicatrización fisiológica, la regeneración tisular o la fibrosis patológica (TEM de tipo II) y la metastatización tumoral (TEM de tipo III). La TEM es el resultado de la puesta en marcha de una maquinaria molecular que incluye la activación de factores de transcripción, la reorganización y expresión de proteínas del citoesqueleto, la producción de enzimas que degradan la MEC y cambios en la expresión de micro-RNAs específicos (Figura 1.2).

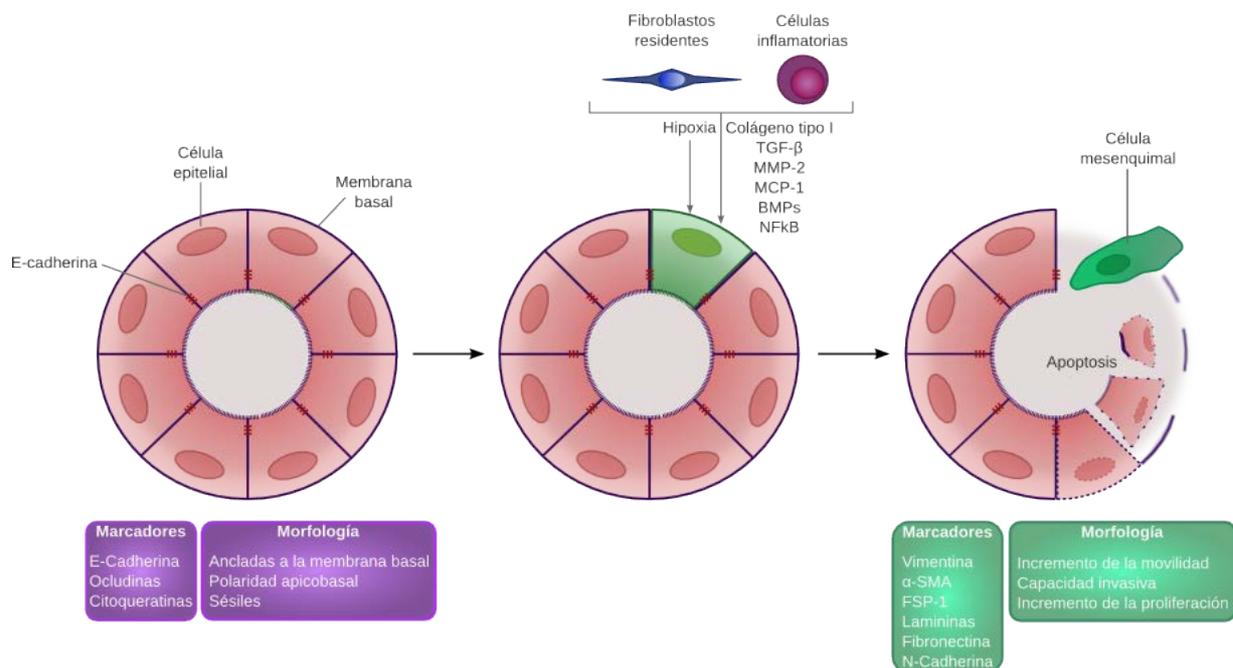


Figura 1.2. Fibrosis y TEM. Se ha detectado en modelos murinos de fibrosis hepática y renal que más de un 40% de las células α -SMA⁺ son miofibroblastos secretores de colágeno generados a partir de TEM, demostrándose que surgen de la diferenciación de progenitores epiteliales locales a través de la TEM. Ésta se induce a través de la generación de numerosas moléculas por parte de células inflamatorias y fibroblastos residentes en el tejido (miofibroblastos); incluyendo NFκB, TGF-β1, proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1). Dichas moléculas provocan la ruptura de las capas endoteliales a través de la degradación de la membrana basal. Así, las células epiteliales pierden su polaridad y, o bien sufren apoptosis (destino mayoritario) o bien se induce TEM.

Un proceso análogo a la TEM es la TEndM mediante el cual las células endoteliales asociadas a la microvasculatura pueden transformarse en miofibroblastos productores de MEC (Piera-Velazquez et al., 2011). Como se comentará posteriormente tanto la TEM como la TEndM que acontecen en el curso de la fibrosis tisular se desencadenan en el contexto de una reacción inflamatoria y están mediados por TGF-β (Iwano et al., 2002), (Willis et al., 2005), (Kim et al., 2006), (Paruchuri et al., 2006), (Derynck and Akhurst, 2007). Las pruebas que demuestran de forma más fehaciente la participación directa de la TEM y TEndM en la patogenia de la fibrosis tisular proceden del estudio de animales transgénicos portadores de genes reporteros en configuración germinal regulados por promotores específicos de células epiteliales o endoteliales. El estudio de estos animales en modelos de fibrosis renal mostró que aproximadamente el 12% de los fibroblastos productores de MEC en el tejido fibrótico procedían de precursores de la médula osea, un 30% de fenómenos de TEM y un 35% de fenómenos de TEndM (Kalluri and Neilson, 2003), (Zavadil and Böttinger, 2005). Estos estudios iniciales se han extendido a otros

modelos de fibrosis tisular tales como la fibrosis pulmonar tras instilación endotraqueal de Bleomicina, demostrando la participación relevante de estos dos fenómenos en el desencadenamiento del proceso patológico (Kim et al., 2009a), (Hashimoto et al., 2010). La identificación de células que co-expresan marcadores epiteliales y mesenquimatosos en las lesiones anatomopatológicas de pacientes con FPI indica que la TEM también está involucrada en la patogénesis de esta enfermedad (Kim et al., 2006), aunque la contribución exacta de este proceso al número total de miofibroblastos productores de MEC no ha sido aún determinada.

Múltiples estudios en diferentes modelos experimentales de fibrosis han demostrado el papel central de TGF- β en el desencadenamiento de la TEM y TEndM. Esta citocina se secreta en una forma latente no activa unida no-covalentemente a un polipéptido denominado LAP (latency-associated peptide) que secuestra el sitio activo de TGF- β y lo une a la MEC, principalmente a la fibronectina (Fontana et al., 2005) (Figura 1.3). Los TGF- β s señalizan en las células diana a través de receptores de membrana específicos. Se han descrito 3 tipos de receptores de TGF- β s: tipo I, tipo II y tipo III (Lin and Moustakas, 1994). Los receptores tipo I y tipo II son los responsables directos de la transducción de la señal. El receptor de TGF- β s tipo III, también conocido como betaglicano, posee en su región extracelular varios sitios de unión de alta afinidad para las diferentes isoformas de TGF- β , facilitando la interacción de los TGF- β s con los receptores tipo II (López-Casillas et al., 1993), (Esparza-Lopez et al., 2001), (Kirkbride et al., 2008). Los receptores de TGF- β tipo I y II son moléculas de membrana con actividad quinasa en serina y treonina, siendo responsables directos de la transducción de la señal al interior de la célula (Wrana et al., 1994). Dentro del complejo ligando-receptores, el receptor tipo I es el responsable final de la señalización mediada por TGF- β s y por lo tanto es el que determina la especificidad de la misma (Heldin et al., 1997). Una vez activado, el receptor tipo I transduce la señal mediante la fosforilación de miembros de la familia Smad (Moustakas et al., 2001) (Figura 1.3). Desde el punto de vista funcional se distinguen tres grupos de Smads. El primer grupo está compuesto por los Smads específicos de receptor tipo I. Dentro de este grupo, los responsables de la señalización de TGF- β s son Smad-2 y Smad-3 (Massagué and Chen, 2000) que interactúan directamente con los receptores de la superfamilia TGF- β de tipo I, siendo activados mediante fosforilación del motivo SXS en su región carboxi-terminal (formado en el caso de Smad-3 por los residuos Ser423/425). El segundo grupo de Smads está formado por los Smads comunes a todas las vías y está compuesto por un único miembro; Smad-4. Una vez fosforilados/activados, los Smads específicos de receptor forman complejos con Smad-4. Dichos complejos se translocan entonces al interior del núcleo de la célula diana y allí regulan la transcripción génica, directamente, como factores de transcripción, o interaccionando con otros factores de transcripción (Massagué and Chen, 2000). Por último, se distingue un tercer grupo de Smads con

función inhibitoria. Este grupo de Smads inhibidores (anti-Smads) actúan, bien impidiendo la interacción entre los receptores tipo I activados y los Smads específicos de receptor o bien bloqueando la interacción entre los Smads específicos de receptor con Smad-4. Dentro de estos anti-Smads, Smad-7 es un inhibidor de la señal de TGF- β (Schmierer and Hill, 2007). Aparte de esta ruta de transducción canónica, los TGF- β s inducen la activación de otras rutas de transducción de señal entre las que se encuentran las rutas de las MAPK, PI3K-AKT y NF κ B (Heldin et al., 1997), (Massagué and Chen, 2000), (Zhang, 2009). Asimismo, el receptor de TGF- β de tipo II promueve la fosforilación de PAR6 que, a través del reclutamiento de la ubiquitin-ligasa E3 y SMURF1, promueve la degradación de RHOA (Ozdamar et al., 2005), (Viloria-Petit et al., 2009). Esto conduce a la disolución de las denominadas “tight-junctions” en las células epiteliales (Ozdamar et al., 2005), (Viloria-Petit et al., 2009).

Aunque existen controversias al respecto, la teoría patogénica predominante en la FPI y en los modelos experimentales de fibrosis pulmonar indica que un proceso inflamatorio resulta en el reclutamiento de elementos de la inmunidad innata y adaptativa (ver posteriormente) que desencadenan los procesos de TEM y TEndM mediante la liberación de un gran número de citocinas y factores de crecimiento entre los que destaca el TGF- β (Iwano et al., 2002), (Willis et al., 2005), (Kim et al., 2006), (Paruchuri et al., 2006), (Derynck and Akhurst, 2007). Asimismo, el proceso inflamatorio puede inducir la producción de TGF- β latente por las células epiteliales alveolares y su posterior activación por un mecanismo dependiente de la integrina $\alpha\beta$ 6 (Munger et al., 1999). La activación por estímulos pro-inflamatorios de la integrina $\alpha\beta$ 6 presente en las células epiteliales promueve su unión con el TGF- β latente a través de un dominio RGD presente en LAP e induce un cambio en esta citocina hacia una conformación activa capaz de interaccionar con sus receptores específicos (Munger et al., 1999). Estudios recientes muestran que, aparte de las células epiteliales alveolares, las células dendríticas (DC) y fibroblastos residentes pueden unir TGF- β latente y activarlo por un mecanismo similar al descrito anteriormente que implica a las integrinas $\alpha\beta$ 8 y $\alpha\beta$ 5, respectivamente (Araya et al., 2006), (Travis et al., 2007), (Wipff et al., 2007), (Scotton et al., 2009). A su vez, el entorno rico en TGF- β activo, citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y metaloproteasas tales como MMP-2, MMP-3 y MMP-9, induce activación de la señalización por TGF- β dependiente de integrinas que actúa en células epiteliales tras la pérdida de sus contactos interepiteliales. En este contexto se forman complejos supramoleculares que contienen E-cadherina, β -catenina, la integrina $\alpha\beta$ 1 y receptores de TGF- β , capaces de generar módulos transcripcionales de β -catenina fosforilada en la tirosina 654 y Smad-2 fosforilada (Kim et al., 2009b). Estos complejos se traslocan y acumulan posteriormente en el núcleo y potencian la reprogramación de las células epiteliales hacia células migratorias con fenotipo mesenquimatoso. Estudios en biopsias de pacientes con FPI muestran

que la mayoría de los miofibroblastos de los focos fibróticos muestran niveles elevados de β -catenina fosforilada en la tirosina 654 a nivel nuclear (Kim et al., 2009b), sugiriendo que esta ruta de señalización por TGF- β dependiente de integrinas también está activada en estos pacientes. Por último, cabe destacar que aparte de la participación de las rutas de trasducción canónicas de TGF- β y de Wnt descritas anteriormente, en la fibrosis pulmonar también se han involucrado rutas de TGF- β no canónicas que implican la activación de MAPK (Davies et al., 2005), (Docherty et al., 2006), (Alcorn et al., 2008) o PAR6 (Ozdamar et al., 2005).

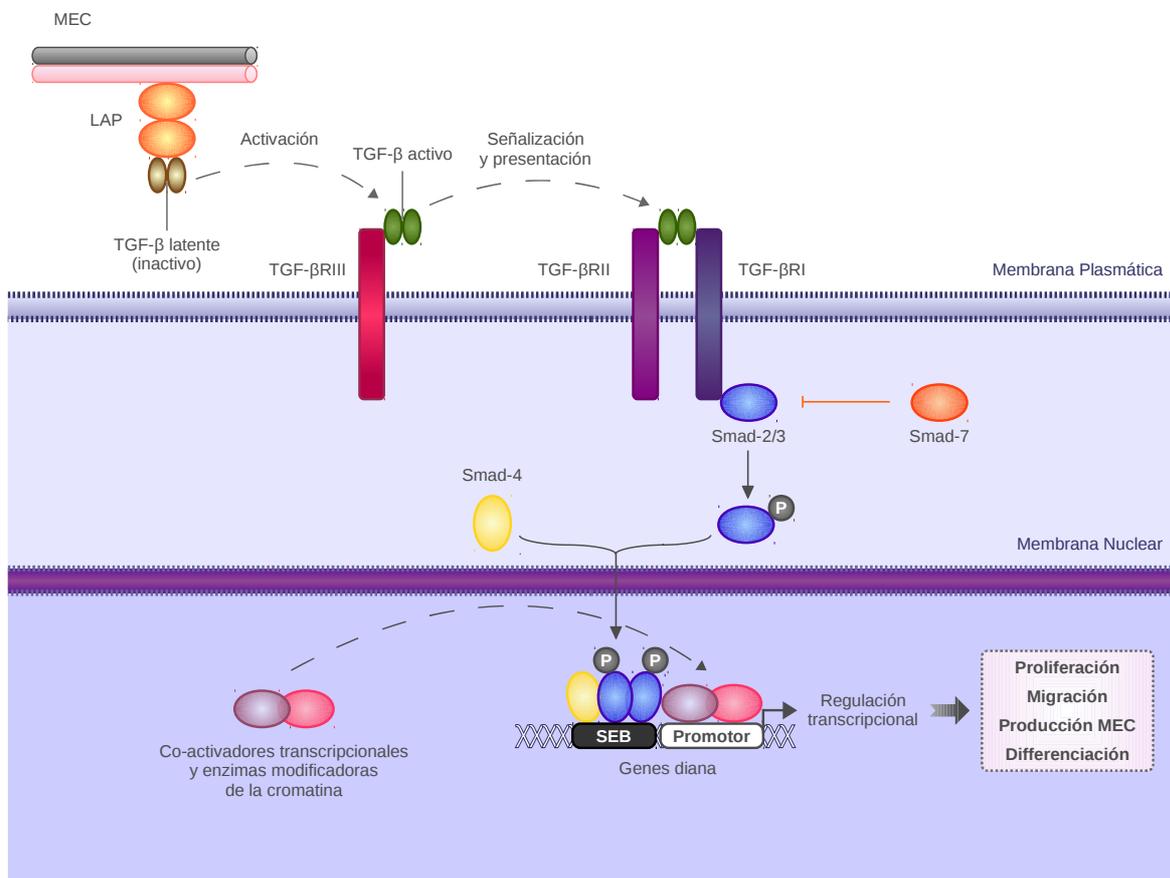


Figura 1.3. La señalización profibrótica de TGF- β es dependiente de la vía Smad. La matriz extracelular (MEC) actúa como reservorio de la forma latente de TGF- β , que se mantiene en forma inactiva gracias a la unión con proteínas LAP. Tras la activación, el TGF- β se une a sus receptores de superficie celular y desencadena una transducción de señales intracelulares mediada por Smad. Estas proteínas Smad activadas se acumulan en el núcleo y se unen a elementos reguladores conservados (SBE) de genes diana; además, reclutan co-activadores de la transcripción y enzimas modificadoras de la cromatina, tales como AP-1 y p300/CBP, induciendo de este modo la síntesis de RNAm y diferentes respuestas celulares. La proteína inhibidora Smad-7 bloquea la fosforilación de las proteínas Smad inducida por ligando, apagando la señalización mediada por Smad.

5.2. Inflamación y fibrosis pulmonar.

Como se comentó anteriormente la teoría patogénica predominante de la FPI defiende el papel preponderante de la inflamación tanto en el desencadenamiento como en la cronificación de la fibrosis pulmonar. Esta teoría ha sido cuestionada por algunos autores basándose fundamentalmente en el escaso efecto de los tratamientos inmunosupresores, principalmente aquellos con corticosteroides, en la evolución y pronóstico de la FPI (Davies et al., 2003), (Richeldi et al., 2003). Sin embargo, es absolutamente innegable que un gran número de elementos celulares y solubles de la respuesta inmune innata y adaptativa están presentes durante todas las fases del desarrollo de la fibrosis tisular (Figura 1.4). A continuación se resumirán los mecanismos más importantes mediante los cuales el sistema inmune contribuye a la patogenia de esta enfermedad. Los estudios que describiremos están realizados principalmente en modelos experimentales animales de fibrosis tisular que en la medida de lo posible se intentará poner en relación con estudios clínicos en humanos.

5.2.1. Inmunidad innata y fibrosis.

El primer mecanismo de defensa que se pone en marcha durante una lesión es el sistema de la coagulación. Tras un daño endotelial las plaquetas circulantes se activan tras el encuentro con colágeno y el factor de von Willebrand en la capa subendotelial. La activación plaquetaria conduce a la liberación de PDGF (*platelet-derived growth factor*), un potente factor quimiotáctico, y TGF- β que como se comentó en el apartado precedente induce TEM (Esmon, 2005), (Barrientos et al., 2008). Por otro lado, la trombina o factor Xa induce la producción de la quimiocina CCL2 y promueve la activación de la integrina $\alpha v \beta 6$ en las células epiteliales del pulmón (Coughlin, 2000), (Xu et al., 2009). En este sentido, la inhibición de la trombina inhibe el desarrollo de fibrosis pulmonar por Bleomicina en roedores y su actividad está incrementada en pacientes con FPI (Scotton et al., 2009).

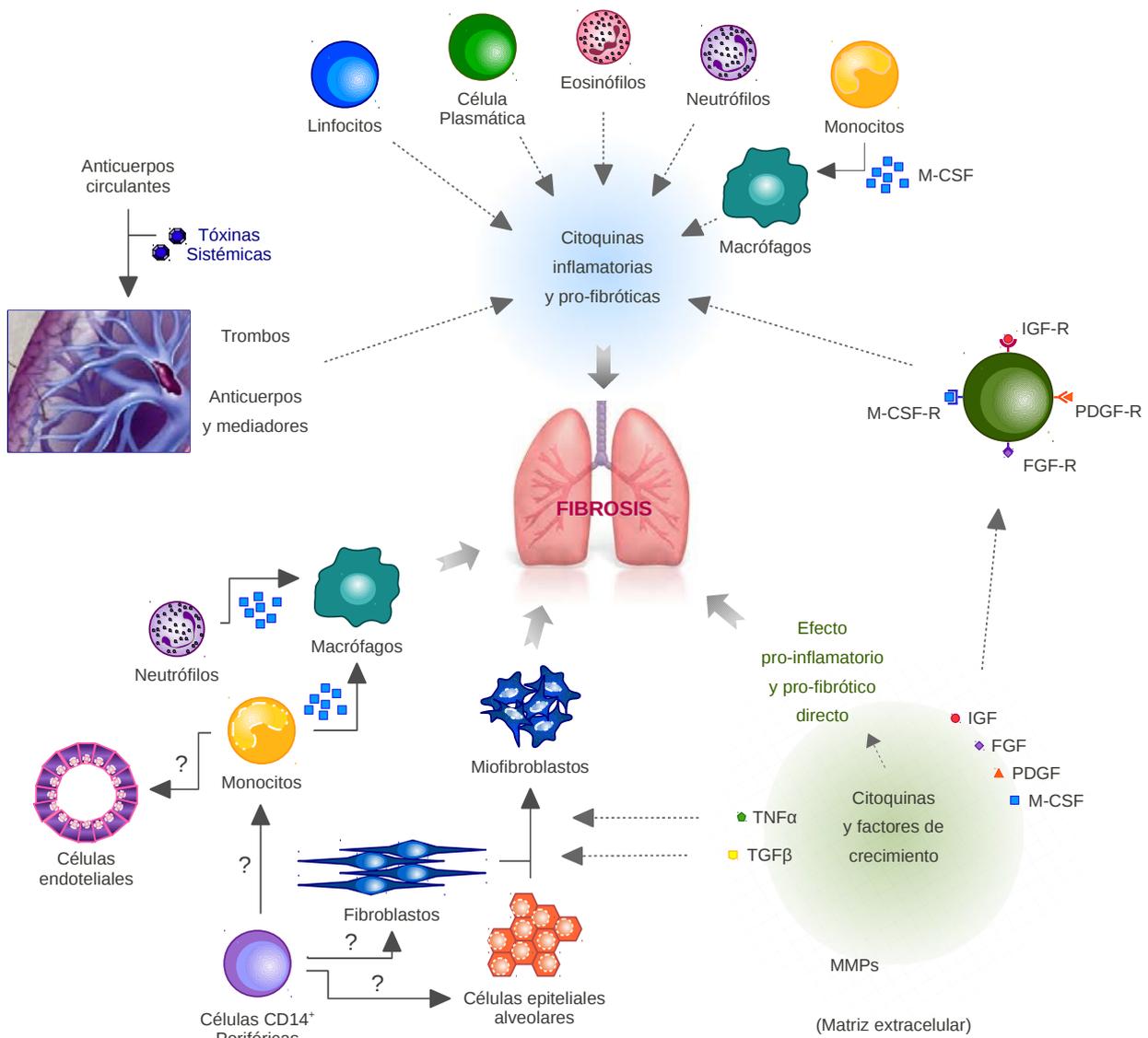


Figura 1.4. La inflamación y la fibrosis pulmonar. Numerosos mediadores de la inflamación han sido descritos en la patogénesis de la FPI. Las células inflamatorias pueden inducir un daño directo sobre los tejidos a través de sustancias como elastasas, citoquinas y factores de crecimiento; además, estos mediadores quedan “atrapados” en la matriz extracelular pulmonar, lo que conduce a un mecanismo de reparación tisular prolongado y amplificado que se traduce en el fenotipo fibrótico. Por otro lado, algunos tipos celulares que expresan en su superficie receptores del factor de crecimiento son capaces de proliferar sin control en este entorno, lo que resulta en la activación y la amplificación de la cascada inflamatoria. De igual modo, numerosos tipos de células pueden diferenciarse en otros tipos celulares (por ejemplo, las células epiteliales a células mesenquimales (TEM), los neutrófilos y los monocitos a macrófagos, etc.), y esta diferenciación tiene como resultado interacciones complejas entre los mediadores de la inflamación, los factores de crecimiento y otros factores no identificados.

Además de su papel en la cascada de la coagulación, las plaquetas y los epitelios o endotelios lesionados secretan una amplia gama de factores quimiotácticos que inducen el reclutamiento al foco inflamatorio de monocitos y neutrófilos. Una vez en el foco inflamatorio y tras su activación los monocitos se transforman en macrófagos, responsables de la fagocitosis de los agregados de fibrina y restos celulares. Fragmentos de la MEC tales como hialuronato son capaces de estimular la producción de citocinas pro-inflamatorias por los monocitos activados y macrófagos favoreciendo el proceso fibrótico (Li et al., 2011). El papel patogénico de los macrófagos en el desarrollo de fibrosis ha sido demostrado recientemente. Así, la eliminación temprana de esta población celular se acompaña de una reducción importante en el desarrollo de fibrosis hepática en un modelo experimental en ratones (Duffield et al., 2005).

Diversos estudios han demostrado la existencia de dos subpoblaciones principales de macrófagos dependiendo del ambiente de citocinas en el que se encuentran, que resulta en una marcada diferenciación funcional; los macrófagos M1 o macrófagos de activación clásica y M2 o macrófagos de activación alternativa (Sandor et al., 2003), (Martinez et al., 2008) (Figura 1.5). La activación clásica de macrófagos está inducida por IFN- γ , y se caracteriza por la expresión de IL-1 β , IL-6, TNF- α y óxido nítrico. Gordon y cols. describieron que los macrófagos activados con IL-4 (o IL-13) desarrollan un estado de activación alternativa, diferente a la que presentan los macrófagos activados de forma clásica (M1) (Gordon and Taylor, 2005). Estudios *in vitro* e *in vivo* en ratones han demostrado que este fenotipo se caracteriza por una expresión elevada del receptor de manosa (CD206), la proteína de unión a lectina YM1, la molécula- α tipo resistina (Relm- α , también conocida como FIZZ-1), antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, la quimiocina CCL18 y la enzima arginasa-1 (Arg-1) (Prasse et al., 2006), (Migliaccio et al., 2008), (Gordon and Martinez, 2010). La expresión de Arg-1 por parte de las células M2 es de particular interés ya que esta enzima controla la producción de L-prolina, requerida para la síntesis de colágeno por miofibroblastos activados (Hesse et al., 2001). Por otro lado, se ha implicado a las células M2 en el desarrollo de las respuestas efectoras de las células T-CD4+ de tipo 2 (TH2), en la producción de citocinas fibrogénicas, la supresión de las respuestas tipo M1 y el reclutamiento de fibrocitos (Song et al., 2000), (Sun et al., 2011). Ya que se observan frecuentemente durante el pico de la respuesta inmune profibrótica, se ha planteado que los macrófagos M2 podrían actuar como inductores importantes de la reparación tisular y la fibrosis. En este sentido, varios modelos animales de fibrosis pulmonar han demostrado que los macrófagos alveolares presentan un fenotipo compatible con la activación alternativa (M2) (Mora et al., 2006), (Murray et al., 2010), (Murray et al., 2011). Del mismo modo, los datos obtenidos en pacientes con fibrosis pulmonar muestran que las células M2 son el fenotipo predominante. En comparación con los controles sanos, los macrófagos alveolares de pacientes con FPI muestran

un incremento en la expresión de CD206, y generan espontáneamente niveles más elevados de las citocinas pro-inflamatorias CCL17, CCL18 y CCL22 (Prasse et al., 2006), (Pechkovsky et al., 2010). Igualmente, estudios inmunohisquímicos y de expresión de proteínas en el pulmón de pacientes con FPI demuestran un aumento en la expresión de la Arg-1 en comparación con los controles sanos (Mora et al., 2006).

A pesar de estas evidencias a favor de un papel patogénico relevante de los macrófagos M2 en el desarrollo de fibrosis pulmonar, estudios realizados en ratones con una deficiencia condicional de la cadena α del receptor de IL-4 en células mieloides, incluidos macrófagos M2, han demostrado que esta población macrofágica no está implicada en el desarrollo de fibrosis hepática tras infección con *Schistosoma mansoni* dependiente de linfocitos TH2 (Herbert et al., 2004). Otros estudios en ratones deficientes en Arg-1 sugieren que las células M2 productoras de este enzima se requieren para la supresión y la resolución de fibrosis (Pesce et al., 2009). De hecho, las evidencias experimentales apuntan hacia el hecho de que esta población de macrófagos podría competir con los linfocitos TH2 y los fibroblastos por la L-arginina, requerida para la producción de poliaminas y L-prolina, que actúan regulando el crecimiento celular y la síntesis de colágeno, respectivamente (Pesce et al., 2009). Dicha actividad inhibidora presente en los macrófagos M2 es también coherente con otros estudios que demuestran su capacidad inductora de células Treg (Murray and Wynn, 2011); que han sido implicadas, a su vez, en la supresión de la fibrosis. De este modo, en lugar de promover la fibrosis, las células M2 parecen utilizar múltiples mecanismos para inhibir la síntesis de MEC por miofibroblastos.

Otras células de la inmunidad innata también se han asociado a la aparición de lesiones fibróticas. En este sentido, los neutrófilos se han involucrado en la fibrosis pulmonar por Bleomicina y en la neumonitis inducida por hipersensibilidad en ratones, siendo posible su implicación también en el desarrollo de FPI (Pardo et al., 2000) (Figura 1.5). Por otro lado, estudios en ratones demuestran que los mastocitos pueden actuar como inductores de la esclerosis sistémica, la fibrosis renal provocada por el trasplante de riñón o la fibrosis desarrollada en el ventrículo izquierdo en corazones hipertensos. Además, otros estudios realizados en ratas han sugerido que los mastocitos son capaces de inducir fibrosis mediante el reclutamiento de leucocitos inflamatorios y la producción de mediadores profibróticos (Levick et al., 2009). A pesar de que los eosinófilos han sido asociados comúnmente con el desarrollo de fibrosis pulmonar (Humbles et al., 2004), se ha podido establecer una asociación entre el aumento del número de eosinófilos y la activación de miofibroblastos en fibrosis cutánea, fibrosis hepática y fibrosis retroperitoneal idiopática (Levi-Schaffer et al., 1999), (Reiman et al., 2006). Por otro lado, la presencia eosinofílica en el lavado broncoalveolar de pacientes con FPI resulta ser

un marcador predictivo de la progresión de la enfermedad (Peterson et al., 1987). En este sentido, los eosinófilos parecen funcionar de manera similar a los mastocitos, ya que son fuentes importantes de TGF- β 1 e IL-13 (Minshall et al., 1997), (Reiman et al., 2006). Finalmente, aunque los basófilos presentan una función menos clara que el resto de las poblaciones mieloides en el desarrollo de la fibrosis, con frecuencia se encuentran en grandes cantidades en pacientes con enfermedad pulmonar intersticial (Gilbert, 1984). Se cree, además, que estas células son una fuente importante de citocinas de tipo 2, lo que sugiere que podría actuar como inductores importantes de la fibrosis dependiente de IL-4 y/o IL-13.

Varios factores de crecimiento y citocinas secretadas por células de la inmunidad innata (incluyendo macrófagos, neutrófilos, mastocitos y eosinófilos) están emergiendo como dianas potenciales en la terapia anti-fibrótica; en concreto, TNF- α e IL-1 β en el control de enfermedades fibróticas pulmonares (Zhang et al., 1993). En este sentido, ratones que sobre-expresan TNF- α o IL-1 β en el pulmón desarrollan una fibrosis pulmonar progresiva (Miyazaki et al., 1995), (Kolb et al., 2001). También se ha encontrado un aumento en los niveles de TNF- α en pacientes con FPI (Nash et al., 1993), (Piguet et al., 1993a), (Hasegawa et al., 1997), (Ziegenhagen et al., 1998) y en modelos animales de fibrosis pulmonar (Piguet et al., 1989), (Phan and Kunkel, 1992), (Piguet et al., 1990), (Thrall et al., 1997), (Ortiz et al., 1998); mientras que los polimorfismos en el gen que codifica para esta citocina se han asociado con un aumento del riesgo a desarrollar la enfermedad (Whyte et al., 2000). Además, la neutralización de TNF- α con anticuerpos (Piguet et al., 1989), (Giri et al., 1993) o la administración de receptores de TNF- α solubles (p75 y p55) (Piguet et al., 1993b) puede prevenir o disminuir el desarrollo de fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina en ratones. Basándose en estos hallazgos, recientemente se han iniciado ensayos clínicos para evaluar si inhibidores de la ruta de TNF, tales como etanercept o infliximab podría ser beneficiosos en el tratamiento de la fibrosis pulmonar y otras enfermedades fibróticas (Raghu et al., 2008).

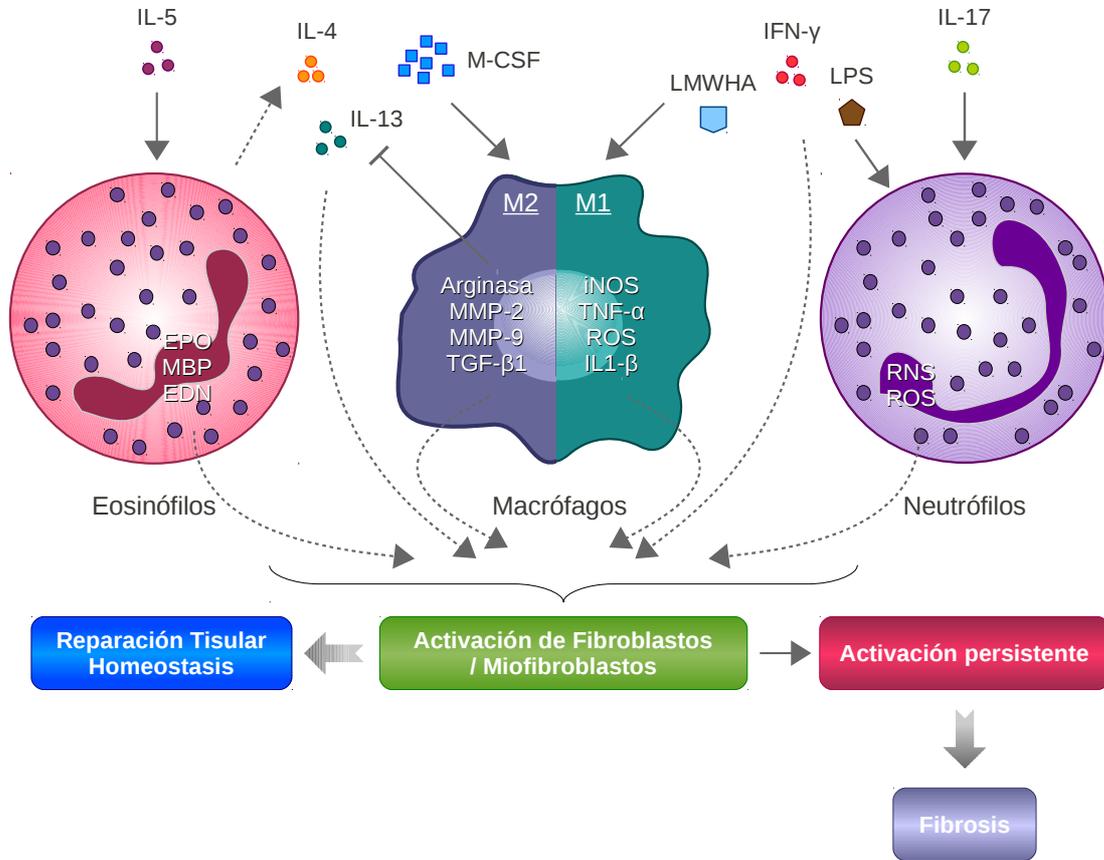


Figura 1.5. Inmunidad innata y fibrosis. El macrófago es el prototipo de célula inmune innata implicada en la inflamación crónica y la fibrosis. Se generan a partir de monocitos de la sangre o, en algunos casos, a partir de la proliferación local de los macrófagos residentes. Dependiendo de su etiología, los macrófagos pueden ser activados por una variedad de factores. El IFN-γ y/o ligandos de los receptores tipo Toll tales como el lipopolisacárido (LPS) y el ácido hialurónico de bajo peso molecular (LMWHA) conducen a la activación clásica (M1), que se caracteriza por la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Por otro lado, la presencia de IL-4, IL-13 y GM-CSF media la activación alternativa (M2), que conduce a la producción de poliaminas y L-prolina. Algunos desencadenantes (como las bacterias extracelulares y el daño tisular) provocan, a su vez, la infiltración de neutrófilos persistente mediada por IL-17 y otras señales activadoras que pueden aumentar sustancialmente la actividad microbicida y dañar el tejido. Del mismo modo, los antígenos de helmintos y alérgenos inducen la infiltración de eosinófilos que ayudan en la eliminación del parásito. EPO, eritropoyetina; MBP, proteína básica de la mielina; EDN, neurotoxina derivada de eosinófilos; MMP-2 y -9, metaloproteinasas-2 y -9; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; ROS, especies reactivas de oxígeno, RNS, especies reactivas de nitrógeno.

De manera similar a TNF- α , otros estudios han documentado la actividad profibrótica de la IL-1 β y de la señalización a través del inflamasoma NALP3/ASC en macrófagos (Gasse et al., 2007). Diversas enfermedades fibróticas en animales (como la fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina o sílice, la fibrosis hepática en ratones hipercolesterolémicos, la fibrosis renal intersticial resultado de la obstrucción ureteral unilateral y la fibrosis cardiovascular desarrollada tras isquemia miocárdica) aparecen reducidas en ratones deficientes en IL-1 β (Bujak and Frangogiannis, 2009), (Jones et al., 2009). Además, otros estudios muestran que el desarrollo de neumonitis en el modelo de la Bleomicina puede ser prevenido por antagonistas del receptor de IL-1 β (Piguet et al., 1993b). Al igual que TNF- α , IL-1 β es un potente mediador pro-inflamatorio que exagera la lesión de las células del parénquima, así como la inducción de la TEM y la activación de miofibroblastos a través de un mecanismo dependiente de TGF- β 1 (Fan et al., 2001). IL-1 β y TNF- α también inducen un aumento en la expresión de IL-6, que actúa como un factor de crecimiento autocrino en fibroblastos. IL-6, además, es un importante mediador de la fibrosis en la esclerosis sistémica difusa, en la fibrosis hepática tras la exposición a CCL4 y en la fibrosis consecuencia del rechazo crónico cardíaco (Natsume et al., 1999), (Diaz et al., 2009). Por lo tanto, las citoquinas pro-inflamatorias propias de la inmunidad innata parecen tener papeles cruciales en la patogénesis de la fibrosis.

Como se comentó anteriormente, el TGF- β es indiscutiblemente el mediador por excelencia de la fibrosis tisular. La producción de TGF- β se correlaciona con una progresión de la fibrosis en el hígado, el pulmón, el riñón, la piel y el corazón; además, se ha demostrado que la inhibición de la vía de señalización de TGF- β 1 reduce el desarrollo de la fibrosis en muchos modelos experimentales (Cutroneo et al., 2007), (Everett and Olgin, 2007), (Anscher, 2010), (Lan, 2011). Sin embargo, y como se comentará posteriormente, la fuente celular de TGF- β 1 va a dictar su posible actividad patogénica; mientras que el TGF- β 1 derivado de macrófagos muestra una actividad profibrótica y cicatricial, el TGF- β 1 secretado por células Treg funciona como un potente mediador anti-inflamatorio y antifibrótico (Kitani et al., 2003). Por otra parte, los ratones deficientes en esta citocina desarrollan numerosos trastornos autoinmunes y son más susceptibles a padecer cáncer (Letterio and Roberts, 1996), (Becker et al., 2006), (Bian et al., 2009). Por lo tanto, no queda claro si el antagonismo de la vía de señalización de TGF- β 1 será beneficioso en humanos, ya que en pacientes con fibrosis progresiva es probable que se requiera una terapia anti-fibrótica prolongada y se podría interferir en las diversas funciones fisiológicas que implican dicha ruta.

5.2.2. Inmunidad adaptativa y fibrosis.

5.2.2.1. Los linfocitos B y la fibrosis.

A pesar de que la mayor parte de la literatura que hace referencia a la posible participación de los linfocitos en el proceso fibrótico está centrada principalmente en el estudio de los linfocitos T, en los últimos años se ha sugerido un papel para las células B en dicho evento. Los pacientes con FPI a menudo presentan en el pulmón estructuras tipo nódulos linfáticos compuestas por células T y B activadas (Marchal-Sommé et al., 2006). Asimismo, se ha detectado la presencia de autoanticuerpos circulantes contra antígenos presentes en las células epiteliales alveolares, tales como la vimentina y citoqueratinas (Wallace et al., 1994a), (Wallace et al., 1994b), (Dobashi et al., 1998), (Fujita et al., 1999), (Yang et al., 2002), (Feghali-Bostwick et al., 2007) o más recientemente periplakin (un componente de los desmosomas del epitelio) (Taillé et al., 2011), en pacientes con FPI asociándose todos ellos con peores parámetros funcionales.

Estudios en modelos animales y pacientes con fibrosis pulmonar implican a los linfocitos B y a la molécula CD19, una molécula de superficie que forma parte del co-receptor de estos linfocitos, en la patogénia de esta enfermedad. Así, en pacientes con esclerosis sistémica (SSc), las células B periféricas muestran un nivel de expresión de CD19 mayor que los controles sanos y los polimorfismos en CD19 están asociados con un aumento de la susceptibilidad a padecer dicha enfermedad (Sato et al., 2000), (Tsuchiya et al., 2004). En un modelo animal de inducción de SSc tras administración de Bleomicina por vía subcutánea, los ratones deficientes en CD19 desarrollaron una fibrosis pulmonar y cutánea atenuada en comparación con los controles WT (Yoshizaki et al., 2008). En el modelo de fibrosis pulmonar por Bleomicina intratraqueal, la sobreexpresión de CD19 se correlaciona con un incremento histológico de la fibrosis, un aumento en el contenido de hidroxiprolina en el pulmón y una disminución de la supervivencia (Komura et al., 2008). En cambio, los ratones deficientes en CD19 presentaban un menor desarrollo de fibrosis y una mayor tasa de supervivencia en comparación con los controles (Komura et al., 2008).

En oposición a los estudios descritos anteriormente, otros autores muestran que la presencia de células B en las lesiones fibróticas puede actuar como un mecanismo protector. En el modelo de fibrosis pulmonar inducida por sílice, la sobreexpresión de la citocina anti-inflamatoria IL-9 está acompañada por una expansión de las células B dentro de los pulmones y con una disminución de la fibrosis pulmonar (Arras et al., 2001), (Arras et al., 2006). La presencia

de células B es necesaria para que la IL-9 genere un efecto protector, ya que ratones deficientes en células B no muestran un menor grado de fibrosis y tras reconstituir estos ratones con células B, se instauran las condiciones protectoras iniciales (Arras et al., 2006). Por tanto, el papel que cumplen las células B en la patogenia de la fibrosis es conflictivo ya que, de forma similar a lo postulado para las células T (ver posteriormente), el fenotipo celular y la naturaleza del medio pulmonar pueden actuar promoviendo o inhibiendo el proceso fibrótico.

5.2.2.2. Los linfocitos T y la fibrosis.

En la mayoría las enfermedades pulmonares fibróticas, tanto en humanos como en los modelos experimentales en animales, se ha detectado la presencia de linfocitos T. Sin embargo, existen ciertas controversias sobre el papel que estas células juegan en la patogenia de la enfermedad, habiéndoselas atribuido un papel irrelevante, pro-fibrótico o anti-fibrótico (Jindal and Agarwal, 2005), (Luzina et al., 2008). En este sentido, la administración de FITC a ratones SCID y ratones RAG^{-/-}, carentes de linfocitos T y B, induce el desarrollo de una fibrosis pulmonar similar a la observada en los controles silvestres (Christensen et al., 1999). Asimismo, el tratamiento con un anticuerpo anti-CD3 no disminuye la extensión o severidad del daño pulmonar inducido por Bleomicina (Janick-Buckner et al., 1989a) o FITC (Christensen et al., 1999). Por el contrario, otros estudios muestran que la proliferación de fibroblastos y la acumulación de MEC tras la administración de Bleomicina está inhibida en ratones atímicos (Schrier et al., 1983b) o tras la eliminación de linfocitos T con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 (Piguet et al., 1989), (Sharma et al., 1996). En este mismo sentido, ratones cuyas células T carecen de la molécula co-estimuladora CD28, necesaria para la completa activación de los linfocitos T, muestran una marcada disminución de fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina (Okazaki et al., 2001); quedando restaurada la respuesta fibrótica tras la transferencia pasiva a estos animales de células T de ratones normales. Estas controversias pueden estar en relación con los diferentes modelos estudiados y/o con los reactivos utilizados para eliminar o inactivar las diferentes poblaciones T y que podrían estar finalmente en relación con la activación/inhibición diferencial de las distintas subpoblaciones funcionales de linfocitos T-CD4⁺. Por este motivo, a continuación, nos centraremos en el papel que desempeñan dichas poblaciones en este proceso.

Diversidad funcional de los linfocitos T-CD4⁺.

Lejos de constituir una población homogénea, los linfocitos T-CD4⁺ pueden dar lugar tras su activación a distintas subpoblaciones funcionales adaptadas al estímulo que las inducen y caracterizadas por patrones de producción de citocinas específicos (Zhu and Paul, 2008) (Figura

1.6). Durante mucho tiempo, la heterogeneidad de las células T-CD4⁺ se limitó a su división en células TH tipo 1 (TH1) y células TH tipo 2 (TH2), las cuales se habían considerado responsables no sólo de diferentes tipos de respuestas protectoras, sino también de la patogénesis de muchas enfermedades. Sin embargo, en los últimos años, nuestro conocimiento sobre la diferenciación de las células T-CD4⁺ se ha incrementado significativamente, y nuevas subpoblaciones continúan descubriéndose. A continuación, haremos una descripción abreviada de las subpoblaciones T-CD4⁺ mejor caracterizadas.

Paradigma TH1/TH2

La primera demostración de la existencia de al menos dos subpoblaciones diferentes de linfocitos T-CD4⁺ fue dada por Parish y Liew (Parish and Liew, 1972); y más adelante, en 1986 Mosmann y colaboradores demostraron que esta heterogeneidad funcional se debía a su diferente patrón de producción de citocinas (Mosmann et al., 1986), descubrimiento que fue confirmado posteriormente en humanos (Del Prete et al., 1991), (Parronchi et al., 1991). En base a esto, las células T-CD4⁺ tanto humanas como murinas fueron clasificadas en ese momento en dos subpoblaciones principales, definidas como TH1 y TH2.

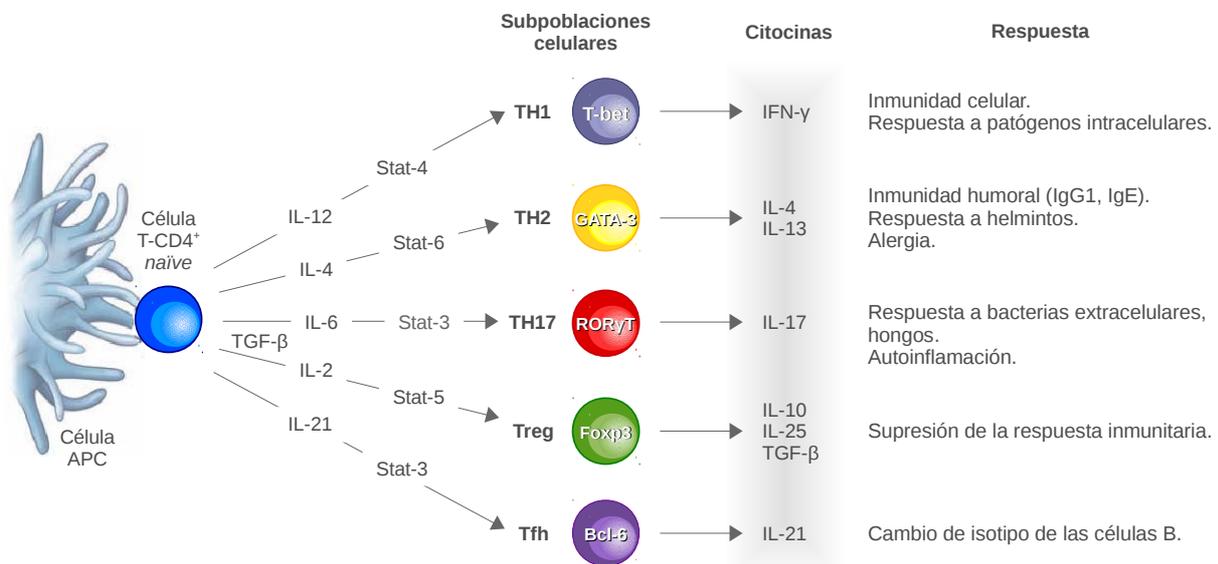


Figura 1.6. Diferenciación funcional de los linfocitos TH: Modelo clásico del linaje. Los estudios iniciales realizados con cultivos *in vitro* de células TH1 y TH2 llevaron a la idea de que estas subpoblaciones se comportan como linajes, lo que significa que su fenotipo (es decir, su producción selectiva de citocinas) era fijo e inflexible. En consecuencia, estas subpoblaciones expresan factores de transcripción definidos cuya expresión es, por sí sola, suficiente para inducir la producción de estas citocinas; estableciéndose, de este modo, linajes estables.

Células TH1

Se caracterizan por la producción de niveles elevados de IFN γ junto con citocinas proinflamatorias como TNF- α y TNF- β , lo que da lugar a una activación del sistema inmune innato y de la inmunidad mediada por células, caracterizada por un efecto citolítico. Son responsables de la activación de fagocitos y de la producción de anticuerpos opsonizantes que facilitan la acción del complemento, jugando así un importante papel en la protección frente a patógenos intracelulares. Por el contrario, una actividad excesiva de las mismas contribuye a la aparición de dolencias inflamatorias y autorreactivas como la enfermedad inflamatoria intestinal (Davidson et al., 1996) y la enfermedad injerto contra huésped (Hu et al., 1999), así como desórdenes autoinmunes como la diabetes mellitus insulino-dependiente (Wang et al., 1997) y artritis reumatoide (Leung et al., 2000).

Para una completa diferenciación funcional a esta subpoblación celular es necesaria la colaboración entre el IFN γ y la IL-12 (Hsieh et al., 1993), (Seder et al., 1993), (Swihart et al., 1995), (Wenner et al., 1996). La IL-12 producida por células presentadoras de antígeno (APCs) tras el contacto con bacterias y virus induce a las NKs a producir IFN γ , y la unión de este a su receptor (IFN γ R) en células T-CD4⁺ *naïve* da lugar a la fosforilación de STAT-1. El STAT-1 activo incrementa la expresión del factor de transcripción T-bet, fomentando la diferenciación a TH1 mediante la inducción de la expresión de IFN γ y de la subunidad específica del receptor de la IL-12 (IL-12R β_2) (Mullen et al., 2001), (Afkarian et al., 2002). De este modo la célula se vuelve respondedora a la IL-12, activándose STAT-4 que estabiliza aún más el fenotipo TH1 (Szabo et al., 1997). En la última fase de diferenciación también se incrementa la expresión del IL-18R α , que requiere de la señalización a través de IL-12/STAT-4 y se potencia en presencia de IFN γ . IL-12 e IL-18 conjuntamente, inducen la producción de IFN γ por las células TH1 en ausencia de estimulación a través de su receptor de células T (TCR), y esta producción de citocinas independiente de antígeno es, probablemente importante para la amplificación de respuestas TH1 a través del reclutamiento de otras células TH1 preexistentes (Okazawa et al., 2002), (Smeltz et al., 2002).

Células TH2

Son células caracterizadas por la producción específica de IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, IL-31 e IL-33, aunque también pueden expresar citocinas compartidas con otros linajes como IL-2, IL-3, IL-9, IL-10, GM-CSF y TNF α . Se asocian con una respuesta de tipo humoral, estando involucradas principalmente en la protección frente a patógenos extracelulares del tipo de

parásitos helmintos. También se ha descrito que juegan un importante papel en la inmunidad asociada a mucosas. Además, IL-4 e IL-13 son los principales mediadores del cambio de clase a IgE en las células B (Kopf et al., 1993). La IgE se une al receptor FcεRI de basófilos y mastocitos, y su interacción con ligandos multivalentes induce entrecruzamiento de receptores FcεRI, lo que lleva a la secreción por parte de estas células de mediadores activos como histamina y serotonina, y la secreción de varias quimiocinas y citocinas como IL-4, IL-13 y TNFα. El resultado es la constricción del músculo liso, un incremento de la permeabilidad vascular y el reclutamiento de células inflamatorias (Larché et al., 2006). La IL-5 regula positivamente un gran número de funciones de los eosinófilos, como su producción y liberación de la médula ósea, activación y supervivencia (Coffman et al., 1989). Asimismo, la producción de IL-9 tras la infección por helmintos contribuye a la activación de mastocitos y producción de IgE características de estas infecciones (Faulkner et al., 1998), además de inducir la producción de mucina por las células epiteliales (Longphre et al., 1999). Sin embargo, un incremento aberrante en su respuesta da lugar a la aparición de patologías crónicas del tracto respiratorio como asma atópico y alergias (Barrett and Austen, 2009).

La IL-4 es la citocina más potente, si no la única, en la inducción de la diferenciación de linfocitos al perfil TH2 (Swain et al., 1990) y su presencia, incluso a niveles muy bajos, es imprescindible para que esta se desarrolle correctamente. Tras estimulación vía TCR y el receptor de la IL-4, se activa una cascada que lleva a la fosforilación de STAT-6, esencial para la inducción del factor de transcripción GATA-3, específico de las células TH2. GATA-3 a su vez activa la producción de citocinas características de esta población como IL-4, IL-5 e IL-13, mientras al mismo tiempo regula a la baja STAT-4 e IL-12Rβ₂ (Szabo et al., 1997), (Zheng and Flavell, 1997), descritos anteriormente como inductores de diferenciación TH1. Además, el factor de transcripción c-Maf también contribuye a la diferenciación TH2 debido a que activa la transcripción de IL-4 (Ho et al., 1996).

Células TH17

Estudios recientes en dos modelos experimentales de enfermedad autoinmune, la artritis inducida por inmunización con colágeno de tipo II (CIA: *collagen-induced arthritis*) y la esclerosis múltiple secundaria a inmunización con proteína básica de mielina (EAE: *experimental autoimmune encephalomyelitis*), han demostrado la debilidad del paradigma TH1/TH2 como únicas formas de diferenciación de las células T-CD4⁺, sugiriendo la existencia de otras subpoblaciones funcionales de linfocitos T-CD4⁺. En ambas patologías experimentales, la severidad de la enfermedad se agravaba en ausencia de citocinas, receptores o factores de

transcripción de tipo TH1 tales como IFN γ , IFN γ R, IL-12p35, IL12-R β_2 , T-bet o STAT-1 (Ferber et al., 1996), (Manoury-Schwartz et al., 1997), (Vermeire et al., 1997), (Gran et al., 2002), (Zhang et al., 2003). Sin embargo, los ratones que carecían de la subunidad p40 de la IL-12, una subunidad compartida con la citocina IL-23 (Oppmann et al., 2000), eran resistentes al desarrollo de estas patologías, y los deficientes para la subunidad p19 de la IL-23 estaban protegidos tanto frente a EAE como a CIA (Cua et al., 2003), (Murphy et al., 2003). Esta paradoja se resolvió cuando diferentes grupos identificaron una subpoblación diferente, que llamaron TH17, que se caracterizaba por la producción de IL-17a e IL-17f y que necesitaba IL-23 para su mantenimiento y expansión (Oppmann et al., 2000), (Cua et al., 2003), (Harrington et al., 2005), (Park et al., 2005). Más tarde se ha descubierto que también producen IL-21, IL-22 y GM-CSF además de IL-26 en humanos; y que expresan el receptor de quimiocinas CCR6 y su ligando CCL20 (Wilson et al., 2007). La IL-17a estimula las células endoteliales, epiteliales y fibroblásticas a producir otras citocinas y quimiocinas como IL-6, IL-8, GM-CSF y MCP-1; y sinergiza con otras citocinas proinflamatorias como el TNF α e IL-1 β para inducir la producción de quimiocinas. El resto de citocinas producidas por esta subpoblación contribuyen también a la activación de células mononucleares y, por tanto, inducen o mantienen el proceso inflamatorio crónico. Por ello, las células TH17 son cruciales en la defensa contra bacterias extracelulares y algunos hongos frente a los cuales las respuestas TH1 y TH2 no resultan totalmente eficaces. Por otro lado, una respuesta exagerada de las mismas da lugar a la aparición de patologías inflamatorias y autoinmunes tanto en ratones como en humanos tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal y episodios alérgicos (Lubberts et al., 2004), (McKenzie et al., 2006), (Aranami and Yamamura, 2008).

Para la diferenciación funcional a esta subpoblación celular tanto en ratones como en humanos, es imprescindible la presencia en el ambiente de TGF- β e IL-6 que actúan en conjunto y sin redundancia en sus funciones (Bettelli et al., 2006), (Mangan et al., 2006), (Manel et al., 2008). El TGF- β , citocina inmunomoduladora producida por una gran variedad de células, inhibe la producción de IL-2 generada por STAT-5 en células estimuladas a través de su TCR y también interfiere en la diferenciación hacia TH1 y TH2 debido a que inhibe la expresión tanto de T-bet como de GATA-3 (Gorelik et al., 2000), (Gorelik et al., 2002). Por otro lado, hay que resaltar que el TGF- β también induce la expresión de Foxp3 y, por tanto, de células T reguladoras (Tregs) (ver posteriormente). Sin embargo, la presencia adicional de la citocina proinflamatoria IL-6 junto con el TGF- β suprime la expresión de Foxp3 y por ende la generación de Tregs, y simultáneamente induce la producción de IL-17 y diferenciación hacia células TH17 (Bettelli et al., 2006). Recientemente se ha descrito en ratones que la IL-21, producida en gran cantidad por las células TH17, puede sustituir a la IL-6, utilizando una ruta alternativa en la diferenciación (Korn et al.,

2007). Estas citocinas proinflamatorias inducen la fosforilación de STAT-3, que da lugar a la expresión de ROR γ T y ROR α (en ratones), factores de transcripción característicos de esta población (Ivanov et al., 2006), (Yang et al., 2007), (Yang et al., 2008). Parece que STAT-3 y ROR γ T cooperan uniéndose al promotor de la IL-17, induciendo su expresión (Chen et al., 2006). La IL-21 producida por las propias células TH17, en presencia de TGF- β induce TH17, creando un circuito de autoamplificación. Además, tanto IL-6 como IL-21 en cooperación con el TGF- β inducen la expresión del receptor específico de la IL-23 (IL-23R), citocina producida por células presentadoras de antígeno y que es imprescindible, a través de la activación de STAT-3, en el mantenimiento y la expansión de esta población celular (Veldhoen et al., 2006).

Células TH foliculares (THf)

Estas células se podrían definir como aquellas que ayudan en el aclaramiento de partículas virales e infecciones bacterianas y sus productos (toxinas), a través de su capacidad de proporcionar ayuda a las células B en la producción de anticuerpos, ya que les posibilita llevar a cabo el cambio de clase de inmunoglobulina, la reacción de centro germinal y la maduración de afinidad; además de favorecer la formación de células B memoria de alta afinidad (King et al., 2008). A pesar de que se han descrito como una población bastante heterogénea, presentan características específicas como la expresión del factor de transcripción Bcl-6, la ausencia de Blimp-1 y la secreción de IL-21 (Vogelzang et al., 2008), (Johnston et al., 2009), (Nurieva et al., 2009); citocina esta última esencial en el desarrollo de sus funciones y necesaria para su diferenciación. En la mayoría de los casos también expresan ICOS, PD-1 y CXCR5 que les dirige hacia el folículo linfóide (Yu et al., 2009), además de presentar niveles reducidos de CD127 (IL7R), CD62-L (Lim and Kim, 2007), (Fazilleau et al., 2009) y CCR7 que les hace perder su afinidad por las zonas T del ganglio linfático (Yu and Vinuesa, 2010). Los requerimientos para su mantenimiento y diferenciación no están completamente esclarecidos pero incluyen la existencia de una interacción T-B mantenida (Haynes et al., 2007) y de una señalización ICOS-ICOSL (Nurieva et al., 2008), además de atribuirle un papel autocrino a la IL-21 secretada por las propias células. Recientemente se ha observado que la IL-27 incrementa la producción de IL-21 y la función de las células THf (Batten et al., 2010). Su alteración puede desencadenar un amplio espectro de patologías mediadas por anticuerpos y una acumulación aberrante de estas células se ha asociado a lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren's y artritis autoinmune (Hutloff et al., 2004), (Watanabe et al., 2008).

Células T reguladoras

Hasta ahora hemos descrito diferentes poblaciones de linfocitos T-CD4⁺ que presentan un papel efector tanto en la protección frente a agentes externos, como en la inducción de patologías autoinmunes/inflamatorias en el caso de que respondan de una forma desmesurada. Sin embargo, una de las principales funciones del sistema inmune es el mantenimiento del control de estas respuestas intentando establecer un equilibrio u homeostasis. Entre los múltiples mecanismos encargados del mantenimiento de la homeostasis inmunológica destaca, por su carácter dominante y por actuar en la periferia sobre repertorios linfoides ya establecidos, la actividad de un grupo heterogéneo de células inmunosupresoras/reguladoras (Shevach, 2006). La primera subpoblación T-CD4⁺ reguladora fue identificada en los años 90 por el grupo del Dr Simon Sakaguchi. Estas células, denominadas linfocitos T reguladores (Tregs), expresaban constitutivamente la cadena α del receptor de la IL-2 ó CD25, eran anérgicos *in vitro*, tenía un origen tímico y constituía aproximadamente el 10% de los linfocitos T-CD4⁺ periféricos. (Sakaguchi et al., 1995). Además del CD25 se han incorporado otros marcadores para identificar esta población, entre los que se encuentran CTLA-4, CD62L, CD69, GITR, CD127^{low} (Corthay, 2009), pero ninguno de ellos es suficiente para discriminar específicamente las células Treg de las efectoras ya que estas últimas pueden expresarlas transitoriamente tras su activación.

El avance más importante en su caracterización ha sido la identificación del factor de transcripción Foxp3 como esencial en la generación de Tregs (Fontenot et al., 2003), (Hori et al., 2003), (Khattry et al., 2003). Este descubrimiento vino de la mano de la identificación de mutaciones en su gen de origen, que eran las responsables del síndrome autoinmune ligado al cromosoma X (IPEX) en humanos (Bennett et al., 2001), y de la patología del ratón mutante *scurfy* (Brunkow et al., 2001). Los ratones *scurfy*, al igual que los pacientes con síndrome IPEX, desarrollaban una hiperproliferación linfocitaria y múltiples alteraciones autoinmunes órgano-específicas que llevaban a la muerte del animal en el primer mes de vida (Brunkow et al., 2001). Estas alteraciones eran muy parecidas a las observadas en ratones a los que se les habían eliminado las células Treg, estableciéndose una relación entre el Foxp3 y dicha población reguladora. Además, diversos estudios demostraron que la expresión de Foxp3 era específica de la población de células Treg, observándose únicamente una ligera expresión en células T efectoras tras activación en humanos (Hori et al., 2003), (Khattry et al., 2003). Al mismo tiempo se observó que los humanos que padecían IPEX y los ratones con la mutación *scurfy*, o aquellos a los que se les había eliminado el Foxp3 eran incapaces de generar células Treg, mientras que la expresión exógena de esta molécula, conllevaba un aumento en el número de células Tregs y la adquisición de propiedades supresoras de los linfocitos T-CD4⁺CD25⁻ (Fontenot et al., 2003),

(Hori et al., 2003). También se realizaron estudios en ratones quiméricos reconstituidos con una mezcla de células madre derivadas de ratones normales y deficientes en Foxp3 en relación 1:1, demostrando que el desarrollo de las células Tregs depende de la expresión de esta molécula ya que las células madre deficientes en Foxp3 fueron incapaces de aumentar la población reguladora (Fontenot et al., 2003).

En los últimos años se ha descubierto la existencia de células Tregs generadas fuera del timo a partir de precursores $CD4^+CD25^-Foxp3^-$, y por ello, la población reguladora $Foxp3^+$ se ha clasificado en: células reguladoras naturales (nTreg) si tienen un origen tímico, y células reguladoras inducidas (iTreg) si han sido generadas en la periferia.

Células Tregs naturales (nTregs)

Esta subpoblación se desarrolla y adquiere su fenotipo supresor en el timo, migrando posteriormente a la periferia, donde son denominadas nTregs. La mayoría de estas células expresan constitutivamente CD25 y su desarrollo y función son dependientes de la transcripción de Foxp3.

Su selección tímica parece escapar al proceso convencional de diferenciación de las células T, ya que son seleccionadas al reconocer el MHC en presencia del péptido agonista, situación que normalmente provocaría su eliminación (Jordan et al., 2001), (Apostolou et al., 2002). Además, numerosos factores de transcripción activados a partir de la estimulación del TCR (NFAT, AP1, CREB, ATF) están implicados en la regulación de la expresión Foxp3 a nivel transcripcional (Kim and Leonard, 2007). Por otro lado, las señales transmitidas a través de la unión de CD28 con B7.1/B7.2 son también relevantes en la formación del repertorio y tamaño del compartimento de esta población reguladora, dado que ratones deficientes en alguna de estas moléculas poseen un número muy disminuido de células Treg (Salomon et al., 2000). Este fenómeno se ha atribuido al hecho de que los ratones $CD28^{-/-}$ o $B7.1/B7.2^{-/-}$ producen bajos niveles de IL-2 (Tang et al., 2004). En base a estos hallazgos, se ha propuesto un modelo de dos pasos para la diferenciación de las células Tregs a nivel tímico donde, primero una fuerte señalización a través del TCR resulta en la sobre-regulación del CD25 haciendo al precursor de las Tregs sensible a la IL-2, que entonces induciría la expresión de Foxp3 (Lio and Hsieh, 2008).

Células Tregs inducidas (iTregs)

Estas células constituyen otro grupo dentro de la población de linfocitos Tregs y son generadas en la periferia a partir de células CD4⁺CD25⁻ *naïve* en presencia del antígeno y de ciertas citocinas (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). Comparten varias características con las nTregs, como la supresión de respuestas de las células T efectoras de manera específica de antígeno, la anergia *in vitro* y también la expresión de Foxp3 (Thorstenson and Khoruts, 2001).

Diversos estudios han demostrado que su generación *in vivo* se ve favorecida cuando existe una exposición continuada con el antígeno (Apostolou and von Boehmer, 2004) y tras la estimulación de los linfocitos T bajo condiciones inmunogénicas subóptimas, es decir, en presencia de concentraciones muy bajas de antígeno y ausencia de coestimulación (Kretschmer et al., 2005); y se produce siempre en presencia de TGF- β e IL-2 (Wan and Flavell, 2006). Estas células iTregs aparecen en ganglios mesentéricos durante la inducción de tolerancia oral (Coombes et al., 2007), se diferencian continuamente en la lámina propia del intestino en respuesta a la microbiota y antígenos alimentarios (Sun et al., 2007), en tejidos donde existe una inflamación crónica (Curotto de Lafaille et al., 2008), en tumores y tejidos trasplantados. El desarrollo de iTreg en el intestino se ve favorecido por la existencia de un microambiente característico, rico en TGF- β y en el que coexisten DC CD103⁺ de la lámina propia que expresan cantidades elevadas de ácido retinoico junto con células T-CD4⁺CD25⁻ (Coombes et al., 2007), (Sun et al., 2007). La importancia del TGF- β se ha demostrado al observar que su neutralización *in vivo* inhibe el desarrollo de tolerancia oral e impide la diferenciación de iTregs antígeno específicas (Mucida et al., 2005).

El mecanismo por el que TGF- β induce la transcripción de Foxp3 lleva consigo la cooperación de Smad-3 y NFAT a nivel del amplificador del gen *foxp3* (Josefowicz and Rudensky, 2009). Por su parte, la señalización a través de la IL-2 activaría STAT-5, que se uniría al gen *foxp3* (Burchill et al., 2007). Se ha observado que esta citocina es necesaria para la diferenciación pero no para el mantenimiento de la expresión de Foxp3 (Davidson et al., 2007). Además otros factores podrían promover o inhibir la inducción de iTregs. Las citocinas que inducen la diferenciación a otras subpoblaciones TH (TH1, TH2, TH17), antagonizan con el desarrollo de células iTreg. El caso de la diferenciación a TH17 es más especial ya que la presencia de la citocina IL-6 junto con el TGF- β , bloquea completamente la expresión de Foxp3, permitiendo la expresión de ROR γ t e induciendo a las células a producir IL-17 (Bettelli et al., 2006).

Las células TH1 muestran una actividad anti-fibrótica.

Numerosos estudios han sugerido que la células TH1 efectoras, definidas por su producción de IFN- γ , presentan actividad antifibrótica (Giri et al., 1986), (Baroni et al., 1996), (Oldroyd et al., 1999) de manera similar a las células NKs productoras de IFN- γ y las células NKTs (Kim et al., 2005), (Jeong et al., 2008). Se cree que esta citocina inhibe la fibrosis, al menos en parte, por antagonizar con la actividad pro-fibrótica de TGF- β 1, ya que es capaz de inhibir la fosforilación de Smad3 inducida por TGF- β y, por tanto, la posterior activación de genes sensibles a TGF- β (Ulloa et al., 1999). Además, el IFN- γ actúa a través de una vía dependiente de la quinasa asociada a Janus (Jak-1) y el factor de transcripción STAT-1 induciendo la expresión de Smad7, que previene la interacción de Smad3 con el receptor de TGF- β , atenuando aún más su señalización. Por otro lado, el IFN- γ inhibe de forma directa la proliferación de los fibroblastos y la expresión del procolágeno-I y el procolágeno-III en estas células, así como la síntesis de colágeno en miofibroblastos activados (Gurujeyalakshmi and Giri, 1995). Asimismo, esta citocina es capaz de impedir la producción de citocinas TH2 inducida tras la diferenciación de los monocitos CD14⁺ circulantes a fibrocitos (Shao et al., 2008).

Por último, la citocina IL-12, inductora de la diferenciación a TH-1, demuestra tener una actividad anti-fibrótica similar en experimentos *in vivo* con ratones, en virtud de su capacidad para estimular la producción de IFN- γ en células TH1 y células NKs (Wynn et al., 1995), (Keane et al., 2001). Estudios realizados en modelos de fibrosis pulmonar (Xu et al., 2006) y de fibrosis cutánea (Lakos et al., 2006) inducidas por administración local de Bleomicina en ratones *t-bet*^{-/-} muestran el desarrollo de lesiones fibróticas más severas que en los animales controles silvestres. Además, en ambos casos, este aumento en la fibrosis se asoció con una elevada producción de las citocinas de perfil TH2 (IL-4, IL-5 e IL-13), una disminución en la producción de IFN- γ y una expresión aumentada de TGF- β ; lo que sugiere que la vía de T-bet confiere resistencia a la fibrosis inducida por Bleomicina; desempeñando un papel fisiológico en la regulación de la reparación tisular, al promover una respuesta de perfil TH1 que impide la acumulación excesiva de MEC.

A pesar de la abundancia de pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* que apoyan la hipótesis de una función anti-fibrótica de los linfocitos TH1, los estudios clínicos que investigan el potencial terapéutico de IFN- γ en el tratamiento de la FPI, la esclerosis sistémica y otros trastornos fibróticos han sido hasta ahora decepcionantes (King et al., 2009).

La respuesta tipo TH-2 es un potente promotor de fibrosis.

En la literatura encontramos muchos estudios que muestran que las citocinas tipo TH2 están involucradas en una gran variedad de enfermedades fibróticas (Ong et al., 1999), (Hoffmann et al., 2001), (Sandler et al., 2003), (Wynn, 2004), (Lakos et al., 2006), (Aliprantis et al., 2007). A pesar de que todas ellas, se han relacionado con el desarrollo de fibrosis (Ong et al., 1998), (Chiaramonte et al., 1999), (Reiman et al., 2006), la IL-13 se ha convertido en el mediador dominante durante la remodelación del tejido fibroso en varios modelos experimentales de fibrosis y en pacientes (Chiaramonte et al., 1999); implicándose en el desarrollo de fibrosis crónica en asma (Yang et al., 2004), FPI (Furuie et al., 1997), (Murray et al., 2008), modelos de fibrosis pulmonar experimental (Kolodsick et al., 2004), esclerosis sistémica (Fuschiotti, 2011), fibrosis cutánea inducida por dermatitis atópica (Oh et al., 2011), fibrosis inducida por radiación (Han et al., 2011), fibrosis asociada con la colitis ulcerosa (Heller et al., 2002) y la fibrosis hepática resultante de infecciones persistentes (Shimamura et al., 2008), (Weng et al., 2009). En el caso de la FPI, se han encontrado niveles elevados de IL-4 e IL-13 en los BALF y pulmón de pacientes (Emura et al., 1990), (Wallace et al., 1995), (Hancock et al., 1998), (Wallace and Howie, 1999); existiendo una correlación de los niveles tisulares de IL-13 y la severidad de la enfermedad (Wallace et al., 1995), (Hancock et al., 1998), (Wallace and Howie, 1999), (Golec et al., 2008). Estas dos citocinas comparten muchas actividades funcionales ya que ambas utilizan la misma cascada de señalización IL-4R α /Stat6 (Zurawski et al., 1993). Sin embargo, con el desarrollo de ratones deficientes y transgénicos para IL-13 (McKenzie et al., 1998), (Zhu et al., 1999), y la utilización de antagonistas de IL-13 (Donaldson et al., 1998), (Chiaramonte et al., 1999), se han descubierto funciones únicas y no redundantes para estas citocinas en numerosos modelos. Así, estudios en los que se inhibían IL-4 e IL-13 de forma independiente revelaron que IL-13 es la citocina efectora dominante en muchos modelos experimentales de fibrosis, incluyendo la fibrosis pulmonar por Bleomicina (Chiaramonte et al., 1999), (Blease et al., 2001), (Kumar et al., 2002), (Kolodsick et al., 2004), (Aliprantis et al., 2007), (Keane et al., 2007). Además, la sobreexpresión de IL-13 en el pulmón induce por sí sola en los ratones un aumento significativo de la fibrosis en las vías aéreas, en ausencia de cualquier estímulo inflamatorio adicional (Poynard et al., 2003); mientras que diversos métodos de inhibición de IL-13 son efectivos en el control de la síntesis de colágeno inducida por Bleomicina (Belperio et al., 2002), (Jakubzick et al., 2003), (Fichtner-Feigl et al., 2006). Además, ratones deficientes en el factor de transcripción T-bet, implicado en la diferenciación TH1 (Szabo et al., 2000) desarrollan una potente fibrosis tras la exposición a Bleomicina comparado con el mismo tratamiento en ratones con fenotipo salvaje; en cambio, cuando se cruzan estos ratones *t-bet*^{-/-} con ratones deficientes en IL-13 (IL-13^{-/-}) no se produce respuesta fibrótica (Aliprantis et al., 2007), lo que indicaría que

IL-13 juega un papel esencial en el desarrollo de la fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina.

Por otro lado, existen evidencias de que las citocinas TH2 cooperan con TGF- β en la inducción de fibrosis. En este sentido, experimentos realizados por S. Fichtner-Feigl sugieren que la fibrosis pulmonar conducida por TGF- β 1 en algunos casos podría ser dependiente de la señalización mediada por IL-13 a través del receptor IL-13R α 2 (Fichtner-Feigl et al., 2006), que originariamente se describió como un receptor “señuelo” para IL-13, capaz de participar en la inhibición de la fibrosis (Chiaramonte et al., 1999), (Wood et al., 2003); mientras que dos estudios independientes de C.G. Lee (Lee et al., 2001a) y S. Lanone (Lanone et al., 2002) reflejan que IL-13 es capaz de inducir la producción de la forma “latente” TGF- β 1 en macrófagos, al mismo tiempo que estimula la producción de proteínas que degradan las LAP (proteínas asociadas a latencia), resultando indirectamente en la generación de la forma activa de TGF- β . Sin embargo, otros autores han sugerido que la IL-13 es capaz de promover la fibrosis independientemente de TGF- β (Kaviratne et al., 2004), (Liu et al., 2011), induciendo directamente la proliferación de los fibroblastos, las células epiteliales y las células de músculo liso (Lee et al., 2001b), (Kuperman et al., 2002). De igual modo, las células TH2 que producen IL-13 y las células Treg que expresan TGF- β son además capaces de inhibir la respuesta tipo TH17 (Wilson et al., 2011); sugiriendo un papel dual para ambas citocinas en la reparación tisular, ya que suprimen la inflamación a la vez que promueven la fibrosis.

La actividad profibrótica de IL-13 está controlada por la expresión de los receptores IL-13R α 1 e IL-13R α 2 presentes en la superficie de los miofibroblastos (Chiaramonte et al., 2003), (Ramalingam et al., 2008). Así, cuando la expresión del receptor “señuelo” IL-13R α 2 es baja o nula, la fibrosis dependiente de IL-13 aparece exacerbada (Mentink-Kane et al., 2011); sin embargo, los ratones deficientes en este receptor son más resistentes a la inflamación impulsada por IL-1 β e IL-17 probablemente debido a una actividad aumentada de IL-13 (Wilson et al., 2011). Estos datos sugieren que el receptor IL-13R α 2 funciona como un regulador clave tanto de la inflamación mediada por TH17 como de la fibrosis promovida por TH2 (Mentink-Kane and Wynn, 2004).

La respuesta tipo TH17 es pro-inflamatoria y pro-fibrótica.

La subpoblación de células CD4⁺ TH17 está emergiendo como un importante mediador en el desarrollo de fibrosis a través de la secreción de las citocinas específicas como IL-17a (también llamada IL-17), IL-17f e IL-22, además de otras como IL-21, IL-23, TNF- α y GM-CSF (Korn et al., 2009). Se ha postulado un papel de IL-17a en la patogénesis y desarrollo de

autoinmunidad y desórdenes crónicos, tales como el asma severo (Nembrini et al., 2009), la fibrosis pulmonar (Wilson et al., 2010), la esclerodermia (Kurasawa et al., 2000) el rechazo crónico a aloinjerto (Faust et al., 2009), la fibrosis en el trasplante ortotópico de pulmón (Fan et al., 2011), la fibrosis miocárdica (Feng et al., 2009) y la fibrosis hepática inducida por hepatitis (Wang et al., 2011). Además, estudios realizados con ratones *il17a^{-/-}* muestran que esta citocina es esencial para el desarrollo de fibrosis inducida por Bleomicina (Wilson et al., 2010). En muchos casos la expresión de IL-17a se asocia con una neutrofilia persistente (Laan et al., 1999), sugiriendo que el infiltrado de neutrófilos contribuye al desarrollo de daño tisular y fibrosis a través de la inducción de apoptosis de las células del endotelio vascular (Zhu et al., 2011). En el caso de paciente con FPI, la presencia de dichos infiltrados sirve de indicador de mortalidad precoz (Kinder et al., 2008). Por consiguiente, a diferencia de la actividad fibrótica directa que muestran IL-13 y TGF- β , la IL-17a parece promover la fibrosis indirectamente mediante la inducción de daño en los tejidos e inflamación.

Estudios realizados en modelos de fibrosis murinos han revelado que las citocinas IL-1 β e IL-23 actúan como importantes mediadores “aguas arriba” de la respuesta prófibrótica de las TH17 (Wilson et al., 2010), (Gasse et al., 2011). De igual modo, se ha identificado un vínculo entre la IL-17a y TGF- β 1, ya que además de que TGF- β contribuye a la inflamación y la fibrosis inducidas por Bleomicina estimulando la proliferación de fibroblastos y miofibroblastos, con la consecuente acumulación de colágeno, presenta un papel clave en el desarrollo de células T-CD4⁺ productoras de IL-17a (Bettelli et al., 2006), (Veldhoen et al., 2006), (Wilson et al., 2010).

Además de su papel promoviendo las inflamaciones de neutrófilos, se ha demostrado que la IL-17a induce de forma directa la expresión de la metaloproteinasa de matriz-1 (MMP-1) en cultivos primarios de fibroblastos cardiacos humanos (Cortez et al., 2007); lo que sugiere que la IL-17a induce fibrosis gracias, por un lado, al aumento la respuesta inflamatoria y, por otro, a la regulación la activación de fibroblastos. En conjunto, estos datos confieren al eje de citocinas IL-1 β /IL-17a/TGF- β 1 un papel esencial en la cascada de señalización inflamatoria que conduce a la fibrosis.

Las células Treg pueden tanto suprimir como promover fibrosis.

A pesar de que las células Treg aparecen inducidas en diversas enfermedades fibróticas su papel en la fibrogénesis tisular es menos claro que el que presentan otras subpoblaciones de células TH. La expresión del factor de transcripción Foxp3 en esta población es esencial para la producción de citocinas inmunosupresoras, como IL-10 y TGF- β , que controlan la función celular

de las Treg y regulan respuestas inflamatorias crónicas a través de diversos mecanismos (Moore et al., 2001). En humanos, la IL-10 suprime significativamente la síntesis de colágeno tipo I en fibroblastos derivados de tejido cicatricial (Wangoo et al., 1997), indicando que puede inhibir la fibrosis de forma directa (Wang et al., 1998). Además, en relación con una mayor severidad de la enfermedad Kotsianidis y cols. muestran que pacientes con FPI presentan niveles reducidos de linfocitos Treg, en comparación con voluntarios sanos, tanto en el BALF como en sangre (Kotsianidis et al., 2009). En concordancia con esto se ha observado que la IL-10 es capaz de modular la fibrosis en numerosos modelos murinos (Wynn et al., 1998), (Hesse et al., 2004), (Mu et al., 2005), (Hoffmann et al., 2000), incluido el modelo de fibrosis pulmonar por Bleomicina (Thompson et al., 1998), (Holsti et al., 2004), (Nakagome et al., 2006), y los ratones deficientes en IL-10 o con una expresión reducida de IL-10 en el pulmón están más predispuestos a padecer fibrosis pulmonar, con una elevada inflamación local, tras exposición a la radiación ionizante (Haase et al., 2007). Además, la administración de un plásmido que sobre-expresa TGF- β 1 en dicho modelo, induce la generación de una población de células Treg productoras de TGF- β 1 e IL-10, reduciendo la fibrosis (Kitani et al., 2003). Este plásmido no tiene efecto en ratones deficientes en IL-10, lo que indica que esta citocina juega un papel clave en esta actividad supresora (Kitani et al., 2003). En contraposición con estos hallazgos, J.D. Estes et al. y F. Liu et al. en dos estudios independientes demuestran que las células Treg son una fuente importante de TGF- β y promueven el desarrollo de fibrosis (Estes et al., 2007), (Liu et al., 2010). Por lo tanto, el papel preciso de los linfocitos Tregs en la patogenia de la fibrosis está todavía por esclarecer; en particular, porqué las células Treg presentan una actividad anti-fibrótica en unos casos y pro-fibrótica en otros. Una posible explicación a esto probablemente este en relación con el grado de inducción y reclutamiento de estas células al tejido dañado en relación con el de otras poblaciones de células T efectoras. Otra posibilidad es que las células Treg podrían suprimir la fibrosis inducida por las respuestas tipo TH2 y TH17, a la vez que exacerban la fibrosis dependiente de TGF- β 1.

5.3. Estrés oxidativo y fibrosis pulmonar.

El oxígeno molecular es fundamental para el metabolismo aeróbico, más aún en el caso de los vertebrados, siendo indispensable el suministro constante del mismo para asegurar la supervivencia. Sin embargo, el oxígeno es además un fuerte oxidante y su exceso tiene efectos perjudiciales sobre las células y las macromoléculas biológicas debido a la formación de especies oxígeno-reactivas (ROS). El estrés oxidativo se produce cuando hay un desequilibrio entre la generación de ROS y la capacidad celular para eliminar estos intermediarios; debido a la generación desmesurada de ROS, la reducción en la defensa antioxidante o una combinación de

ambos procesos. Además, existen evidencias que apuntan a que las ROS pueden estar involucradas en el procesamiento post-traducciona l de las proteínas y en mecanismos de señalización intracelular que incluyen la activación/inhibición de factores de transcripción, la regulación de la expresión génica y la diferenciación celular. Así, durante años se han acumulado datos que indican que el estrés oxidativo y/o la señalización oxidativa puede jugar un papel importante en la patogénesis de la fibrosis pulmonar (Crapo, 2003), (Kinnula and Crapo, 2003), (Kinnula et al., 2005), (Griffith et al., 2009). Es interesante reseñar en este sentido que el estrés oxidativo puede inducir la aparición de fibrosis tisular resistente a los esteroides (Marwick et al., 2009), (Marwick et al., 2010).

En los últimos años se está prestando mucha atención a la familia de enzimas NADPH oxidasas, también denominadas enzimas NOX, por su capacidad para producir ROS (Bedard and Krause, 2007). En un principio se atribuyó una gran importancia de estos enzimas en la defensa frente a patógenos invasores por parte de las células fagocíticas. Sin embargo, se ha detectado la presencia de NADPH oxidasas en casi todos los tejidos y las ROS generadas por estas enzimas han demostrado tener numerosas funciones celulares (Griendling, 2006), (Bedard and Krause, 2007). Se han descrito siete isoformas de NADPH oxidasas en mamíferos, siendo la NOX4 la más importante en la regulación por TGF- β 1 (Cucoranu et al., 2005), (Hecker et al., 2009).

Como indicábamos anteriormente, existen múltiples evidencias que implican al estrés oxidativo en la aparición de fibrosis. En este sentido, los pacientes con FPI muestran un desequilibrio en la producción de ROS en el pulmón, probablemente causado por la generación espontánea de grandes cantidades de ROS por parte de las células del parénquima pulmonar, los fibroblastos y las células inflamatorias alveolares (macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos) (Cantin et al., 1987), (Bocchino et al., 2010); y por la deficiencia de glutatión extracelular (Kinnula et al., 2005). Además, un exceso de estrés oxidativo provoca efectos deletéreos que podrían contribuir a la patogénesis de la FPI, incluyendo la activación de cascadas de señalización sensibles a reducción-oxidación, cambios en la expresión de citocinas y quimiocinas, modificación del balance entre proteasas y anti-proteasas, inducción de apoptosis y activación de fibroblastos (Walters et al., 2008). Por otro lado, la presencia de agentes exógenos, como el asbesto, la sílice, la radiación ionizante y la Bleomicina, pueden causar fibrosis pulmonar en modelos animales, a través de la producción de ROS (Janssen et al., 1993), (Nakamura et al., 1997), (Hoshino et al., 2003). Estudios realizados con estos modelos demuestran que la exposición al agente externo no sólo es capaz de incrementar la carga oxidativa en el pulmón sino que el tratamiento con antioxidantes es capaz de proteger de la

enfermedad *in vivo* (Hagiwara et al., 2000), (Tamagawa et al., 2000), (Oury et al., 2001), (Vujaskovic et al., 2002), (Kinnula and Crapo, 2003). Los antioxidantes más ampliamente utilizados en estos modelos incluyen glutatión, N-acetilcisteína (NAC) (un precursor sintético de glutatión reducido) y superóxido dismutasa (SOD). De forma notable, la administración de NAC por vía intraperitoneal, oral o en aerosol disminuye significativamente la reacción inflamatoria primaria (en el número de células inflamatorias presentes en el BALF y las citocinas de inflamación aguda), la deposición de colágeno (tanto en la cuantificación de hidroxiprolina como en la histología) y la progresión de fibrosis pulmonar en el modelo de Bleomicina (Hagiwara et al., 2000), (Mata et al., 2003), (Serrano-Mollar et al., 2003). Además, el tratamiento con SOD y sus derivados induce una reducción del estrés oxidativo, la inflamación pulmonar y el desarrollo de fibrosis en un amplio rango de modelos animales (Tamagawa et al., 2000), (Oury et al., 2001), (Bowler et al., 2002), (Vujaskovic et al., 2002), (Fattman et al., 2003), (Kinnula and Crapo, 2003), (Day, 2004). Por otro lado, estudios realizados en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina en ratones deficientes en NOX4 revelaron menor cantidad de la fosforilación de Smad-2, menor expresión de α -SMA y del ARNm de procolágeno, menor contenido total de colágeno y una fibrosis histológica reducida en comparación con los controles (Carnesecchi et al., 2011); si bien, la respuesta inflamatoria en el pulmón no se vio alterada, sugiriendo que la inflamación por sí misma no es suficiente para conducir la fibrosis inducida por Bleomicina. Además, esta disminución de la fibrosis se asocia con una tasa de muerte de las células epiteliales inferior a la detectada en los controles (Carnesecchi et al., 2011). En conjunto estos resultados ponen de manifiesto que el estrés oxidativo puede contribuir tanto en la apoptosis del epitelio alveolar como en la proliferación de fibroblastos durante la evolución patogénica de la fibrosis pulmonar.

Por último, recientes trabajos acerca de los mecanismos oxidativos implicados en la fibrosis pulmonar se han centrado en la interacción existente entre la vía de TGF- β 1 y los procesos mediados por ROS. Estos estudios han demostrado que ROS es capaz de activar la forma latente de TGF- β 1 (Barcellos-Hoff and Dix, 1996) y, de forma inversa, TGF- β 1 incrementa la producción de ROS en fibroblastos pulmonares humanos (Thannickal and Fanburg, 1995). De este modo, los fibroblastos pulmonares procedentes de pacientes con FPI exhibieron un aumento en la generación de H₂O₂ en presencia de TGF- β 1; promoviendo, además, un efecto citotóxico en el co-cultivo con células epiteliales de pulmón, que podía ser inhibido por la adición de catalasa o mediante el bloqueo en la producción de H₂O₂ (Waghray et al., 2005). Además, el tratamiento con glutatión, NAC o inhibidores de ROS previene el desarrollo de TEM inducido por TGF- β 1 en las células epiteliales alveolares (Felton et al., 2009).

6. Nuevas dianas terapéuticas en fibrosis tisular.

Por lo expuesto previamente, nuestro conocimiento de los mecanismos patogénicos de la fibrosis pulmonar tanto a nivel celular como molecular, es todavía incompleto. En paralelo, han surgido un sinnúmero de tratamientos médicos que no han conseguido frenar el desarrollo de la enfermedad, persistiendo el trasplante como el único recurso real para la supervivencia de los enfermos. Parece claro, por lo tanto, que es necesario identificar nuevas dianas terapéuticas en la fibrosis pulmonar idiopática. En este sentido, nuestro grupo ha considerado como diana potencial en este tipo de reacciones a GPBP (siglas de **G**ood**p**asture antigen **B**inding **P**rotein) una protein-quinasa capaz de fosforilar *in vitro* distintos tipos de colágeno (Raya et al., 1999).

6.1. El Síndrome de Goodpasture

También conocido como enfermedad anti-membrana basal glomerular, es una patología que afecta a las membranas basales alveolar y glomerular (esenciales en la barrera de ultrafiltración de la sangre) y se caracteriza por una hemorragia pulmonar y una glomerulonefritis rápidamente progresiva (Savage et al., 1986), (Kluth and Rees, 1999), (Borza, 2007) que resulta en un fallo renal terminal si no se instaura un tratamiento urgente (Ambrus and Sridhar, 1997), (Avella and Walker, 1999). Fue descrita por primera vez por Ernest Goodpasture durante la pandemia de gripe de 1919. El Síndrome de Goodpasture está mediado por anticuerpos circulantes que se depositan de forma lineal en la membrana basal del glomérulo renal y del alveolo pulmonar (Saus et al., 1988), (Kalluri et al., 1995), (Kalluri et al., 1996), (Salama et al., 2001). Estos anticuerpos están dirigidos contra el dominio C-terminal no colagenoso (NC1) de la cadena $\alpha 3$ del colágeno IV [$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$], también llamado antígeno Goodpasture (Ag GP). Después de unirse a sus dianas en la membrana basal, los anticuerpos (típicamente IgG) inician el daño local tisular por la activación del sistema del complemento y el reclutamiento de células inmunes efectoras, como macrófagos y neutrófilos, vía receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas.

6.2. GPBP

Estudios comparativos entre dominios NC1 han permitido identificar en el extremo N-terminal del Ag GP humano una región altamente divergente y fosforilable *in vitro* (Quinones et al., 1992), (Revert et al., 1995). Además, en humanos pero no en otros mamíferos superiores la región génica que codifica el Ag GP genera múltiples ARNm mediante reordenamiento exónico (Bernal et al., 1993), (Penadés et al., 1995). Los productos alternativos divergen entre sí en su

región C-terminal y comparten la región N-terminal fosforilable (Penadés et al., 1995). Los extremos C-terminal divergentes inducen de forma desigual la fosforilación por la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) del correspondiente extremo N-terminal (Saus, J. Goodpasture antigen Binding Protein. Utility Patent Application PCT/IB00/00324. Publication nº WO00/50607), (Saus, J. Methods and reagents for treating autoimmune disorders. Utility Patent Application PCT/EP02/01010. Publication nº WO02/061430), sugiriendo que los extremos C-terminal activan la fosforilación por PKA y que esta quinasa, u otra muy similar, fosforila endógenamente el extremo N-terminal del antígeno. De acuerdo con esta idea, péptidos sintéticos que representan los extremos C-terminal alternativos inducen la fosforilación por PKA del extremo N-terminal del antígeno primario (Saus, J. Goodpasture antigen Binding Protein. Utility Patent Application PCT/IB00/00324. Publication nº WO00/50607), (Saus, J. Methods and reagents for treating autoimmune disorders. Utility Patent Application PCT/EP02/01010. Publication nº WO02/061430). Basándose en estos resultados y utilizando bibliotecas de expresión de cDNA humano, un péptido sintético de 21 residuos de la región N-terminal del Ag GP y anticuerpos monoclonales contra dicho péptido, el grupo del Dr Juan Saus identificó un cDNA de 6.4 Kb que codificaba para una proteína de 624 aminoácidos a la que denominaron GPBP (Raya et al., 1999). La contrapartida recombinante de GPBP era capaz de catalizar *in vitro* la fosforilación del Ag GP humano en la región N-terminal incluyendo el sitio principal para la PKA, así como los residuos serina y/o treonina presentes en su propia molécula (autofosforilación) (Raya et al., 1999). GPBP presenta un alto número de aminoácidos fosforilables siendo la serina el residuo más abundante. Estructuralmente, GPBP posee un dominio homólogo a pleckstrina en su región N-terminal, lo que sugiere una localización en la membrana plasmática (Lemmon and Ferguson, 2001), (Lemmon et al., 2002), un dominio FFAT, que dirige proteínas al retículo endoplásmico, y un dominio START en la región C-terminal, potencialmente implicado en el transporte de lípidos, incluido ceramida (Tsujiyama and Hurley, 2000). Por último, esta proteína presenta una señal bipartita de localización nuclear (Saus et al., 1988).

GPBP está codificado por el gen *COL4A3BP* que se encuentra en el cromosoma 5q13.3, situado cabeza-con-cabeza con *POLK* el gen que codifica para la ADN polimerasa kappa ($\text{pol } \kappa$), un nuevo miembro de la superfamilia de DNA polimerasas que extienden horquillas aberrantes de DNA replicante (Granero et al., 2005). *POLK* y *COL4A3BP* comparten 140-pares de bases ricas en GC que son significativamente homólogas a regiones intergénicas de un buen número de unidades bi-direccionales incluyendo aquellas que transcriben los genes que codifican las cadenas α del colágeno IV. Esta región contiene un sitio Sp1 y un sitio tipo TATA, comúnmente asociados con el inicio de la transcripción, y un elemento de unión a NF κ B. Cabe destacar que la

expresión del gen *COL4A3BP* está regulada positivamente por la citocina pro-inflamatoria TNF- α (Granero et al., 2005).

A pesar de que GPBP muestra una expresión ubicua, presenta preferencia por células y tejidos celulares que normalmente se asocian con el desarrollo de patologías autoinmunes. En el riñón GPBP se localiza en la membrana basal glomerular, en las células epiteliales de los túbulos y en las células mesangiales y podocitos del glomérulo. En los alvéolos pulmonares presenta una disposición lineal que sugiere una localización en la membrana basal y en los neumocitos. También se expresa a nivel del endotelio vascular. En el tejido hepático presenta baja expresión en el parénquima pero alta en los conductos biliares. En el sistema nervioso central se expresa en la materia blanca pero poco en neuronas. En el testículo existe una alta expresión en las espermatogonias y en el páncreas se localiza principalmente en los islotes de Langerhans. En general, en los tejidos donde se expresa, GPBP presenta un patrón citosólico difuso (Raya et al., 2000). Por último cabe destacar que la expresión tisular relativa de GPBP está fuertemente aumentada en el contexto de procesos inflamatorios (Raya et al., 2000).

6.2.1. Isoformas de GPBP.

Se han identificado al menos tres isoformas de GPBP generadas mediante *splicing* alternativo o mediante el uso de un sitio de iniciación de la translación alternativo (Revert et al., 2008). GPBP-1 (77 kDa), anteriormente denominado GPBP, es la forma de la proteína canónica y es secretada al compartimento extracelular en donde, entre otras actividades, puede unirse al colágeno de tipo IV. Una variante de GPBP-1 generada por *splicing* alternativo es GPBP-2, anteriormente denominado GPBP Δ 26 o CERT, que carece de un motivo de 26 residuos rico en serina codificado por el exón 2 de 78 pb (Raya et al., 2000). GPBP-2 se localiza fundamentalmente en el citosol (Raya et al., 2000), transporta ceramida entre el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi (Hanada et al., 2003) e induce la secreción proteica (Fugmann et al., 2007). Por último, GPBP-3 (91 kDa) es una variante que resulta de la iniciación de la translación del RNAm de un sitio no canónico en posición 5' al ATG canónico que se localiza en membranas celulares y que promueve la secreción de GPBP-1 (Revert et al., 2008). GPBP-3 puede sufrir modificaciones covalentes post-traduccionales que modifican la región de 26 residuos rica en serina dando lugar a un producto de 120 kDa.

6.2.2. GPBP y glomeruloesclerosis autoinmune.

El hecho de que la expresión tisular de GPBP esté fuertemente incrementada en procesos inflamatorios/autoinmunes y que este factor interactúe con el colágeno de tipo IV de las membranas basales nos llevó a analizar la implicación de GPBP en la patogénia de la glomerulonefritis asociada al desarrollo de Lupus Eritematoso Sistémico (LES). En primer lugar, se observó que los ratones NZW desarrollaban espontáneamente una glomerulonefritis mesangial asociada a la producción de autoanticuerpos (autoAc) y al depósito glomerular de IgA. Histológicamente las lesiones glomerulares consistían en una expansión de la matriz mesangial, debida al acúmulo aberrante de colágeno de tipo IV (glomeruloesclerosis), y una desorganización de la membrana basal glomerular (MBG) en donde las dos redes de colágeno tipo IV que la componen, la red $\alpha1.\alpha1.\alpha2(IV)$ y la red $\alpha3.\alpha4.\alpha5(IV)$, aparecían disociadas (Revert et al., 2007). La desorganización de la MBG se asociaba a un incremento en la expresión de GPBP-1 y al depósito de inmunocomplejos de tipo IgA (nefropatía IgA). La relación causa-efecto entre el incremento en la expresión de GPBP, las alteraciones ultraestructurales de la MBG, el depósito glomerular de inmunocomplejos y en definitiva el desarrollo de glomeruloesclerosis, quedó definitivamente de manifiesto con el estudio de ratones B6 transgénicos que sobre-expresaban GPBP-1 en el riñón. En estos animales se reproducían todas las anomalías glomerulares observadas en los ratones NZW viejos aunque no se observó la producción espontánea de autoAcs (Revert et al., 2007). Estos estudios constituyeron la primera prueba directa de la implicación de GPBP en el desarrollo de patologías asociadas al depósito aberrante de colágeno (en este caso colágeno de tipo IV y glomeruloesclerosis) y constituyen el punto de partida para analizar la implicación de este enzima en otros tipos de fibrosis patológicas (fibrosis pulmonar por ADR en el presente estudio).

OBJETIVOS

Durante los últimos años, diversos estudios han arrojado luz sobre la comprensión de los mecanismos patogénicos de la Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI), la forma más común de neumonía intersticial. En este sentido, los modelos animales resultan ser muy útiles para revelar los factores de susceptibilidad a la enfermedad. Los métodos más comunes incluyen irradiación, instilación intratraqueal de Bleomicina o FITC, inhalación de sílice o asbesto, y el uso de ratones transgénicos. De todos ellos, algunos son capaces de imitar el perfil de citocinas y otros la patología propios de la FPI humana, pero ninguno recrea el cuadro patológico completo. A pesar de que el agente más empleado para la inducción de fibrosis pulmonar experimental en animales es la Bleomicina, su administración no recapitula algunas de las características de la FPI, en consecuencia, resulta necesario el desarrollo de nuevos modelos animales.

En base a este hecho nos propusimos evaluar los efectos de la administración intratraqueal de ADR en la inducción de la inflamación pulmonar y la fibrosis *in vivo* con un amplio abordaje que incluía también el estudio del papel que juega GPBP como regulador del proceso fibrótico. Por tanto, los objetivos concretos que nos planteamos en la presente tesis fueron los siguientes:

1. Determinar si la instilación intratraqueal de ADR es capaz de desencadenar una respuesta inflamatoria y fibrótica en el pulmón, alterando los niveles de expresión de colágeno tipo I y tipo IV (marcadores de fibrosis) en el parénquima pulmonar.
2. Evaluar el número y frecuencia de las diferentes poblaciones de células inmunocompetentes, tanto en el fluido del lavado broncoalveolar (BALF) como en el parénquima pulmonar, y los patrones de las diferentes citocinas pro-inflamatorias inherentes al desarrollo de la respuesta inmune en los pulmones expuestos a ADR.
3. Investigar los patrones de expresión de las citocinas y factores de transcripción nuclear que caracterizan a las distintas subpoblaciones de linfocitos T-CD4⁺ y, más concretamente, la participación de la población TH17 en el desarrollo de la patología pulmonar tras la administración de ADR.
4. Determinar el papel de GPBP en el desarrollo de la patología pulmonar inducida por ADR.
5. En este último caso, evaluar si la administración de anticuerpos monoclonales ó fármacos que inhiban específicamente a GPBP influye en la evolución del proceso inflamatorio pulmonar tras la instilación de ADR.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Ratones.

1.1. Ratones consanguíneos.

En la mayor parte de los experimentos se utilizaron ratones machos C57BL/6 (B6) de 10-12 semanas de edad procedentes de Harlan Ibérica (Barcelona, España).

1.2. Ratones mutanes

Para la producción de anticuerpos monoclonales se emplearon ratones Nude (*Nu/Nu*) procedentes de Harlan Ibérica (Barcelona, España). Estos ratones portan una mutación que afecta al desarrollo del epitelio cortical tímico, por lo que no generan linfocitos T, siendo de esta forma ratones atímicos.

1.3. Ratones Knock-out B6.129-Il17ra(tm1Koll) (IL-17RA^{-/-}).

Estos ratones fueron descritos por primera vez por Ye P. y cols en 2001 (Ye et al., 2001) y se desarrollaron a partir de la inserción de un vector génico en el que se sustituyeron 5,7 Kb que contienen los exones 4-11 del ADNc de IL-17R murino con un casete PGKneo y la inserción de un casete de timidina quinasa (MC-TK) en el extremo 5' del vector. Este vector se insertó por electroporación en células madre embrionarias y los clones positivos se inyectaron posteriormente en blastocistos de ratones B6. Los ratones quimera resultante se cruzaron con ratones B6 para generar ratones heterocigotos (IL-17R^{+/-}), que posteriormente se entrecruzaron para generar ratones deficientes en IL-17R. Dichos ratones fueron trasladados a un fondo genético B6 tras cinco generaciones. Los ratones fueron amablemente cedidos por el Dr. Joel Tocker (Molecular Sciences, Amgen, Seattle).

2. Mantenimiento y manipulación de los animales.

Todos los animales empleados en el presente trabajo fueron mantenidos y manipulados en las instalaciones de animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria. Los animales se alojaron en un cuarto libre de patógenos con sistemas de ventilación y renovación de aire estériles (circulación cerrada en cada caja), con agua y comida esterilizados, para mantener las condiciones SFP del animal. La manipulación de los animales se realizó siguiendo en todo momento la normativa del Real Decreto 1201/2005, recogida en el nº252 del BOE.

Cuando fue necesaria una anestesia ligera, los ratones fueron introducidos en una cámara conteniendo vapores éter dietílico. Para las intervenciones quirúrgicas, se inyectó vía intraperitoneal (i.p.) un cóctel anestésico compuesto por 50 mg/kg de ketamina (Ketolar™, Parke-Davis, Barcelona, Spain), 200 µg/kg de atropina sulfato (B. Braun Medical, Madrid, Spain) y 4 mg/kg de diazepam (Valium™, Roche, Madrid, Spain).

3. Inducción de fibrosis pulmonar por administración de Adriamicina (ADR).

En primer lugar disolvemos la Adriamicina (ADR) (Doxorrubicina, Sigma) en solución salina estéril, obteniendo una concentración final de 1 mg/ml. Tras anestesiar al animal con el cóctel ketolar-atropina-diazepam descrito anteriormente, se practica una incisión cutánea vertical en la cara anterior del cuello de aproximadamente 5 mm. Con ayuda de unas pinzas de microdissección se inmoviliza la traquea y se inyectan 75 µl de la solución de ADR en las vías respiratorias mediante el uso de una aguja de 30G. Para evitar que al animal expulse la solución mediante el reflejo de la tos se realiza un movimiento de sacudida vertical del animal que facilite la entrada de la ADR en ambos pulmones. Posteriormente, suturamos la piel con seda de 3/0. En el grupo control, procedemos de igual modo inyectando el mismo volumen de salino. Para prevenir la hipotermia post-anestesia, los animales se colocan bajo una fuente de calor durante un par de horas.

A los 7 y 14 días de la exposición a ADR, sacrificamos a los animales en la cámara de éter dietílico y recogemos los dos pulmones para estudios anatomopatológicos y moleculares.

4. Producción de anticuerpos monoclonales de rata.

Para administración *in vivo*, en distintos experimentos, se produjeron y purificaron anticuerpos monoclonales (AcMs) a partir de las siguientes líneas de hibridomas: 1D11.16.8 (anti-TGF-β1), 6B4 (anti-IL-6) y mAb14 (anti-GPBP). Las células se expandieron *in vitro* mediante cultivo en DMEM suplementado (ver apartado de reactivos) durante aproximadamente una semana. En ratones atímicos Nude (*Nu/Nu*), previamente estimulados por vía i.p. con Pristano (2,6,10,14-tetrametil-pentadecano, Sigma), se inyectaron por vía i.p. 5-10 x 10⁶ células de hibridoma por ratón. Cuando fue evidente la existencia de ascitis, se extrajo por punción peritoneal bajo anestesia. Con toda la ascitis recogida (en varios días) se hizo un pool, se centrifugó a 2095 x g 10 min., se filtró y se conservó a -20°C hasta el momento de su uso.

4.1. Purificación de los anticuerpos obtenidos por ascitis.

La purificación y cuantificación de IgG en la ascitis, se llevó a cabo por el método de precipitación con ácido octanoico (o caprílico) (Sigma), que consiste en una doble precipitación sucesiva con ácido octanoico y sulfato amónico. Por cada volumen de líquido ascítico se añadieron 4 volúmenes de tampón acetato 60 mM pH 4 (ver apartado de reactivos), ajustando el pH a 4.5 con NaOH 1 M. Seguidamente, se llevó a cabo la primera precipitación añadiendo lentamente y con agitación 25 µl de octanoico por cada ml de la solución obtenida, incubándose durante 30 min. en agitación a RT. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 12000 r.p.m. y se recuperó el sobrenadante. Añadimos PBS-10X en un volumen que quede finalmente al 1X y se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 1M. Se lleva a cabo entonces la segunda precipitación con Sulfato Amónico Saturado (SAS, ver apartado de reactivos) (Sigma) al 50% (v/v) pH 7 y se incubó 16 h a 4°C en agitación. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó la muestra a 12000 r.p.m y resuspendimos el pellet con PBS-1X. Dializamos la solución 3 días con PBS-1X haciendo varios cambios y cuantificamos la concentración de IgG mediante densidad óptica a λ 280 nm, mediante la fórmula $1.4 \times D.O._{280} = 1 \text{ mg Ig G/ml}$. Una vez cuantificado, se almacenó a -20°C hasta su uso.

5. Tratamientos.

5.1. Bloqueo in vivo de la acción de las citocinas IL-6 y TGF- β 1.

El tratamiento consistió en la administración por vía i.p. (sistémica) de 500 µg del AcM anti-IL-6 cada 2 días o de 1 mg por semana repartido en 3 dosis en el caso de anti-TGF- β 1, según el grupo, durante 14 días a partir del día 0 respecto a la administración de ADR.

5.2. Bloqueo in vivo de GPBP-1.

El tratamiento consistió en la administración por vía i.p. (sistémica) de 25 µg por semana en dosis única en el caso del AcM anti-GPBP N12 y de 1 mg por semana repartido en 3 dosis en el caso del AcM anti-GPBP mAb14 durante 14 días a partir del día 0 respecto a la administración de ADR.

5.3. Administración de fármacos moduladores de la actividad de GPBP.

Con el fin de evaluar los posibles efectos de inhibidores de GPBP, se ha rastreado la quimioteca *Prestwick Chemical Library*®, compuesta por moléculas orgánicas ya autorizadas

para diferentes usos clínicos, y por lo tanto con una toxicidad escasa o nula. Mediante ensayos *in vitro* (lab. de J. Saus, CIPF, Valencia), se han identificado 16 compuestos que inhiben entre el 50 y el 90% de la actividad de autofosforilación de GPBP y otros 15 que inhiben, entre un 65 y un 80% la interacción de GPBP con el colágeno y más concretamente con el dominio $\alpha 3(IV)NC1$. De estos 16 productos se seleccionaron los dos en los que el efecto fue más marcado: Myricetin y Pinacidil. Estos fármacos se inyectaron i.p. solos o en combinación, según el grupo, a partir del día 0 respecto a la administración de ADR hasta el momento del sacrificio. Las dosis ensayadas fueron diferentes según el fármaco, siendo 0.245 mg/Kg, 0.082 mg/Kg y 0.027 mg/Kg en el caso de Pinacidil; y 0.95 mg/Kg, 0.34 mg/Kg y 0.11 mg/Kg en el caso de Myricetin.

6. Estudios anatomopatológicos.

El desarrollo de fibrosis pulmonar se evaluó mediante estudios anatomopatológicos. Habitualmente se empleó el pulmón derecho, dejando el izquierdo para otro tipo de estudios que se describirán más adelante. Para ello, tras pinzar el bronquio izquierdo, se expandió el pulmón derecho perfundiendo 500 μ l de formol tamponado al 4% mediante punción endotraqueal. El pulmón perfundido se mantuvo 24 h en formol tamponado al 4% y posteriormente se incluyó en parafina. Se realizaron secciones de 5 μ m que se procesaron para tinciones con hematoxilina-eosina (H&E) y tricrómico de Masson (Mss), empleando los métodos convencionales. Las preparaciones obtenidas se analizaron con un microscopio óptico (Nikon, Eclipse E 400) y la presencia de daño tisular y desarrollo de fibrosis se valoró de acuerdo a dos criterios:

1. El porcentaje de epitelio alveolar con fibrosis intersticial (representándose 0: no fibrosis, o % de área pulmonar afectada) y
2. La intensidad del daño tisular: (0): no fibrosis; (1): Mínimo engrosamiento de los tabiques alveolares; (3): Lesiones focales dispersas de predominio perivascular o peribronquial; (5): Engrosamiento moderado de los tabiques alveolares sin alteración de la arquitectura pulmonar; (7): Moderado engrosamiento de los tabiques alveolares con pérdida local de la estructura pulmonar; (9): Severa distorsión de la arquitectura pulmonar; (10): Obliteración alveolar total).

7. Ensayos con suspensiones celulares frescas.

7.1. Lavado bronquio-alveolar.

Seis días después de la administración de ADR o salino los ratones fueron sacrificados mediante exsanguinación, bajo anestesia ligera con éter dietílico, y se procedió a la realización de una traqueotomía. El fluido del lavado bronquio-alveolar (BALF) se obtuvo mediante dos lavados consecutivos de las vías aéreas con 1 ml y 0,8 ml de PBS frío, con ayuda de una jeringa de 1 ml y aguja de 30G. El tubo con la suspensión celular recogida se introdujo en hielo hasta su centrifugación a 524 x g 5 min. a 4°C. Tras esto se contó el número de células viables obtenidas mediante exclusión de Azul Tripán (ver apartado 7.3) y se utilizaron para estudios de citometría de flujo (ver apartado 7.4) y tinción May-Grünwald Giemsa (ver apartado 7.5).

7.2. Obtención de suspensiones celulares simples de pulmón.

A día 7 post-administración de ADR o salino, se extrajeron los pulmones para el análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares presentes en la totalidad del órgano. Todo el procedimiento se realizó según el protocolo descrito por Sauer KA y colaboradores, publicado en Nature Protocols (Sauer et al., 2006), con algunas modificaciones.

En primer lugar se llevó a cabo el sacrificio del animal por dislocación cervical. Trabajando siempre en condiciones asépticas, se extrajeron los pulmones, se introdujeron en un falcón de 15 ml que contenía 5 ml de medio RPMI completo frío (ver apartado de reactivos) y se depositaron rápidamente en hielo. Posteriormente, transferimos los pulmones a una placa Petri (guardando el medio que lo contenía en hielo hasta su uso) y se cortaron con ayuda de un bisturí en fragmentos pequeños de aproximadamente 1-2 mm. Acto seguido, se depositaron estos fragmentos en un tubo que contenía 5 ml de solución colagenasa y se procedió a su digestión incubándolo 1 h a 37°C en agitación horizontal. El producto resultante, se pasó por un filtro de células de 70 µm ayudándonos con el émbolo de una jeringa y se lavó bien con los 5 ml de medio RPMI guardados con anterioridad. Se centrifugó la preparación a 524 x g 5 min. a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de buffer de lisis ACK (ver apartado de reactivos), que va a provocar la lisis de los eritrocitos existentes en la muestra. Tras incubar 10 min. a RT, centrifugamos de nuevo a 524 x g 5 min. a 4°C. Para finalizar, decantamos el sobrenadante y realizamos dos lavados con 10 ml de PBS, centrifugando la muestra entre ambos. Seguimos el mismo procedimiento para cada una de las muestras, partiendo de un tubo por ratón y tratándolo de forma individual.

Esto tiene como resultado una suspensión celular de pulmón completo, que nos va a permitir analizar las poblaciones celulares por citometría de flujo (ver apartado 7.4), previo recuento del número de células viables por exclusión de Azul Tripán (ver apartado 7.3).

7.3. Recuento de células viables por exclusión de Azul Tripán.

El número de células viables en las suspensiones celulares obtenidas se determinó mediante exclusión de Azul Tripán y recuento en una cámara de Neubauer (0.1 mm, 0.025 mm³, Marienfeld Germany). En base a la turbidez de la suspensión, se preparó una dilución adecuada para intentar obtener un nº de células de 60-100 por cuadrante de la cámara. En esta dilución, se incluyó Azul tripán en una proporción de 1:10. Tras examen al microscopio óptico, las células excluyentes del colorante fueron consideradas células viables, calculándose el nº total de células de la muestra según la siguiente fórmula:

$$\text{Media células viables} \times \text{Factor Dilución} \times 10^4 \times \text{Vol Muestra}$$

7.4. Detección y cuantificación de poblaciones linfoides mediante citometría de flujo.

Para el análisis citométrico se emplearon 10⁶ células, que fueron teñidas con los AcMs adecuados conjugados a diferentes fluorocromos: FITC (fluoresceína isotiocianato), PE (ficoeritrina), PerCP (peridín-clorofila α -proteína) o APC (aloficocianina). Para el análisis de moléculas de superficie, las células fueron lavadas una vez con 2 ml PBS en tubos de polipropileno de 5 ml. Tras resuspender el pellet, se bloquearon los receptores de Fc para evitar uniones inespecíficas de los AcMs. Para ello, las células se incubaron durante 2-3 min. a RT con 30 μ l de una solución 1:100 de sobrenadante de IgG2b de rata anti-Fc γ RII (hibridoma H2B4, clon 2.4G2), que contiene una elevada concentración de este AcM. A continuación se añadieron 50 μ l de las diluciones adecuadas (en PBS) de los AcMs conjugados a fluorocromo. Tras una incubación de 25-30 min. a 4°C en oscuridad, se procedió a lavar 2 veces con 2 ml de PBS, con el fin de retirar el exceso de AcM no unido. Cuando el AcM empleado estaba conjugado con biotina, se procedió a una segunda incubación con StreptAvidina conjugada a PerCP o APC. Tras el marcaje las células fueron resuspendidas en todos los casos en 250 μ l de PBS y conservadas a 4°C hasta el momento de su análisis en el citómetro.

Cuando las muestras se pasaron por el citómetro al día siguiente del marcaje, al terminar éste se fijaron con PFA-2% para mantener la integridad de la estructura celular, evitando la

alteración de los complejos Ag-Ac. Todos los anticuerpos empleados en el presente trabajo son inmunoglobulinas monoclonales de rata anti-ratón y fueron suministrados por BD Pharmingen (San Diego, USA). En la tabla 2.1 se recogen los anticuerpos empleados, el clon y la cantidad empleada ($\mu\text{g}/10^6$ células).

En general, se adquirieron $3-4 \times 10^4$ células dentro de la región de células mononucleares viables (acotada en base a los parámetros de tamaño o FSC y complejidad celular o SSC) en un citómetro de flujo FACScanto (Becton Dickinson, Palo Alto, CA, USA). El estudio de las diferentes subpoblaciones celulares deseadas se realizó mediante análisis fenotípico empleando el software FACSDiva, en base al perfil de expresión simultánea de un conjunto de marcadores.

<i>AcM</i>	<i>Clon</i>	<i>μg</i>
anti-CD3	145-2C11	0.165
anti-CD4	GK1.5	0.165
anti-CD8a	53-6.7	0.070
anti-B220 / CD45R	RA3-6B2	0.025
anti-CD11b	M1/70	0.025
anti-CD11c	HL3	0.200
anti-CD62L	MEL-14	0.165
anti-CD69	H1.2F3	0.165
anti-CD45Rb	16A	0.040
anti-CD80	16-10A1	0.165
anti-CD44	IM7	0.070
anti-CD25	PC61	0.060
anti-IAb	25-9-17	0.165
anti-FoxP3	FJK-16s	0.070
anti-Gr1	RB6-8C5	0.100
Anti-NK1.1	PK136	0.165
anti-IgG1	G235-2356	0.0125
anti-IgG2a	eBR2a	0.0125

Tabla 2.1. Anticuerpos monoclonales para citometría de flujo.

7.5. Detección de poblaciones celulares mediante la tinción May-Grünwald-Giemsa.

Primeramente, se sometieron las células a un citospin a 700 r.p.m. durante 10 min. (Cytospin 3®, Thermo Shandon, Ltd, Astmoor, United Kingdom) y se dejó secar el portaobjetos con las células al aire. Una vez seco, se pasó rápidamente por una llama para fijar las células y se procedió a teñir las células con el colorante May-Grünwald (Merck) durante 2 min. Tras lavar abundantemente con agua, se incubaron las células 18 min. con el colorante Giemsa (Merck) diluido 1/3 en agua destilada y se lavó de nuevo. Dejamos secar el portaobjetos al aire y lo montamos con DPX. Con la ayuda de un microscopio óptico se llevo a cabo un conteo diferencial de 200 células usando criterios morfológicos estandarizados para dicha técnica.

8. Purificación de ARNm total.

El ARN total fue aislado del pulmón izquierdo completo por el método de extracción fenol-cloroformo con TRizol Reagent® (Invitrogen™ Life Technologies), aunque con pequeños cambios en el procedimiento estándar. Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que provoca la lisis celular y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica). Seguidamente se lleva a cabo la extracción y precipitación del ARN total con cloroformo e isopropanol respectivamente a partir de la fase acuosa.

Cada pulmón se homogenizó individualmente en un mortero agregando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Dicho polvo se añadió a un tubo eppendorf que contenía 750 µl de TRizol Reagent® (fenol-sales de guanidina). Entre una muestra y otra el mortero se lavó dos veces con HPLC (Panreac) y agua DEPC (dietil-pirocarbonato, Serva) al 0.001% (ver apartado de reactivos). El tejido homogenizado se centrifugó a 15600 x g 8 min. a 4°C; en este paso se eliminan los restos celulares resultado de la acción del TRizol®. El sobrenadante se transfirió a un eppendorf y se adicionaron 150 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 s. y se incubó a RT durante 2-3 min. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 15600 x g por 10 min. a 4°C; en este paso se forman dos fases por diferencia de densidad: 1) Una fase fenólica orgánica que contiene al ADN y restos de proteínas desnaturalizadas y 2) Una fase superior acuosa que contiene el ARN en cloroformo. Esta fase acuosa se transfirió a un nuevo eppendorf y se incubó 10 min. a RT con 375 µl de isopropanol (precipitación del ARN). Centrifugamos a 15600 x g 10

min. a 4°C, lavamos el pellet con 750 µl de etanol frío al 75% y centrifugamos de nuevo a 5200 x g 5 min. a 4°C. Tras el lavado se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet al aire (con el tubo abierto) aproximadamente 5 min. en hielo. Al final, el pellet de ARN se disolvió en 30-35 µl de agua DEPC al 0.001% estéril, dependiendo de su tamaño, y se almacenó a -80°C hasta su uso.

8.1. Determinación de la concentración, pureza e integridad del ARN total.

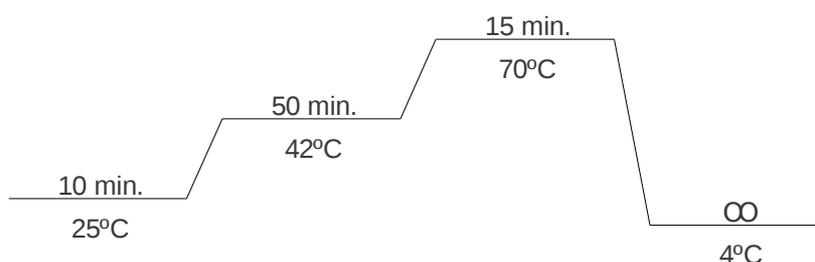
Para conocer la concentración del ARN total se preparó una dilución 1:100 con agua DEPC y se midió la absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop 1000). Una vez conocidos los valores de absorbancia, la concentración se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{A_{260} \times \text{Factor Dilución} \times 40 \text{ ug/ml}}{1000}$$

La relación de absorbancias a 260/280 indica la pureza del ARN, considerándose que las relaciones entre 1.7 a 2.0 unidades son las óptimas. Para determinar la integridad del ARN total extraído, se sometió una muestra a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. Se mezclaron 2 µl de la muestra de ARN con 3 µl de ARN mix (ver apartado reactivos) y 10 µl de agua DEPC y se realizó la electroforesis a 120 voltios durante 30-40 min. El ARN se observó en un transiluminador con luz ultravioleta a 260 nm. La radiación UV es absorbida por el ARN y emitida al bromuro de etidio, que a su vez, emite la radiación a 590 nm en la región rojo-naranja del espectro visible. Además, se tomó una fotografía de las muestras de ARN.

9. Síntesis de ADNc.

A partir de 5 µg de ARN se sintetizó ADN complementario (ADNc) de cadena sencilla de cada una de las muestras, usando la transcriptasa reversa SuperScript™ II (Invitrogen™ Life Technologies), según las especificaciones del fabricante; y empleando hexámeros aleatorios como cebadores de la reacción. El programa del termociclador fue el siguiente:



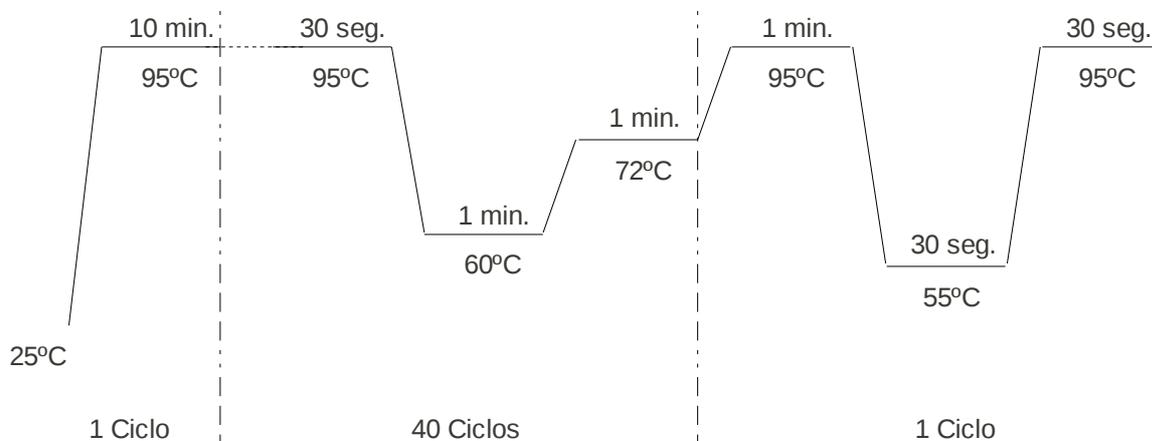
10. Estudios de expresión por RT-PCR cuantitativa a tiempo real (RTqPCR).

Esta técnica es una variante de la PCR utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN o ADNc y, de este modo, podemos conocer el nº de copias de un determinado gen presentes en nuestra muestra.

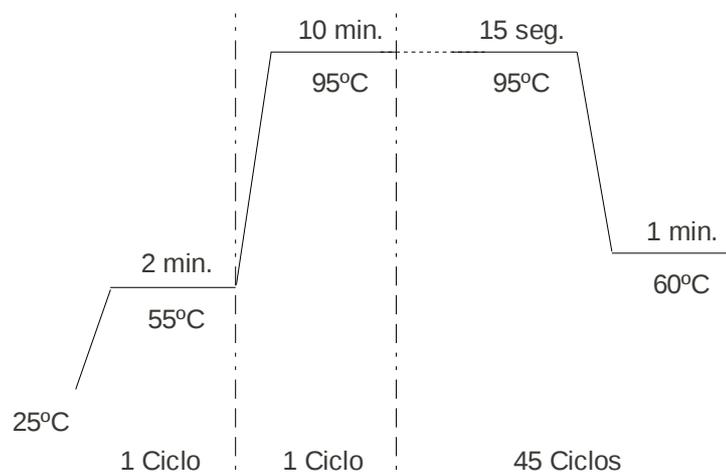
Con el ADNc obtenido tras la retrotranscripción, se realizaron RTqPCR para estudiar la expresión de colágenos (I y IV), y la expresión de distintas citocinas y factores de transcripción. Para ello, se empleó la molécula fluorescente SYBRGreen (BioRad) y sondas TaqMan (Applied Biosystems), respectivamente. Los primers empleados con SYBRGreen fueron diseñados con la ayuda del programa informático Primers 3. Además, en todos los casos se utilizó como gen de control endógeno el 18s ribosómico. En la Tabla 2.2 se enumeran los cebadores y sondas empleados, indicando el nombre, el tipo de sonda y la secuencia o código.

Tanto las reacciones para iSYBRGreen Master Mix (BioRad) como para TaqMan (Applied Biosystems), se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante, manteniendo las proporciones de los distintos reactivos. En ambos casos, de cada muestra se realizaron duplicados de 10 µl/pocillo en placas de 96 pocillos específicas para RTqPCR (Thermo Scientific), selladas con películas adhesivas también específicas (Thermo Scientific). Todas las muestras se procesaron en un termociclador MX-3000P de Stratagene (La Jolla, CA, USA) y el esquema de los ciclos de amplificación utilizados fue el siguiente:

xSYBRGreen:



xTaqMan:



Los datos de fluorescencia de cada una de las muestras fueron analizados con el software específico del aparato de forma individualizada, mediante el método $2[-\Delta\Delta Ct]$ y utilizando la media del grupo control (tratado con salino) como calibrador.

<i>Gen</i>	<i>Técnica</i>	<i>Código o Secuencia</i>
$\alpha 1(I)$ colágeno	SYBR Green	5'-TCCTGCTGGTGAGAAAGGAT-3' 3'-CTGGAGTCCCATAACGACCT-5'
$\alpha 1(IV)$ colágeno		5'-AGGACAGCCAGGTTTGACAG-3' 3'-CTCTAACCAAAGGGACCTGT-5'
$\alpha 3(IV)$ colágeno		5'-AGGTTGTCCTGGTGAGATGG-3' 3'-CTCCAACCTTACTACCCGAT-5'
GPBP		5'-GCTGTTGAAGCTGCTCTTGACA-3' 3'-AAGTGTCTAAGTCGAGGGTCC-5'
18s		5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' 3'-GCGATGATGGCTAACCTACC-5'
<i>Mouse</i> IL-1 β	TaqMan	Mm00434228_m1
<i>Mouse</i> IL-2		Mm00434256_m1
<i>Mouse</i> IL-4		Mm00445259_m1
<i>Mouse</i> IL-6		Mm00446190_m1
<i>Mouse</i> IL-10		Mm00439616_m1
<i>Mouse</i> IL-12a		Mm00434165_m1
<i>Mouse</i> IL-13		Mm00434204_m1
<i>Mouse</i> IL-17a		Mm00439619_m1
<i>Mouse</i> IL-21		Mm00517640_m1
<i>Mouse</i> IL-22		Mm00444241_m1
<i>Mouse</i> IL-23-p19		Mm00518984_m1
<i>Mouse</i> IL-27		Mm00461164_m1
<i>Mouse</i> TNF- α		Mm00443258_m1
<i>Mouse</i> TGF- $\beta 1$		Mm00441724_m1
<i>Mouse</i> TGF- $\beta 3$		Mm00436960_m1
<i>Mouse</i> IFN- γ		Mm00801778_m1
<i>Mouse</i> IL-1 β		Mm00434228_m1
<i>Mouse</i> Tbx21/T-bet		Mm00450960_m1
<i>Mouse</i> GATA-3		Mm00484683_m1
<i>Mouse</i> Rorc/ROR γ T		Mm00441139_m1
<i>Mouse</i> FoxP3	Mm00475156_m1	
18S rRNA Control kit de Takara®	Ref. RT-CKYD-18S	

Tabla 2.2. Cebadores para RTqPCR.

11. Estudios *in vitro* con macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs).

11.1. Diferenciación de BMDMs.

Los macrófagos derivados de médula ósea son macrófagos primarios obtenidos a partir de cultivos *in vitro* de células de médula ósea en presencia de factores de crecimiento. El GM-CSF es un factor de crecimiento específico de linaje responsable de la proliferación y diferenciación de las células mieloides progenitoras a células del linaje monocito/macrófago maduras; por tanto, la presencia de este factor en el medio de cultivo (secretado por las células L929 y utilizado en forma de medio condicionado) dirigirá dicha diferenciación.

11.1.1. Preparación del medio condicionado L929.

Las células de la línea L929 se expandieron *in vitro* mediante cultivo en DMEM suplementado, a una concentración de 5×10^5 células en 50 ml de medio (en frascos de 75 cm²), a 37°C con 5% CO₂ durante aproximadamente una semana. Transcurrido este tiempo, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a $940 \times g$ 10 min.; se decantó el sobrenadante a un tubo limpio y se conservó a -80°C hasta el momento de su uso (para complementar el medio BMDM).

11.1.2. Aislamiento y diferenciación de macrófagos.

El protocolo se debe llevar a cabo en condiciones asépticas en su totalidad, por tanto, todo el procedimiento se realizó en campana de flujo laminar y con material estéril.

Extrajimos el fémur, la tibia y el peroné de cada ratón, y se depositaron en una placa Petri que contenía PBS estéril. Para realizar la extracción de la médula, se cortó la epífisis de los huesos y se perfundió el interior con medio BMDM (ver apartado de reactivos) ayudándonos con una jeringa de 10 ml y aguja de 25G. Se emplearon 20 ml para cada pata y se plaquearon en 2 placas de Petri (150 mm x 25 mm). Completamos con 15 ml de medio BMDM por placa, por lo que al final obtuvimos 4 placas/ratón con 25 ml/placa. Dichas placas se incubaron durante 6-7 días, añadiendo 10 ml más de medio BMDM fresco a día 3-4.

Una vez pasado este tiempo, se recogieron todas las células en un falcon de 50 ml, se centrifugó a $524 \times g$ 10 min. y se contaron las células viables. Para comprobar la eficiencia de la diferenciación, se realizó una citometría de flujo con marcaje específico de macrófagos (CD11b⁺B220⁻) y, en base a ésta, se re-plaquearon las células según las necesidades de la

inducción *in vitro*:

- Placas de 6 pocillos: 2×10^6 células/pocillo.
- Placas de 12 pocillos: 10^6 células/pocillo.

11.2. Inducción *in vitro* de NFkB y NALP3.

La activación de NALP3 está mediada por la presencia de dos señales secuenciales que promueven, en primer lugar, la activación de NFkB estimulando así la transcripción de IL-1 β e IL-18. Para estudiar el papel del inflammasoma NALP3 en el desarrollo de la fibrosis pulmonar inducida por ADR, quisimos evaluar *in vitro* cada una de las dos señales requeridas para su activación en presencia de ADR.

Con el fin de analizar la posible activación de NFkB, se realizó una cinética en placas de 6 pocillos con ADR a una concentración de 50 μ g/ml, estimulando las células 5 min., 15 min., 30 min. y 75 min.; utilizando como control negativo células sin estimular y como control positivo células estimuladas con LPS (1 μ g/ml) durante 75 min.

En el caso de la inducción de NALP3, se llevó a cabo una primera estimulación de las células con ADR (50 μ g/ml) o LPS (1 μ g/ml) por un período de 120 min. (Señal 1) en placas de 12 pocillos y por duplicado; tras los cuales, se añadió ATP exógeno (5 mM) y se incubaron durante 30 min. más (Señal 2).

En ambos casos, una vez concluido el ensayo se lisaron las células con 100 μ l NP40 al 10% y 5 μ l de DTT 2M, en presencia de inhibidores de proteasas (10 μ l) (Complete Mini EDTA-free, Roche) y se incubaron 10 min. en hielo. Se recogió todo el contenido de los pocillos, se centrifugó a 15600 x g 15 min. y se almacenaron los lisados (sobrenadante) a -20°C hasta su uso.

11.3. Medida de ROS en BMDM.

Las vías de señalización capaces de activar el inflammasoma NALP3 tienen en común la producción de ROS y experimentos realizados con los fármacos inhibidores de ROS Gliburide y Apocynin (Acetovanillona) muestran un bloqueo de la actividad de NALP3. Con el objeto de evaluar si la ADR es capaz de inducir la producción de ROS, se llevó a cabo un experimento de estimulación *in vitro* de BMDMs bajo distintas condiciones: 1) células sin estimular; 2) células en presencia de 100 μ M H₂O₂; 3) células en presencia de 50 μ g/ml de ADR; 4) células en presencia

de 100 μM H_2O_2 + 100 μM Apocynin (Sigma); y 5) células en presencia de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ADR + 100 μM Apocynin; utilizando como control negativo células sin estimular y como control positivo células estimuladas con H_2O_2 (100 μM). En el caso de H_2O_2 y ADR las células se estimularon por un período de 120 min.; sin embargo, para que el Apocynin (Sigma) resultara efectivo fue necesario añadirlo 30 min. antes que dichos estímulos.

El estudio de los niveles de ROS en estas células se llevó a cabo mediante el uso del compuesto $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (Invitrogen) y su detección por el citómetro de flujo FACScanto (Becton Dickinson, Palo Alto, CA, USA). Dicho compuesto (también conocido como 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato) es una forma químicamente reducida de fluoresceína utilizada como un indicador de especies de oxígeno reactivas (ROS) en las células; por ejemplo, en la detección de intermediarios reactivos del oxígeno en neutrófilos y macrófagos. Tras la escisión de los grupos acetato por esterasas intracelulares y una posterior oxidación, la $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ no fluorescente se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que es altamente fluorescente y emite a una longitud de onda de 517–527 nm. Por tanto, un incremento de ésta es indicativo de un aumento de ROS en el interior de las células.

Una vez finalizada la estimulación, se recolectaron las células en tubos de polipropileno de 5 ml y se centrifugaron a 524 x g 5 min. Tras resuspender el pellet, se añadieron 50 μl $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (concentración final 10 μM en DMSO) y se incubaron las células durante 30 min. a 4°C en oscuridad. Tras la incubación se procedió a lavar con 2 ml de PBS y se bloquearon los receptores de Fc para evitar uniones inespecíficas de los AcMs. Para ello, las células se incubaron durante 2-3 min. a RT con 30 μl de una solución 1:100 de sobrenadante de IgG2b de rata anti-Fc γ RII (hibridoma H2B4, clon 2.4G2). A continuación se añadieron 50 μl de un AcM anti-CD11b conjugado a PE (dilución de 1:400 en PBS). Tras una incubación de 25-30 min. a 4°C en oscuridad, se procedió a lavar 2 veces con 2 ml de PBS, con el fin de retirar el exceso de AcM no unido. Por último, las células fueron resuspendidas en todos los casos en 250 μl de PBS y conservadas a 4°C hasta el momento de su análisis en el citómetro.

11.4. Inmunodetección de NF κ B y NALP3 en lisados celulares por Western Blot.

En primer lugar, se realizó la separación de las proteínas por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (29:1)-SDS (dodecil sulfato sódico) al 12%. Como partimos de un número constante de células por pocillo, no se cuantificó la cantidad de proteínas totales y se cargaron directamente 55 μl de muestra por pocillo, que contenían buffer de carga Laemli a una concentración final 1x. La electroforesis vertical se llevó a cabo en aparatos Mini-protean (Bio-

Rad), en tampón TGS y en presencia de un marcador de pesos moleculares (BenchMark Prestained Protein Ladder, Invitrogen). Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) toda la noche a 4°C y a un voltaje constante de 30V, por inmersión en buffer de Transferencia (transferencia húmeda).

Finalizada la transferencia, las membranas se incubaron durante 1.30 h a RT y con agitación en una solución bloqueante, bien TBST al 5% de BSA (seroalbúmina bovina, Sigma) (en el caso de la detección de IκB/fosfo-IκB) o bien TBST al 3% de leche (GE Healthcare) (en el caso de la detección de NALP3 o IL-1β), para bloquear la unión a sitios inespecíficos. Seguidamente se incubaron las membranas con anticuerpo primario (200 μg/ml) diluido en TBST al 2% de BSA (para IκB) o TBST al 1% de leche (para NALP3 o IL-1β) durante 1.30 h como mínimo y en agitación continua. Seguidamente, se realizaron 3 lavados con TBST durante 5 min. cada uno a RT y en agitación. El siguiente paso consistió en incubar la membrana con anticuerpos secundarios conjugados a HRP (*horseradish peroxidase*) a dilución 1:10.000 (ver Tabla 2.3) en una solución TBST con 2% de leche, durante 1.30 h a RT y agitación. Se realizaron de nuevo 3 lavados con TBST de 5 min. cada uno y se procedió a la detección de la proteína por quimioluminiscencia, utilizando el kit ECL™ *Western Blotting detection* (Amersham, Biosciences). Por último, se autorradiografiaron las membranas en películas fotográficas (X-Ray Medical Film, 18x24 cm, Konica Minolta). Finalmente, la intensidad de banda del *western blot* se cuantificó mediante análisis de imagen utilizando el programa *ImageJ*.

Para poder reutilizar las membranas y reincubarlas con otros anticuerpos, se incubaron con una solución *Striping*, durante 20 min. y se lavaron sucesivamente con TBST durante tiempos prolongados, cambiando el buffer varias veces consecutivas.

<i>Molécula reconocimiento</i>	<i>Casa Comercial - Catálogo</i>	<i>Dilución</i>
IκBα	Cell Signaling # 9242	1:500
Fosfo-IκBα (Ser32)	Cell Signaling # 2859	1:1000
Caspasa-1	Cedido por el laboratorio de G.Nuñez (<i>University of Michigan</i>)	---
IL-1β	R&D Systems # AF-401-NA	1:5000
Goat anti-Rabbit	Bio-Rad # 166-2408	1:10000
anti-Goat	Sigma # A5420	1:10000

Tabla 2.3. Anticuerpos para *Western Blot*.

12. Cuantificación de GPBP-1 circulante (cGPBP-1). ELISA.

12.1. Obtención de muestras de suero.

Tras anestesiar a los ratones con éter dietílico (Panreac) se extrajeron unos 200 µl de sangre mediante la punción con un capilar en el seno retroorbitario. Esta sangre se mantuvo durante toda la noche a 4°C, o durante unas horas a RT para permitir la retracción del coágulo, obteniendo posteriormente el suero por centrifugación de la misma durante 5 min. a 4500 x g. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso.

12.2. ELISA para cuantificación de cGPBP-1.

La valoración de los niveles de cGPBP-1 en los ratones tratados con ADR se realizó mediante la técnica ELISA en sandwich. Para ello, placas de ELISA (Maxisorb; Nunc, Wiesbaden, Germany) fueron incubadas durante 16 h a 4°C con el AcM anti-GPBP N26, utilizando un buffer específico que favorece la unión a placa. Tras lavados con TBST, las placas fueron incubadas durante 1 h con solución de bloqueo (PBS-3%BSA) para saturar los sitios de uniones inespecíficas. Después de lavar de nuevo con TBST, se añadieron los sueros experimentales a las diluciones adecuadas (en TBST). Tras 1-2 h de incubación a RT con agitación moderada, las placas, previamente lavadas, fueron incubadas durante 1-2 h con el AcM anti-GPBP N27 conjugado a HRP. La reacción enzimática se desarrolló con un sustrato HRP fluorescente (Quanta Blue, Thermo Fisher Scientific). La intensidad de fluorescencia se cuantificó con un lector de fluorescencia de placas SpectraMax Gemini XPS (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y los datos adquiridos se analizaron con el software SoftMax Pro Data Acquisition & Analysis (Molecular Devices).

13. Reactivos.

13.1. Tampones.

- *Formol tamponado al 4%*: compuesto por 100 ml de formaldehído al 37%, 4 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$, 6.5 g de Na_2HPO_4 y 900 ml de agua destilada.
- *PBS-1X*: tampón fosfato salino a 1X, pH 7.2. Contiene por litro de agua destilada: 0.8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 0.2 g de KH_2PO_4 , 1.5 g de Na_2HPO_4 .

- *PBS-10X*: Contiene por litro de agua destilada: 8 g de NaCl, 2 g de KCl, 2 g de KH_2PO_4 , 11,5 g de Na_2HPO_4 .
- *Buffer de lisis de eritrocitos*: es un tampón Tris- NH_4Cl a pH 7.5. Está compuesto por un volumen de Trizma base (Tris-hidroximetil-aminopentano; 2.06 g en 100 ml de agua destilada pH 7.5) y nueve volúmenes de NH_4Cl disuelto al 0.83% (peso/volumen) en agua destilada.
- *Tampón Acetato-Acético*: se prepara mediante la mezcla de acetato sódico anhidro 60mM (9 ml) y ácido acético 60 mM (41 ml).
- *Sulfato Amónico Saturado (SAS)*: 540 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 600 ml de agua destilada. Calentar en agitación hasta que se disuelva (15-30 min.). Filtrar en caliente y conservar a 4°C. En el momento de su uso, filtrar de nuevo la cantidad a utilizar y ajustar el pH a 7 con NaOH 1N.
- *Buffer TBE 0.5%*: para preparar 1 litro añadir 5.4 g Tris, 2.75 g ácido Bórico y 2 ml EDTA 0.5 M pH 8.
- *Buffer de lisis ACK*: 8.29 g NH_4Cl (0.15 M), 1 g KHCO_3 (0.1 mM), 0.367 g $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (0.1 mM) y agua destilada, hasta un volumen final de 1 l. Ajustar pH a 7.2 y filtrar la solución.
- *Buffer de carga para proteínas Laemli 5x*: compuesto por 100 mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 20 mM DTT y 0.005% azul de bromofenol.
- *Tris-Glicina 10X*. Para 1 l: 144 g Glicina (Panreac), 30,3 g Tris (Panreac) y llevar hasta 1 l con agua destilada.
- *Buffer TGS*: 25 mM Trizma base, 192 mM Glicina y 0.1% SDS.
- *Buffer de Transferecia*: 25mM Trizma base, 192 mM Glicina y 10% Metanol.
- *TBST* (Tris Buffer Saline Tween 20): 20mM Tris base pH 7.5, 137mM NaCl y 0.05% de Tween 20.

13.2. Geles.

- *Gel de agarosa al 1%*: 50 ml de buffer TBE al 0.5 % y 0.5 g de agarosa.
- *Gel de acrilamida al 5% (stacking gel)*, 5 ml: 0.85 ml de Acrilamida al 30%, 625 μl de Tris 1M pH 6.8, 50 μl de SDS al 10%, 50 μl de APS al 10%, 5 μl de TEMED (N,N',N,N'-tetrametiletilendiamina) y 3.42 ml de agua destilada.
- *Gel de acrilamida al 12% (running gel)*, 8 ml: 3.2 ml de Acrilamida al 30%, 2 μl de Tris 1M pH 8.8, 80 μl de SDS al 10%, 80 μl de APS al 10%, 3.2 μl de TEMED (N,N',N,N'-tetrametiletilendiamina) y 2.64 ml de agua destilada.

13.3. Soluciones.

- *PBS-BSA*: es una disolución de albúmina sérica bovina (BSA, de Serva) en PBS-1X.
- *PFA-2%*: contiene 2 g de paraformaldehído disueltos con calor (65°C aprox.) en PBS-10X (5ml), NaOH (3 µl) y agua destilada, hasta un volumen total de 100 ml. Esta solución fue filtrada y conservada a 4°C hasta su uso.
- *Saponina 3%*: como agente permeabilizante de membranas celulares se utilizó saponina disuelta al 3% en PBS, conservada a 4°C un máximo de una semana (por su elevada susceptibilidad a la contaminación).
- *Agua DEPC*: 1 ml de Dietil-pirocarbonato en 1 l de agua destilada. Calentar a 37°C durante 24 horas y autoclavar. Conservar en nevera hasta su uso.
- *Solución colagenasa*: 300 U/ml Colagenasa tipo II (Worthington), 10 ml PBS, 150 µl DNase I (10 mg/ml) (Roche).
- *Solución Striping*: compuesto por glicina 0.15 M pH 2.5 y SDS al 0.4%.

13.4. Medios de Cultivo.

- *Medio de cultivo Eagle de Dulbecco Modificado (DMEM) suplementado*: se empleó medio DMEM de Gibco suplementado con Hepes 10 mM, L-Glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina (a 10 µl/ml), 2β-mercaptoetanol 10 µM y 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) descomplementado por calor. Posteriormente, el medio fue filtrado y guardado a 4°C hasta su uso. Todos los reactivos fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO).
- *Medio BMDM de diferenciación a macrófagos*: se empleó medio IMDM (Gibco) suplementado con Piruvato 10 mM, L-Glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina (a 10 µl/ml), 2β-mercaptoetanol 10 µM, 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) descomplementado por calor, 1% de aminoácidos no-esenciales y 40% de medio condicionado L929. Posteriormente, el medio fue filtrado y guardado a 4°C hasta su uso. Todos los reactivos fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO).
- *Medio RPMI (Gibco)*: suplementado con Hepes 10 mM, L-Glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina (a 10 µl/ml), 2β-mercaptoetanol 10 µM y 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) descomplementado por calor. Posteriormente, el medio fue filtrado y guardado a 4°C hasta su uso. Todos los reactivos fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO).

14. Análisis estadístico.

En general, la media de cada grupo experimental fue comparada con la media del grupo control correspondiente a través de un test no paramétrico *t* de *Student*, aplicando la corrección de Welch en caso de existir diferencias significativas entre las varianzas. La diferencia de medias fue considerada significativa cuando $P < 0.05$ (*), muy significativa si $P < 0.01$ (**) y altamente significativa cuando $P < 0.001$ (***). Estos análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa informático GraphPad Prism® 4.00.

RESULTADOS

1. Desarrollo del modelo de fibrosis pulmonar por ADR (FPA).

1.1. El modelo de fibrosis cutánea inducida por ADR como punto de partida.

En la literatura médica existen varios modelos de fibrosis pulmonar en los que se han evaluado mecanismos patogénicos y estrategias terapéuticas en la idea de encontrar claves que permitan avanzar en el tratamiento de los pacientes con esta manifestación. Entre estos modelos el más empleado ha sido la fibrosis inducida por el quimioterápico Bleomicina administrada a través de diferentes vías (i.v. subcutánea, intratraqueal) (Moore and Hogaboam, 2008). Sin embargo, en ninguno de estos modelos se reproducen todas las características clínicas de la fibrosis pulmonar que se desarrolla en humanos y, además, su reproducibilidad es muy cuestionable. Otro antibiótico similar a la Bleomicina, también utilizado en el tratamiento de diversos tipos de tumores, es la Doxorubicina o Adriamicina (ADR) (Weiss, 1992), (Marczak et al., 2003), (Simeonova et al., 2009). La administración de este fármaco induce en el sitio de la inyección una fibrosis cutánea mucho más marcada que la Bleomicina (Cohen et al., 1973), (Werner and Törnberg, 1976). Sin embargo, apenas hay estudios sobre los mecanismos implicados en la toxicidad pulmonar inducida por dicho fármaco (Baciewicz et al., 1991), (Bhalla et al., 2000), (Brockstein et al., 2000), (Eisenbeis et al., 2001). La toxicidad inducida por ADR en pacientes puede causar varias complicaciones pulmonares como broncoespasmo, edema local, neumonitis intersticial y fibrosis pulmonar (Minchin et al., 1988), (Baciewicz et al., 1991), (Meadors et al., 2006). Con estos antecedentes nos propusimos evaluar si la administración intratraqueal de Adriamicina podría llegar a ser un modelo de fibrosis pulmonar más reproducible y cercano a la patología observada en humanos que los modelos previamente descritos.

Previamente, quisimos comprobar nuestra capacidad para inducir dicha fibrosis cutánea con Adriamicina en ratones C57BL/6 basándonos en el modelo desarrollado por Dorr RT y cols. (Dorr et al., 1980). Para ello se administraron por vía intradérmica 60 µg de este fármaco (en un volumen de 60 µl), en una sola inyección. Diez días más tarde los animales fueron sacrificados y las muestras se incluyeron en parafina para su posterior tinción con H&E y tricrómico de Masson (Mss). Macroscópicamente se evidenciaron lesiones sugestivas de fibrosis en la zona de la inyección caracterizadas por un engrosamiento y endurecimiento de la piel con presencia de hiperqueratosis y alopecia; además, en algunos casos se produjo ulceración en el centro de la lesión (Figura 3.1a). Desde el punto de vista histológico, y en comparación con una piel sana, se observó hiperplasia de la epidermis (acantosis) con proliferación y elongación de las crestas interpapilares, engrosamiento de la dermis con deposición de tejido fibroso denso (como se puede advertir en el Mss), formación de globos córneos y la existencia de un infiltrado

inflamatorio mononuclear y polimorfonuclear que afecta a todas las capas de la piel, llegando incluso al músculo subyacente (Figura 3.1b).

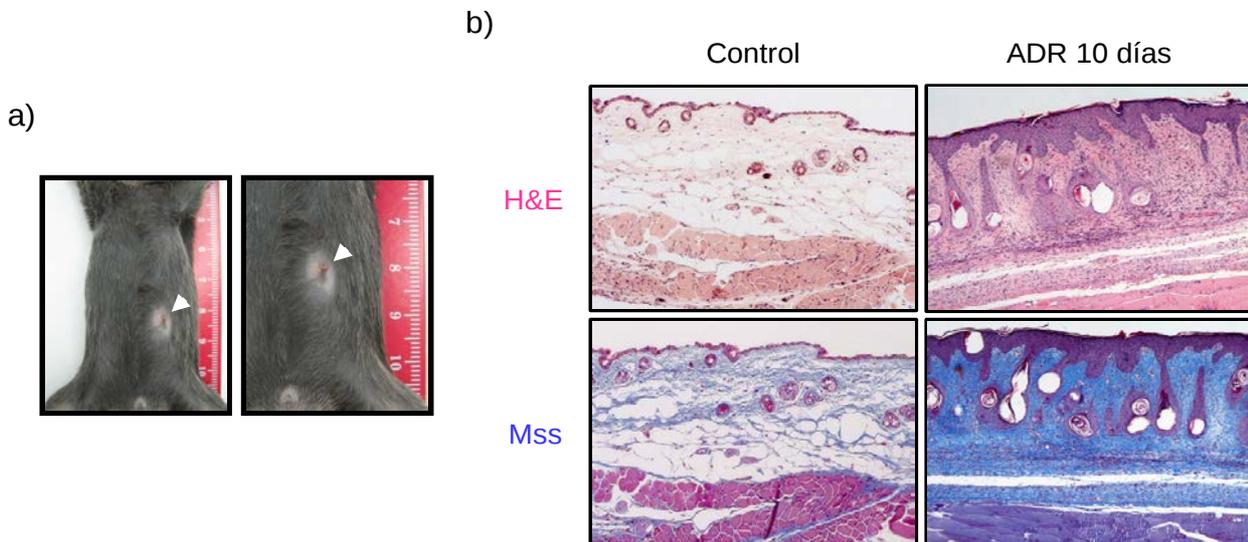


Figura 3.1. Modelo de fibrosis cutánea por administración intradérmica de ADR. (a) Apariencia macroscópica de la piel en el punto de administración, donde puede apreciar una clara alopecia e hiperqueratosis (flecha blanca). (b) Los cortes histológicos demuestran que existe una alteración en la estructura de la piel con acumulación de colágeno en la dermis (en el Mss aparece una intensa tinción azul, característica de la presencia de colágeno).

1.2. Efectos de la administración intratraqueal de ADR sobre la supervivencia de los animales y las lesiones anatomopatológicas de los pulmones.

Tras comprobar los efectos fibrogénicos de la ADR en la piel, se procedió a la inoculación del fármaco en las vías respiratorias. Para ello en ratones C57BL/6 de 10 a 12 semanas de edad se administraron, mediante inyección i.t., dos dosis de ADR: 75 μg o 25 μg (en un volumen nunca superior a 75 μl , ya que volúmenes mayores provocaban problemas respiratorios en los animales).

En primer lugar realizamos estudios de mortalidad para poder acotar de forma precisa el momento subletal de mayor índice de fibrosis. Después del tratamiento con ADR, los ratones muestran una menor supervivencia en comparación con el grupo control tratado sólo con salino, presentando una tasa de mortalidad acumulada en torno al 20% a día 7 y al 45% a día 13 (Figura 3.2a). El análisis estadístico muestra diferencias altamente significativas (***) $p < 0.0001$ entre ambos grupos. En correlación con estos datos, a los 14 días de la instilación de ADR los

pulmones muestras alteraciones macroscópicas caracterizadas por hemorragia, edema y pérdida de volumen pulmonar (Figura 3.2b), también observadas a los 7 días, aunque en menor medida.

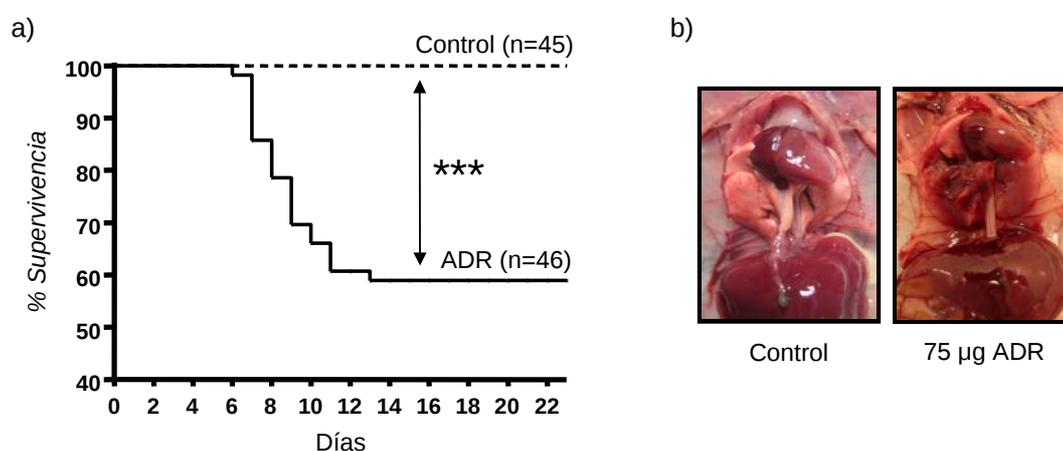


Figura 3.2. Efectos de la administración i.t. de ADR en la supervivencia. (a) La curva de supervivencia nos muestra que la instilación de ADR provoca una mortalidad acelerada en los ratones, que se corresponde con cambios en la apariencia macroscópica de los pulmones (b).

En vista de que la mortalidad de los ratones comienza a los 6 días de la instilación i.t. de ADR y su curva se estabiliza hacia el día 13º, decidimos establecer los días 7 y 14 como puntos clave en la recolección de muestras para el análisis histopatológico y molecular de los pulmones.

A diferencia de lo que ocurre en un pulmón sano, donde tanto la pleura como el septo alveolar exhiben el espesor de una célula, a los 14 días de la administración de 75 µg de ADR se observa un marcado engrosamiento de estas estructuras, característicos de una neumonía intersticial, que afecta aproximadamente al 80% del parénquima pulmonar. Así, junto al engrosamiento del septo alveolar, causante de la obliteración completa de los alveolos, se observa un intenso infiltrado inflamatorio, proliferación de las células del epitelio bronquial y broncoalveolar (algunas de ellas con características displásicas) y la acumulación de colágeno (Figura 3.3). Este tipo de lesiones ya se pueden observar a los 7 días, aunque de manera menos intensa, predominando la inflamación perivascular y peribronquial, que afectan al 30% del parénquima pulmonar (Figura 3.3). Con objeto de cuantificar estas lesiones de la forma más objetiva posible hemos elaborado un escore histológico basado en la extensión (porcentaje del área de pulmón afectado) y en la severidad de las lesiones (Figura 3.4) (ver apartado de material y métodos). Según estos parámetros, la media de la severidad de las lesiones a los 7 días de la inyección de ADR alcanzó una escala de 3 y estuvo cercana a 8 en el día 14 post-ADR. La

Además, con una dosis de ADR tres veces inferior (25 μ g) las lesiones se restringen al área pleural y subpleural (Figura 3.5), lo que nos indica, por un lado, que el modelo de fibrosis pulmonar inducido por ADR es dosis-dependiente y, por otro, que la dosis de 75 μ g es una buena elección para los posteriores experimentos en este modelo.

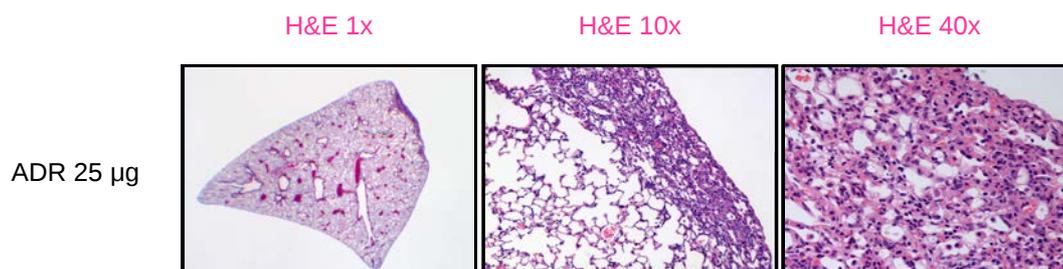


Figura 3.5. El desarrollo de lesiones pulmonares tras la administración de ADR es dosis-dependiente. El análisis microscópico de tinciones de H&E provenientes de muestras de ratones tratados con 25 μ g de ADR (día14), desveló que las lesiones se encontraban restringidas al área pleural y subpleural siendo, en cualquier caso, de una severidad marcada.

1.3. Aumento en la expresión de colágeno I y colágeno IV en el pulmón de los animales tratados con ADR.

A pesar de que el score histológico citado anteriormente se confeccionó en aras de la objetividad y en base a él se ha podido constatar una elevada reproductibilidad de las lesiones tanto intra-ensayo como interexperimental, se ha considerado necesario incluir un nuevo parámetro de cuantificación de la fibrosis, aun más objetivo que el precedente: la cuantificación de colágeno en el tejido pulmonar mediante RTqPCR. Por otro lado, este es un parámetro ampliamente utilizado por la comunidad científica para este fin (Moore et al., 2005), (Manoury et al., 2006), (Tian et al., 2010), (Turpin et al., 2010), (Sun et al., 2011).

Por ello procedimos a cuantificar, por un lado la expresión de colágeno I, típicamente fibrilar, y de las cadenas α 1 y α 3 del colágeno IV, característico de la membrana basal alveolar y glomerular. En todos los casos en los que se observaron lesiones tisulares detectamos un aumento marcado de la expresión de ambos tipos de colágeno los días 7 y 14 tras el tratamiento con 75 μ g de ADR, en comparación con la expresión basal que presentaban los pulmones de ratones sanos (Figura 3.6). Además, este aumento fue directamente proporcional al tiempo transcurrido después de la administración de ADR, alcanzando su máxima expresión a día 14.

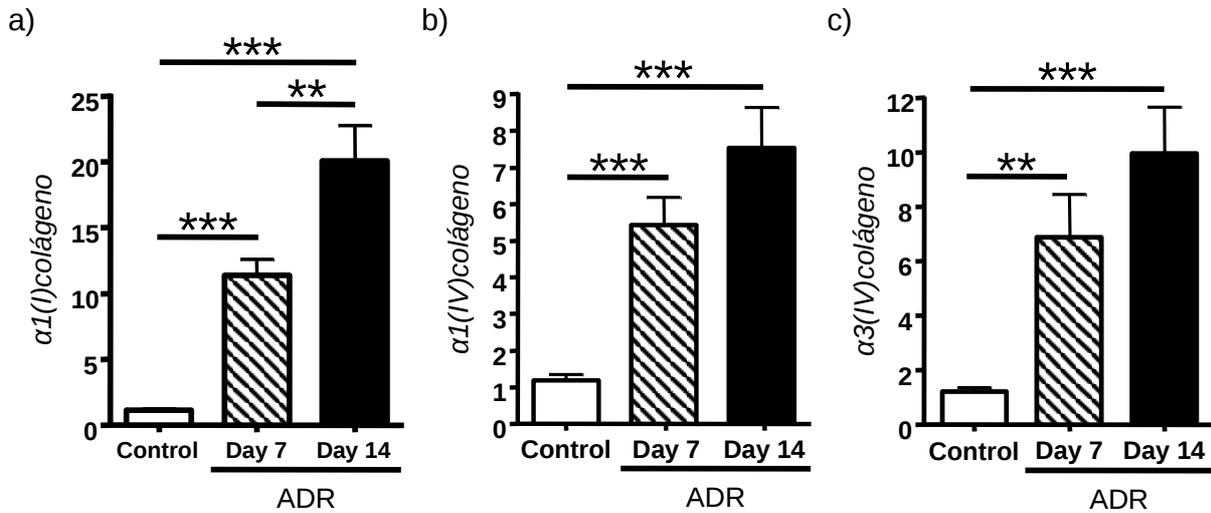


Figura 3.6. Expresión de colágeno de tipo I y de tipo IV tras la administración de ADR. En relación con el colágeno acumulado en los pulmones, observado en la tinción de Masson, se produce un aumento de la expresión de colágeno tipo I (a) y colágeno tipo IV (b, c) en los pulmones tratados con ADR. A día 14 este aumento alcanza su cenit, no obstante es detectable ya a día 7, apareciendo sobre-expresado entre 8-10 veces (en el caso del colágeno tipo IV) y 20 veces (en el caso del colágeno tipo I).

En base a todos estos resultados, podemos decir que la administración de ADR por vía intratraqueal desencadena en el pulmón una serie de mecanismos inflamatorios inductores de fibrosis, que culminan en un aumento de la expresión de colágeno y, por ende, su acumulación en el parénquima pulmonar, provocando en última instancia la obliteración de los alveolos.

2. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el exudado pulmonar tras la administración intratraqueal de ADR.

La fibrosis descrita es una reacción cicatricial de un proceso inflamatorio que alcanza su máxima intensidad en el día 14 post-ADR (Figura 3.3). La aparición de esta respuesta fibrótica coincide con la disminución progresiva del infiltrado celular. Para evaluar el tipo de células inflamatorias que infiltran el tejido pulmonar en las primeras fases de todo el proceso que sigue a la instilación intratraqueal de ADR se analizaron, por un lado, las poblaciones celulares obtenidas en el fluido de lavado bronquio-alveolar (BALF) y, por otro, se procedió a digerir el pulmón completo.

2.1. Composición celular del BALF de ratones tratados con ADR.

Las poblaciones linfocitarias presentes en el BALF de ratones tratados con ADR se analizaron por citometría de flujo a los 7 días de la inoculación intratraqueal de 75 µg del fármaco. Como controles se utilizaron pulmones de animales a los que se les inoculó un volumen equivalente de suero salino. Como era de esperar a la luz de los hallazgos de anatomía patológica, en todos los pulmones instilados con ADR se observó un incremento en el número total de células presentes en las vías aéreas, con un aumento importante en el número absoluto de linfocitos T y B, granulocitos (Gr1⁺) y NKs. El análisis estadístico muestra, además, que en todos los casos existen diferencias significativas (* p<0.05) o altamente significativas (** p<0.01, en el caso de las células B) (Tabla 3.1). Por otro lado, el bajo número de células obtenidas en el BALF de los pulmones controles hizo imposible la detección de algunas poblaciones celulares en dicho grupo, como es el caso de las células dendríticas (DCs), granulocitos (Gr1⁺) y NKs (Tabla 3.1).

Dentro de la población de linfocitos, detectamos que las células T-CD4⁺ eran las más abundantes y exhibían un fenotipo de célula activada, caracterizado por el aumento de expresión de CD69 (marcador de activación temprana de linfocitos) y CD44 (marcadores de activación tardía y memoria) y la pérdida de expresión de L-Selectina y CD45Rb (Tabla 3.1) (Figura 3.7). Además, se puede observar un aumento en el porcentaje de células Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) en los pulmones tratados con ADR (Tabla 3.1).

POBLACIÓN	Control		ADR	
	Nº Células	%	Nº Células	%
Células T-CD4+ (Total)	0.16 x 10⁶ ± 0.12		0.65 x 10⁶ ± 0.04 (*)	
Naïve CD4+ CD62L+ CD44-		88.56 ± 3.17		3.00 ± 2.18 (***)
Memoria CD4+ CD62L- CD44+		11.45 ± 3.17		81.58 ± 2.66 (***)
Activadas CD4+CD69+		15.33 ± 4.74		34.70 ± 12.92 (**)
Naïve CD4+ CD45Rb+		91.56 ± 4.80		39.2 ± 11.93 (**)
Activadas CD4+ CD45Rb-		8.44 ± 4.80		60.80 ± 11.93 (**)
Células Treg CD4+ CD25+ FoxP3+		0.32 ± 0.38		1.067 ± 0.95
Células T-CD8+ (Total)	0.038 x 10⁶ ± 0.03		0.11 x 10⁶ ± 0.11 (*)	
Naïve CD8+ CD62L+ CD44-		79.27 ± 12.91		13.28 ± 1.45 (***)
Memoria CD8+ CD62L- CD44+		20.74 ± 12.91		18.53 ± 10.97
Activadas CD8+CD69+		16.15 ± 8.92		22.98 ± 0.57
Naïve CD8+ CD45Rb+		98.58 ± 9.37		76.63 ± 0.57 (**)
Activadas CD8+ CD45Rb-		1.43 ± 9.37		23.38 ± 0.57 (**)
Células B (Total)	0.022 x 10⁶ ± 0.02		0.15 x 10⁶ ± 0.14 (**)	
Células Dendríticas CD11c+ (Total)	Indetectables		0.083 x 10⁶ ± 0.02	
Inmaduras CD11c+ CD80- Iab-		---		3.97 ± 3.04
Maduras CD11c+ CD80+ Iab+		---		96.0 ± 1.57
Macrófagos B220-CD11b high (Total)	0.073 x 10⁶ ± 0.09		0.11 x 10⁶ ± 0.08	
Granulocitos B220- Gr1+ (Total)	Indetectables		0.064 x 10⁶ ± 0.05 (*)	
NKs B220- NK1.1+ (Total)	Indetectables		0.14 x 10⁶ ± 0.11 (*)	

Tabla 3.1. Poblaciones celulares caracterizadas en el BALF de pulmones control y pulmones tras instilación de ADR.

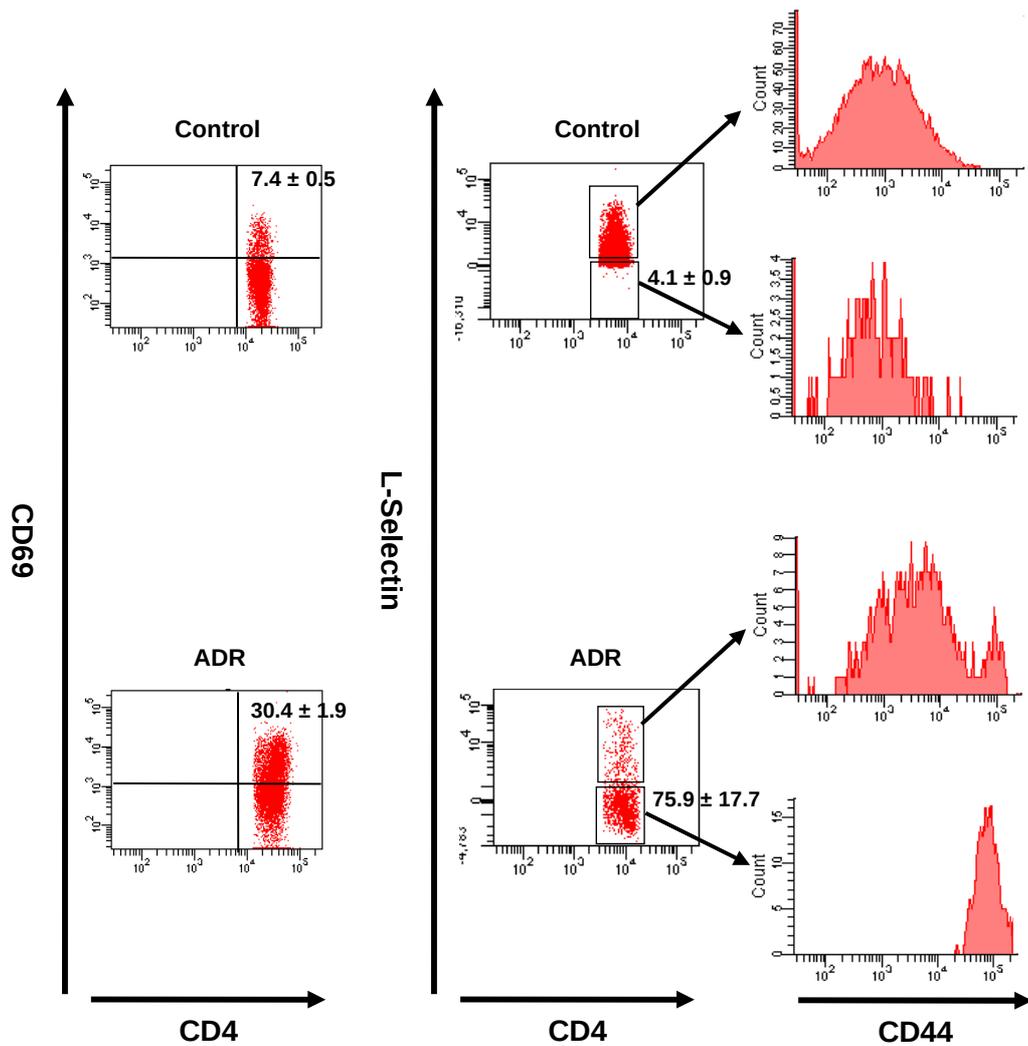


Figura 3.7. Las T-CD4⁺ presentes en el BALF de pulmones tratados con ADR presentan un fenotipo **activado**. Tras la administración de ADR por vía intratraqueal se produce una activación de las linfocitos T-CD4⁺ y T-CD8⁺, caracterizada por la expresión de CD69, CD44 y L-Selectina.

De forma paralela, quisimos estudiar las poblaciones celulares presentes en el fluido de lavado bronquio-alveolar (BALF) mediante tinción Giemsa, y observamos como se produce un cambio desde una población compuesta únicamente por macrófagos en el pulmón control a la aparición de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos tras la administración de ADR; siendo los linfocitos la población más abundante (Figura 3.8).

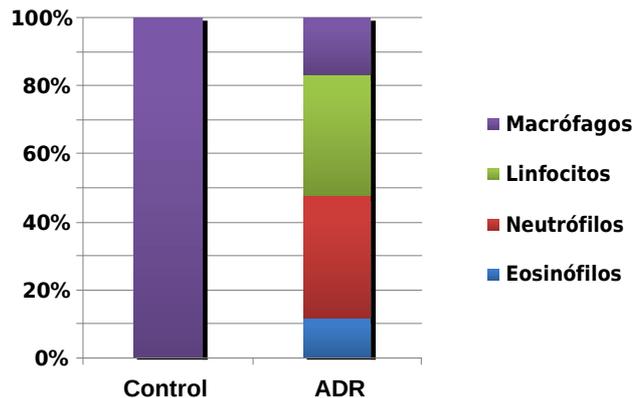


Figura 3.8. La tinción Giemsa en el BALF de ratones control y tratados con ADR revela un cambio en las poblaciones presentes en el pulmón. A diferencia de lo que ocurre en el pulmón control, donde sólo encontramos macrófagos, tras la exposición a ADR se produce la aparición de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos.

2.2. Estudio de las poblaciones celulares totales aisladas del pulmón completo.

Dado que el lavado broncoalveolar sólo nos da conocimiento de las poblaciones que están infiltrando el interior del espacio alveolar, decidimos estudiar las poblaciones linfocitarias presentes en la digestión del órgano completo. Para ello, administramos por vía intratraqueal 75 µg de ADR (utilizando siempre como grupo control animales tratados con suero salino) y transcurridos 7 días se procedió al sacrificio de los animales y la digestión de los pulmones con colagenasa, según el protocolo desarrollado por Sauer KA y cols. (Sauer et al., 2006). Una vez obtenida la suspensión celular de pulmón completo, se llevó a cabo el análisis de las poblaciones celulares presentes por citometría de flujo.

Los datos muestran que, tras la administración de ADR, se produce un aumento en el número de células propias de la inmunidad innata. Así, observamos un incremento significativo en el número absoluto de células dendríticas, granulocitos, células NKs y macrófagos, siendo en esta última población especialmente llamativo (Tabla 3.2). Además, las células dendríticas (DCs) presentes en el pulmón tras la inoculación de ADR sufren un cambio desde un fenotipo inmaduro (en los animales control) a un fenotipo maduro, caracterizado por la expresión de las moléculas

co-estimuladoras CD80 (B7.1) e IA^b (MHC de clase II).

Por otro lado, cuando estudiamos las poblaciones de linfocitos T-CD4⁺, T-CD8⁺ y B, observamos que tras la administración del fármaco no se induce aumento alguno en el número de células totales; sin bien, en el caso de las células T se produce un cambio a un fenotipo de célula activada, caracterizado por el aumento de expresión de CD69 (activación temprana) y CD44 (activación tardía y memoria), y la pérdida de expresión de L-Selectina y CD45Rb (Tabla 3.2). Además, no detectamos cambios en la cantidad de células Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), apareciendo incluso en menor número tras la administración de ADR (Tabla 3.2).

POBLACIÓN	Control		ADR	
	Nº Células	%	Nº Células	%
Células T-CD4+ (Total)	0.86 x 10⁶ ± 0.12		0.91 x 10⁶ ± 0.04	
Naïve CD4+ CD62L+ CD44-		62.04 ± 4.43		28.07 ± 12.59 (*)
Memoria CD4+ CD62L- CD44+		19.69 ± 2.37		52.98 ± 15.68 (*)
Activadas CD4+CD69+		17.39 ± 3.24		42.01 ± 5.28 (**)
Naïve CD4+ CD45Rb+		69.65 ± 0.58		37.72 ± 7.72 (**)
Activadas CD4+ CD45Rb-		29.59 ± 0.58		61.56 ± 7.61 (**)
Células Treg CD4+ CD25+ FoxP3+		1.13 ± 0.43		0.53 ± 0.09 (p=0.074)
Células T-CD8+ (Total)	0.68 x 10⁶ ± 0.13		0.83 x 10⁶ ± 0.09	
Naïve CD8+ CD62L+ CD44-		63.8 ± 4.79		36.08 ± 4.79 (**)
Memoria CD8+ CD62L- CD44+		6.93 ± 1.95		29.25 ± 12.83 (*)
Activadas CD8+CD69+		1.74 ± 0.4		11.08 ± 6.68 (p=0.073)
Naïve CD8+ CD45Rb+		93.82 ± 1.02		75.45 ± 8.09 (*)
Activadas CD8+ CD45Rb-		6.18 ± 1.02		24.55 ± 8.09 (*)
Células B (Total)	2.32 x 10⁶ ± 0.26		2.16 x 10⁶ ± 0.36	
Células Dendríticas CD11c+ (Total)	1.64 x 10⁶ ± 0.21		2.20 x 10⁶ ± 0.91	
Inmaduras CD11c+ CD80- Iab-		98.09 ± 0.15		79.89 ± 2.79 (**)
Maduras CD11c+ CD80+ Iab+		1.91 ± 0.15		20.11 ± 2.79 (**)
Macrófagos B220-CD11b high (Total)	1.99 x 10⁶ ± 0.28		6.42 x 10⁶ ± 1.06 (**)	
Granulocitos B220- Gr1+ (Total)	0.87 x 10⁶ ± 0.33		2.04 x 10⁶ ± 0.80 (*)	
NKs B220- NK1.1+ (Total)	1.41 x 10⁶ ± 0.13		2.46 x 10⁶ ± 0.26 (**)	

Tabla 3.2. Poblaciones celulares caracterizadas por CMF tras la digestión con colagenasa del pulmón completo en ratones control y ratones tratados con ADR por vía intratraqueal.

3. Análisis de la expresión de citocinas en el modelo de FPA.

Con objeto de intentar definir los mecanismos moleculares y celulares que participan en la patogénesis de este modelo, a la vista del marcado infiltrado inflamatorio en los pulmones de los ratones tratados con ADR, se han estudiado los perfiles de expresión de diversas citocinas pro- y anti-inflamatorias durante la fase inicial de la FPA (día 7 tras instilación de ADR) y en la fase de inflamación establecida y comienzo de las lesiones fibróticas (día 14 tras instilación de ADR). En particular, se ha hecho especial hincapié en el estudio de las citocinas que definen a los distintos subtipos funcionales de linfocitos T-CD4⁺ en este proceso, análisis que se ha completado con el estudio de la expresión de los distintos factores de transcripción (*master genes*) característicos de cada uno de estos subtipos de linfocitos T-CD4⁺.

Dado que las citocinas secretadas durante la reacción inflamatoria constituyen un entramado de factores reguladores muy complejo, con un fin eminentemente didáctico expondremos los resultados obtenidos agrupando las distintas citocinas en función del patrón de respuesta celular en el que juegan un papel principal. Es importante señalar que todos los factores que se van a comentar se han cuantificado en los mismos experimentos.

3.1. Citocinas de la respuesta inmune innata.

En primer lugar se exponen los resultados de expresión de las denominadas citocinas pro-inflamatorias, secretadas fundamentalmente por monocitos o macrófagos, que nos permiten evaluar la participación de la respuesta inmune innata en la patogénesis del proceso. En este apartado observamos un importante aumento en la expresión de IL-1 β , IL-6, GM-CSF y TNF- α , en ambas fases de la FPA, apareciendo una mayor expresión de ésta última a los 7 días de la administración de ADR (Figura 3.9a). También se han analizado las citocinas pro-fibróticas de la familia TGF- β , tanto a día 7 como a día 14, observándose un aumento en la expresión de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 (Figura 3.9b). El aumento más significativo con relación a los ratones control se registró en el caso de TGF- β 3, aunque hay que señalar que en el ratón es esta citocina la que alcanza los valores más elevados entre las citocinas de la familia TGF- β en el pulmón (Millan et al., 1991), (Schmid et al., 1991), (Kaartinen et al., 1995). Estos resultados ponen de manifiesto la participación de las células de la inmunidad innata en la FPA.

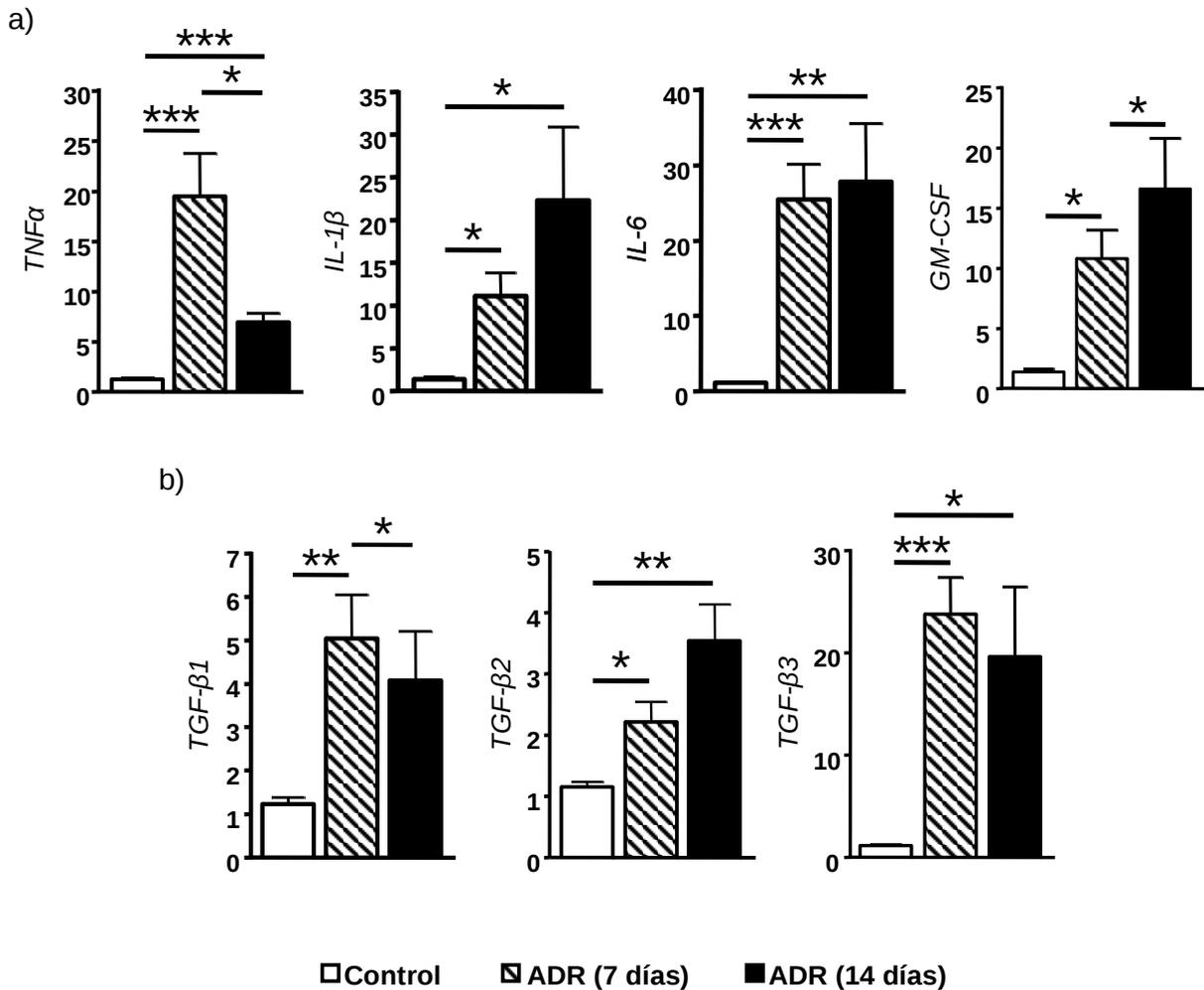


Figura 3.9. La instilación de ADR conlleva un aumento de la expresión de las citocinas pro-inflamatorias y pro-fibróticas. Tras la administración de 75 µg de ADR, el análisis del patrón de expresión de IL-1β, IL-6, GM-CSF y TNF-α (citocinas pro-inflamatorias) (a) y de TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3 (citocinas pro-fibróticas) (b) reveló que en todos los casos se produce una sobre-expresión tanto a día 14 como a día 7 (siendo más elevada en este punto en el caso de TNF-α y los TGF-βs).

3.2. Citocinas y factores de transcripción que caracterizan a los subtipos TH1 y TH2.

Seguidamente se analizaron los patrones de los subtipos clásicos de células T-CD4⁺: (a) las células TH1, caracterizadas por la presencia de la citocina inductora IL-12a, la secreción de IL-2, IFN-γ y TNF-β, y la expresión en éstas del factor de transcripción T-bet, y (b) las células TH2, caracterizadas por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13 y la expresión del factor de transcripción GATA-3. En la evaluación de las citocinas del perfil TH1 destaca un aumento de la citocina efectora IFN-γ y del factor de transcripción T-bet (mayor en el 7º día tras inyección de ADR). En

cambio la citocina inductora IL-12a no muestra diferencias significativas con respecto al grupo control a día 7 aunque sí a día 14, presentando una sobreexpresión tardía (Figura 3.10a).

Atendiendo a las citocinas TH2, tanto la citocina inductora (IL-4) como las citocinas efectoras (IL-4 e IL-13) y el factor de transcripción GATA-3 están aumentados de forma muy significativa, si bien en el caso de IL-13 este aumento es más marcado a día 7 (Figura 3.10b).

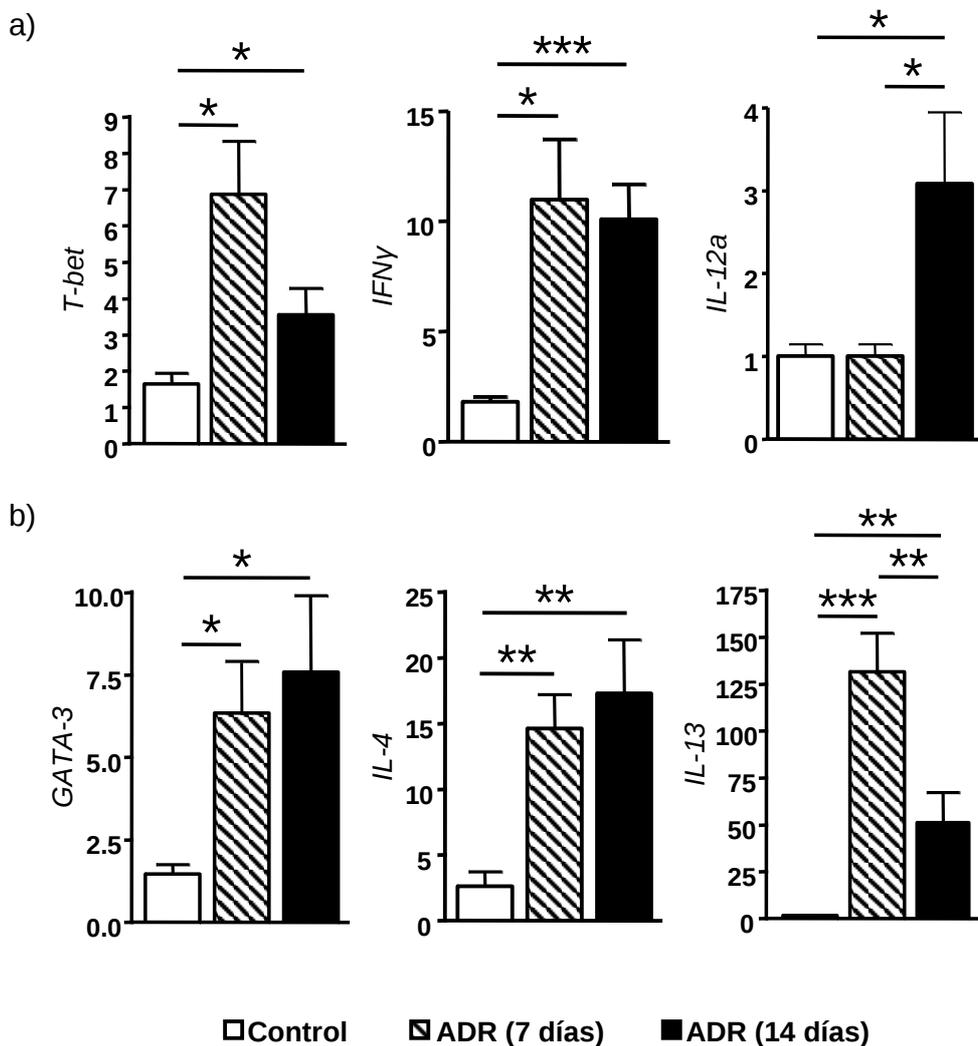


Figura 3.10. Aumento de la producción de citocinas TH1 y TH2 tras administración de ADR. Tanto los factores de transcripción como las citocinas inductoras y efectoras característicos de las subpoblaciones TH1 (a) y TH2 (b) aparecen significativamente aumentados tras la administración de 75 μ g de ADR. A pesar de que en la mayoría de los casos el aumento es mayor a día 14, tanto el factor de transcripción T-bet (TH1) (a) como la citocina efectora IL-13 (TH2) (b) muestran su máxima expresión a día 7.

3.3. Citocinas y factores de transcripción que caracterizan a los subtipos TH17 y Tregs.

En el análisis de los marcadores que caracterizan la respuesta TH17 observamos un aumento en la expresión tanto de las citocinas inductoras IL-6 y TGF- β 1 (Figura 3.9) como de la citocina efectora IL-17a (Figura 3.11b). Además, también aparece aumentada la expresión del factor de transcripción ROR γ T y de las citocinas IL-21 e IL-23, esenciales en la supervivencia y mantenimiento de la población TH17 (Figura 3.11b).

En paralelo con el aumento en la actividad TH17 hay un aumento tanto en las citocinas IL-2 (inductora) e IL-10 (efectora) como en el factor de transcripción FoxP3 (Figura 3.11a), característicos de las células Tregs.

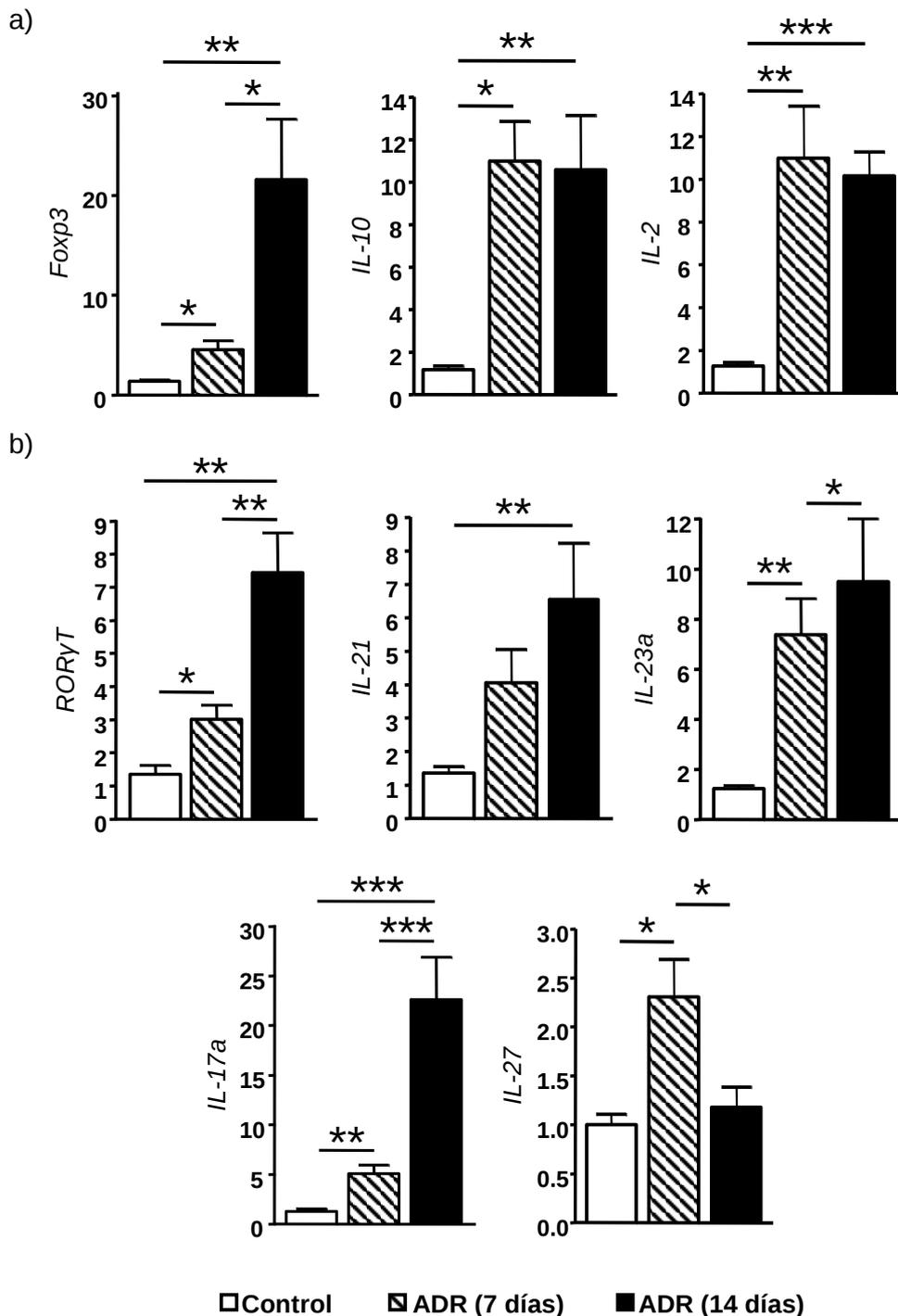


Figura 3.11. Efectos de la administración i.t. de ADR en la expresión de las citocinas TH17 y Tregs. Tras la instilación de 75 µg de ADR, los pulmones muestran una expresión aumentada de las citocinas IL-10 e IL-2 y del factor de transcripción FoxP3, característicos de las células Tregs, siendo estadísticamente más significativa en el día 14 después del tratamiento (a). Por otro lado, la misma dosis de ADR también provoca una sobre-expresión de las citocinas IL-17a, IL-21 e IL-23a, además del factor de transcripción RORγT, implicados en la diferenciación y mantenimiento de la población TH17 (b). Además, la expresión de IL-27 (implicada en la inhibición de esta población) aparece reducida (b).

4. Papel de la población TH17 en el desarrollo de FPA.

Con el fin de profundizar en el conocimiento del papel de las células TH17 en el desarrollo de la patología de la FPA, decidimos llevar a cabo un experimento de administración de ADR intratraqueal en ratones C57BL/6 deficientes en el receptor de la IL-17a (IL-17R-KO), utilizando como grupos control a ratones C57BL/6 convencionales (fenotipo *wild type*: WT) a los que también se administró ADR y ratones IL-17R-KO y WT a los que se administró intratraquealmente un volumen igual de suero salino. Dado el papel relevante de la citocina IL-6 en la inducción de la diferenciación a TH17 (Zhou et al., 2007), otros dos grupos de ratones IL-17R-KO y WT, a los que se administró ADR intratraqueal, fueron tratados con un AcM anti-IL-6 con efecto bloqueante de la acción de esta citocina. El tratamiento consistió en la administración por vía i.p. (sistémica) de 500 µg del AcM cada 2 días durante los 14 días del experimento. Los ratones utilizados en todos los grupos de este experimento fueron machos de 11-12 semanas de edad.

Las curvas de mortalidad muestran una aceleración de la mortalidad en los grupos tratados sólo con ADR, tanto en los WT como IL-17R-KO, presentando a los 14 días de la inyección de ADR una tasa de mortalidad acumulada similar y en torno al 55-60% (Figura 3.12). No obstante, en el caso de los ratones IL-17R-KO la mortalidad se retrasa en las primeras fases del proceso y solamente se iguala al final del seguimiento. Hay que resaltar que en los grupos a los que se inoculó el AcM anti-IL-6 la supervivencia fue significativamente mayor, siendo nula la mortalidad en el grupo de ratones WT inyectados con ADR al final del seguimiento (Figura 3.12). El análisis estadístico muestra diferencias altamente significativas entre estos grupos y los que fueron tratados únicamente con ADR (** $p < 0.001$).

El análisis histológico no se correlacionó con los perfiles de las curvas de mortalidad. De este modo, no detectamos diferencias ni en la extensión (cercana al 50-60%) ni en la intensidad de las lesiones (en torno al 6), a excepción del grupo IL-17R-KOs tratado con anti-IL-6 en donde la intensidad media es cercana al 3 (si bien ésta no es significativa debido a la escasa cantidad de muestras y la heterogeneidad el grupo) (Figura 3.13).

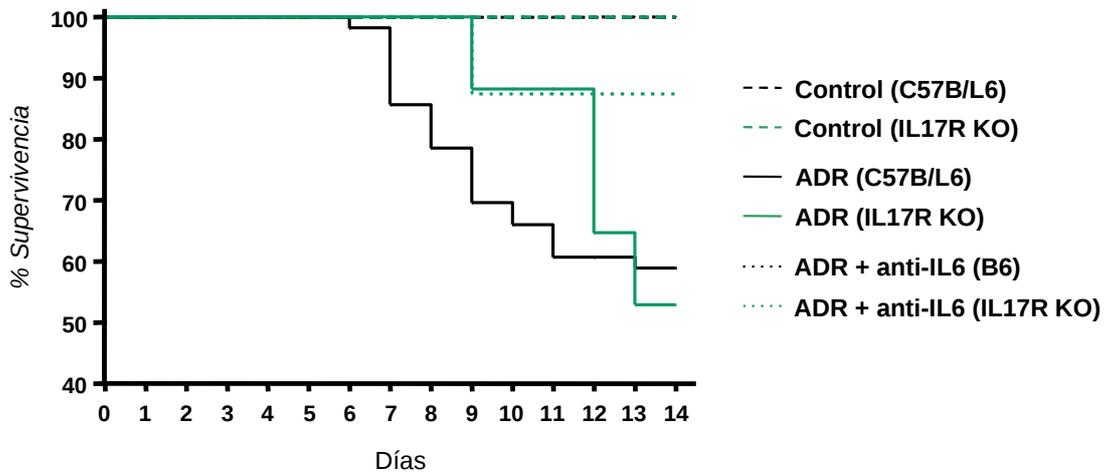


Figura 3.12. Influencia de la ausencia del receptor de IL-17 y del tratamiento con anti-IL-6 en la curva de mortalidad en los ratones con FPA. El gráfico de supervivencia nos muestra que la instilación de ADR en ratones IL17R-KO provoca una tasa de mortalidad similar a la encontrada en ratones C57BL/6 WT, aunque el inicio de la misma se retrasa en el tiempo. Sin embargo, el tratamiento con un AcM anti-IL6 prolonga la supervivencia de ambas estirpes, llegando incluso al 0% de mortalidad en el caso de los ratones WT.

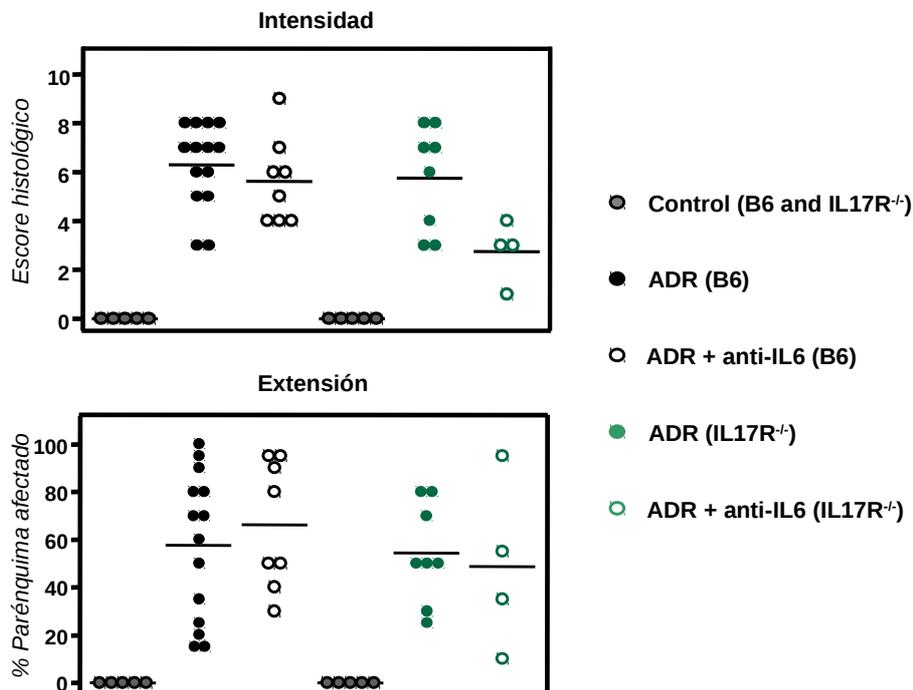
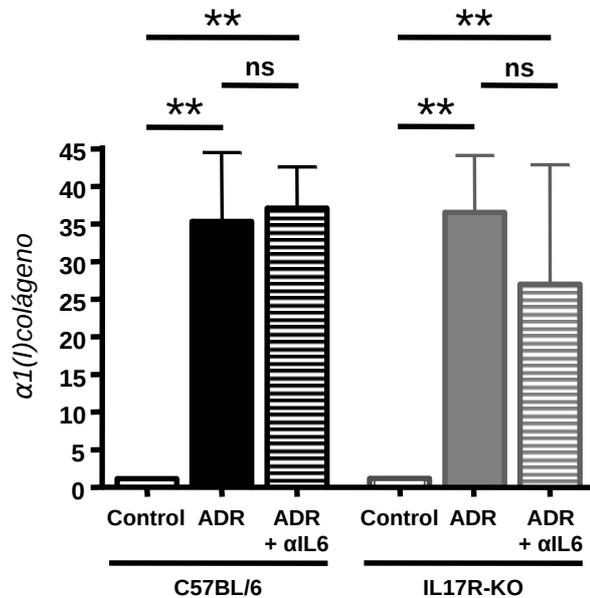


Figura 3.13. Tras la instilación de ADR las lesiones pulmonares presentes en los ratones WT y los ratones IL17R-KO son similares. Las alteraciones que se producen en el pulmón de los ratones WT e IL17R-KO, seguidas a la administración de ADR, presentan una intensidad y una extensión similares. Además, el único grupo que parece presentar una menor intensidad de afectación es el compuesto por ratones IL17R-KO tratados con anti-IL6, aunque hay que destacar la escasa cantidad de muestras y la variabilidad de las mismas.

Todos estos datos quedan corroborados, además, por estudios de expresión de colágeno tipo I por RTqPCR, donde observamos que todos los grupos muestran el mismo patrón de expresión; quedando de nuevo patente la elevada variabilidad del grupo de ratones IL-17R-KO tratados con anti-IL-6 (Figura 3.14).

Figura 3.14. La sobre-expresión de colágeno tipo I tras la administración de ADR es similar en ratones WT e IL17R-KO. En ambas estirpes, se produce en el pulmón un aumento de la expresión de colágeno tipo I, posterior a la instilación de ADR, siendo estadísticamente muy significativo. Además, el tratamiento con anti-IL6 no presenta ningún efecto inhibitor sobre dicha expresión ni en los ratones WT ni en los ratones IL17R-KO.



5. Análisis de la activación *in vitro* de NFkB en macrófagos estimulados con ADR.

Como se comentó anteriormente, se ha puesto en evidencia el papel de la IL-1 β y de la señalización a través del inflammasoma NALP3/ASC en la fibrosis (Gasse et al., 2007). Con el fin de evaluar si la presencia de ADR era capaz por sí sola de activar los mecanismos específicos de la inmunidad innata, nos centramos en el análisis de la actividad de NALP3 *in vitro* tras estimular macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) con distintas concentraciones de ADR. Dado que la activación *in vitro* del inflammasoma NALP3 requiere la activación de NFkB (Señal 1) y la adición de ATP exógeno (Señal 2), y que además éstas deben producirse de manera secuencial (Bauernfeind et al., 2009), (Franchi et al., 2009); analizamos, en primer lugar, la capacidad de la ADR para activar el factor de transcripción NFkB.

En células no estimuladas, NFkB se encuentra en el citoplasma unido a la proteína inhibidora I κ B, evitando que entre en el núcleo. Cuando estas células son estimuladas, quinasas específicas fosforilan residuos de serina del I κ B (en concreto Ser32 y Ser36), causando su rápida degradación y la liberación de NFkB. Éste entra en el núcleo y se une a secuencias específicas del promotor de los genes diana (Gilmore, 2006). Basándonos en este hecho, analizamos por Western Blot la presencia de I κ B-fosforilado como medida de la activación de NFkB. La

estimulación *in vitro* de BMDM con 50 $\mu\text{g/ml}$ ADR es capaz de promover la activación temprana y transitoria de NF κ B (Figura 3.15). Así, los niveles de I κ B fosforilado aumentan a los 5 min. tras la estimulación con ADR alcanzando un pico a los 15 min. Posteriormente, los niveles de I κ B fosforilado en los BMDM retorna a su estado basal tras 30 min. de incubación con ADR.

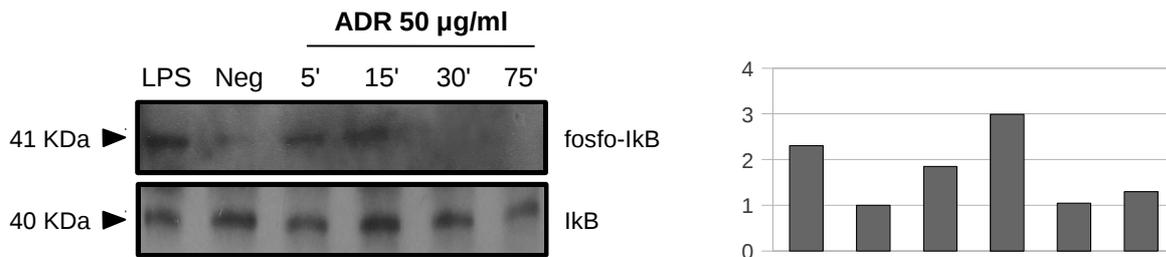


Figura 3.15. La ADR induce activación de NF κ B *in vitro*. La detección de fosfo-I κ B por western blot (WB) revela que con una dosis de ADR de 50 $\mu\text{g/ml}$ se impulsa la activación de NF κ B, a partir de los 5 minutos posteriores a la estimulación (a); produciéndose a los 15 min. la respuesta más efectiva. Estos datos quedan confirmados con la cuantificación y la equiparación con la proteína total (I κ B) (b) (el orden del diagrama de barras es análogo al WB). Como control negativo (Neg) se utilizaron células sin estimular y como control positivo células estimuladas con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 75 min.

En paralelo, analizamos la capacidad de ADR para inducir la producción de ROS en BMDM. En este sentido, se ha demostrado que las señales capaces de activar el inflammasoma NALP3, tales como las toxinas bacterianas aerolisina (*A. hydrophila*) o LLO (*L. monocytogenes*) y diferentes señales de peligro (cristales de monourato, partículas de aluminio, asbestos, ATP, irritantes de la piel o rayos UV) también promueven la producción de ROS; además, fármacos inhibidores de ROS (Gliburide y Apocynin) muestran un bloqueo de la actividad de NALP3 (Simons et al., 1990), (Ashcroft, 2005), (Dostert et al., 2008), (Lamkanfi et al., 2009). Para ello realizamos un experimento de estimulación *in vitro* de BMDM en presencia o ausencia de ADR (50 $\mu\text{g/ml}$) y en presencia o ausencia del inhibidor Apocynin (100 μM), evaluándose las siguientes condiciones: 1) células sin estimular; 2) células en presencia de 100 μM H $_2$ O $_2$ (control de activación); 3) células en presencia de ADR; 4) células en presencia de 100 μM H $_2$ O $_2$ + Apocynin; y 5) células en presencia de ADR + Apocynin. En el caso de H $_2$ O $_2$ y ADR las células se estimularon por un período de 120 min.; sin embargo, para que Apocynin resultara efectivo fue necesario añadirlo 30 min. antes que dichos estímulos. El estudio de los niveles de ROS en estas células se llevó a cabo por citometría de flujo usando H $_2$ DCF-DA. Dicho compuesto cuando se encuentra en estado reducido es un colorante no fluorescente pero tras su oxidación y la eliminación de sus grupos acetato por esterasas celulares comienza a emitir fluorescencia. Por

tanto, un incremento de ésta es indicativo de un aumento de ROS en el interior de las células.

Como puede observarse en la figura 3.16., en presencia de 50 µg/ml de ADR se produce un aumento en la cantidad de ROS intracelular, incluso mayor que el obtenido tras la estimulación con el control de activación H₂O₂. Además, dicho aumento es específico puesto que en presencia del inhibidor Apocynin la fluorescencia cae a niveles similares a los obtenidos con H₂O₂ + Apocynin; si bien, esta inhibición es parcial ya que no se restauran los niveles basales de ROS (células sin estimular).

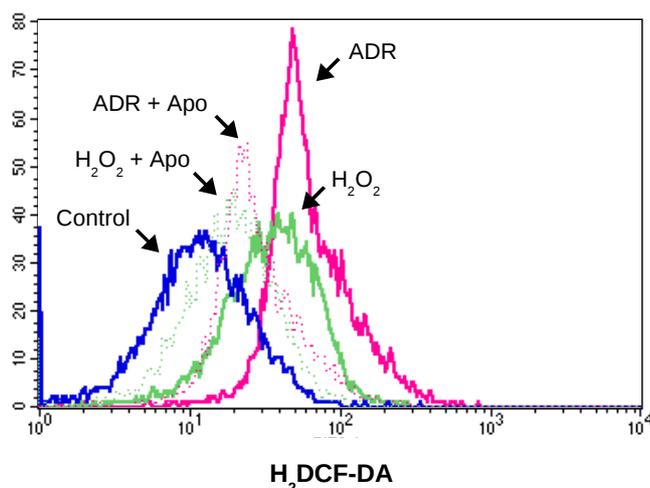


Figura 3.16. La presencia de ADR produce un aumento de la producción de ROS en BMDM *in vitro*. Para evaluar la inducción *in vitro* de ROS por parte de la ADR, BMDM fueron cultivados bajo distintas condiciones: 1) células sin estimular (Control); 2) 100 µM H₂O₂ (control de activación); 3) 50 µg/ml ADR; 4) 100 µM H₂O₂ + 100 µM Apocynin; y 5) 50 µg/ml ADR + 100 µM Apocynin. La cantidad de ROS en el interior celular fue analizada por la presencia de H₂DCF-DA por CMF. La ADR es capaz de producir un incremento en la producción de ROS mayor al obtenido bajo estimulación con H₂O₂. Además, la utilización del inhibidor Apocynin bloquea dicha producción, aunque de forma parcial.

6. Secreción de IL-1β y análisis de la activación *in vitro* de Caspasa-1 en macrófagos estimulados con ADR.

En vista de que los resultados *in vitro* demuestran que la presencia de ADR provoca una activación de los BMDM, vía NFκB y producción de ROS, y que la inducción de FPA conlleva un aumento de la expresión de ARNm de IL-1β *in vivo* por RT-qPCR, decidimos evaluar la implicación del inflammasoma NALP3 en dicho proceso. Para ello, BMDMs recibieron una primera estimulación con ADR (50 µg/ml) o LPS (1 µg/ml) por un período de 120 min. (Señal 1) seguido

de una segunda estimulación con ATP exógeno (5 mM) durante 30 min más (Señal 2). Además, y dado que la presencia de ADR provoca un aumento en la producción de ROS, llevamos a cabo un ensayo en paralelo para ver si ADR estaba actuando de forma similar a cómo lo hacía el ATP, a nivel de la Señal 2. Para ello estimulamos BMDM en presencia de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 120 min. (Señal 1) seguido de una segunda estimulación con ADR (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 30 o 60 min (Señal 2). Posteriormente, analizamos por Western Blot la presencia de IL-1 β y caspasa-1, utilizando la condición LPS + ATP como control de activación.

Se ha descrito que en células activadas se produce un aumento en la producción de pro-IL-1 β (inmadura) (31 kDa), a través de la cascada de señalización de NF κ B y la translocación al núcleo del factor de transcripción AP-1. Posteriormente, el ATP extracelular actuaría como una señal de peligro capaz de activar el inflamasoma NALP3, promoviendo la activación de caspasa-1 y la consecuente maduración de IL-1 β (17 kDa) (Mariathasan et al., 2004), (Mariathasan et al., 2006). De acuerdo con esto, los BMDMs estimulados con LPS mostraban un aumento importante en la producción de pro-IL-1 β , que puede apreciarse por la detección de una banda de 31 kDa (Figura 3.17). Además, cuando añadimos a estas células ATP exógeno a una concentración de 5 mM se produce la activación de caspasa-1, con la consecuente maduración y la secreción de IL-1 β (Figura 3.17). Por el contrario, en presencia de ADR no detectamos ni producción de IL-1 β (en ninguna de sus formas) ni activación de caspasa-1. Además, la ADR tampoco estaría actuando a nivel de la Señal 2, como lo demuestra la ausencia de maduración de la pro-IL-1 β inducida por LPS (Figura 3.17).

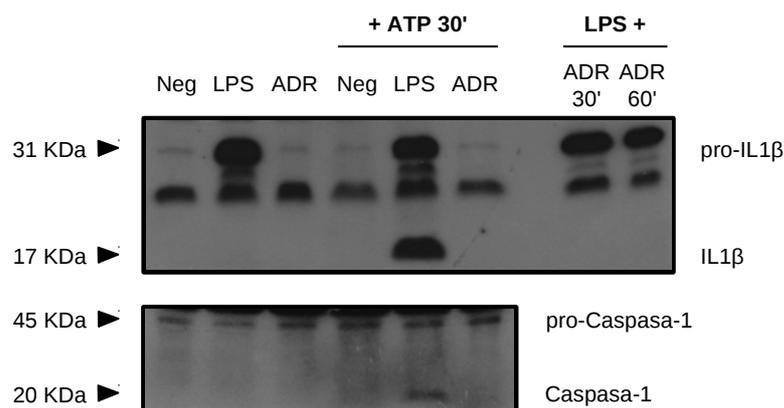


Figura 3.17. La presencia de ADR no induce la producción de IL-1 β y la maduración de Caspasa-1 en BMDMs. La inmunodetección por WB de IL-1 β y Caspasa-1 en lisados de BMDM estimulados *in vitro* con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o ADR (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 120 min., en presencia o ausencia de ATP exógeno (5 mM) durante 30 min. más, muestra que en presencia de ADR no existe inducción de IL-1 β ni maduración de Caspasa-1; al contrario de lo que ocurre en el caso de la estimulación con LPS y con LPS + ATP, respectivamente. Por otro lado, la ADR tampoco actúa a nivel del ATP, ya que no es capaz de promover la maduración de la forma pro-IL-1 β a IL-1 β .

7. Implicación de GPBP en el patogenia de la fibrosis pulmonar inducida por ADR.

A continuación, analizamos el papel de GPBP, una protein-quinasa capaz de fosforilar *in vitro* distintos tipos de colágeno (Raya et al., 1999), en la patogenia de la FPA. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio con un modelo de glomeruloesclerosis espontánea en ratones NZW, demostraron que dichos ratones son capaces de desarrollar con la edad una fibrosis glomerular que conduce a la obliteración del glomérulo, secundaria a la deposición de colágeno IV, y que se correlaciona con un aumento de GPBP (Revert et al., 2007). La relación que se establece entre la fibrosis glomerular y GPBP queda, además, demostrada en estudios con ratones transgénicos que hiper-expresan GPBP, en los que se ha observado un desarrollo de glomeruloesclerosis con deposición de colágeno en la matriz mesangial; siendo similar, aunque menos intensa, a la encontrada en los ratones NZW (Revert et al., 2007). En base a esto, y a que la membrana basal glomerular y alveolar son similares, pensamos que GPBP puede estar implicado en fibrosis pulmonar.

7.1. Aumento de la expresión de GPBP durante la inducción de FPA.

Para comenzar a analizar el papel de GPBP en la fibrosis pulmonar, analizamos su expresión en el pulmón tras instilación de ADR mediante estudios de inmunohistoquímica en tejido, RT-qPCR y cuantificación de GPBP-1 circulante por ELISA (cGPBP-1) (Figura 3.18). El análisis de las muestras de suero de ratones tratados con ADR muestra un aumento en la concentración de cGPBP-1 en todos los puntos estudiados (5, 10 y 12 días); si bien, a día 5 este incremento es considerablemente mayor, produciéndose una caída en los niveles de GPBP-1 circulante a medida que evoluciona el proceso fibrótico, pero manteniéndose siempre por encima de los niveles basales del día 0 (Figura 3.18a). Los estudios de inmunohistoquímica usando un anticuerpo policlonal específico anti-GPBP (pep-1) muestran que en el pulmón de ratones sin tratar GPBP se expresa a niveles muy bajos, quedando su expresión confinada al epitelio bronquial y vascular. En cambio, 14 días después de la instilación de ADR el pulmón presenta un aumento en la expresión de GPBP, detectándose tanto en el epitelio bronquial como en el parénquima; adoptando en esta última localización un patrón parcheado asociado a los depósitos de matriz extracelular (Figura 3.18c). Además, el análisis del pulmón por RTqPCR revela una elevada expresión del ARNm de GPBP, siendo casi 10 veces superior a la encontrada en el pulmón control (Figura 3.18b). Estos estudios nos sugieren que GPBP es una molécula candidata a participar en la patogenia de la fibrosis pulmonar.

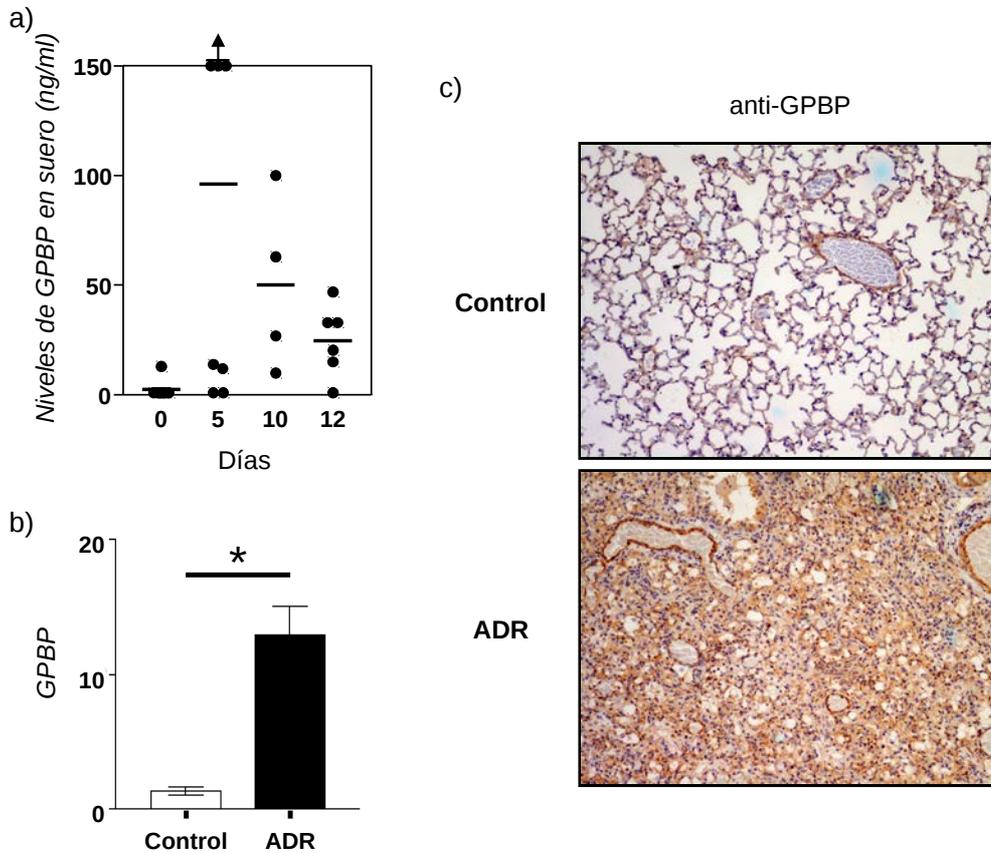


Figura 3.18. La fibrosis asociada a la instilación de ADR por vía endotraqueal conlleva un aumento en la expresión de GPBP. Estudios de cuantificación de cGPBP-1 por ELISA (a), RT-qPCR (b) e inmunohistoquímica (c) revelan un aumento en la expresión de GPBP a nivel sérico y pulmonar, asociado con depósitos de matriz extracelular y acumulación de colágeno, en todos los puntos estudiados. Además, detectamos que en los primeros días tras la instilación de ADR los niveles de cGPBP-1 aparecen aumentados de manera muy significativa, disminuyendo posteriormente a medida que avanzamos en el proceso fibrótico.

7.2. Efectos del tratamiento con AcM específicos anti-GPBP en el desarrollo de FPA.

Con el fin de evaluar la implicación de GPBP en el desarrollo de la patogenia de la FPA, decidimos llevar a cabo un experimento de administración de ADR por vía intratraqueal en ratones B6 machos de 11-12 semanas de edad, utilizando como grupo control a ratones B6 a los que se administró intratraquealmente un volumen igual de suero salino. Además, otros tres grupos de ratones a los que se administró ADR intratraqueal, fueron tratados bien con distintos AcM anti-GPBP (mAb14 o N12) con efecto bloqueante específico de la isoforma GPBP-1 o bien con un AcM anti-TGF- β con efecto bloqueante de la acción de esta citocina. Dado que se ha descrito que el proceso fibrótico es dependiente de TGF- β (Pittet et al., 2001), este último grupo

actuará como control de mitigación de la enfermedad. El tratamiento consistió en la administración por vía i.p. (sistémica) de 25 μg por semana en dosis única en el caso del AcM anti-GPBP N12 y de 1 mg por semana repartido en 3 dosis en el caso del AcM anti-TGF- β y del AcM anti-GPBP mAb14 durante los 14 días del experimento.

Las curvas de mortalidad muestran una aceleración de la mortalidad en el grupo tratado sólo con ADR, presentando a los 14 días de la inyección de ADR una tasa de mortalidad acumulada en torno al 55-60% (Figura 3.19). En cambio, tanto en el grupo al que se inoculó el AcM anti-TGF- β como aquellos que recibieron el tratamiento con los AcM anti-GPBP-1 la supervivencia fue significativamente mayor, destacando el grupo de N12 cuyo índice de mortalidad fue en torno a un 10% menor que el grupo tratado con anti-TGF- β (Figura 3.19).

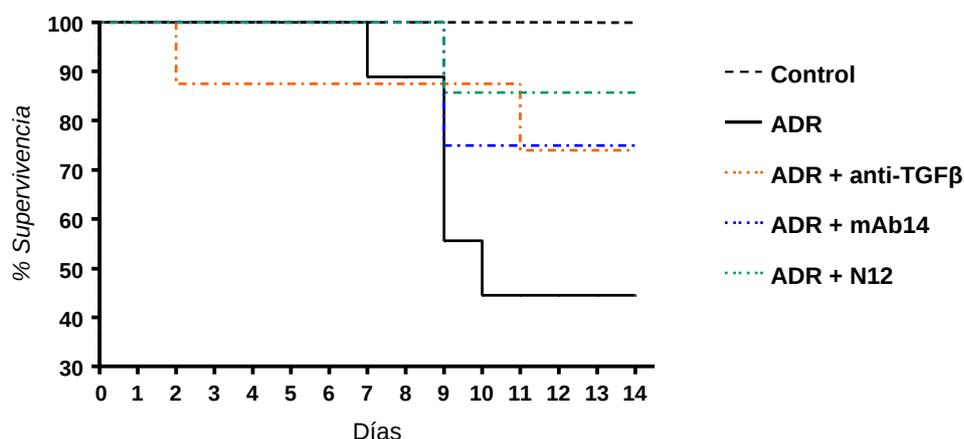


Figura 3.19. Influencia del tratamiento con anti-GPBPs en la curva de mortalidad en los ratones con FPA. El gráfico de supervivencia nos muestra que la instilación de ADR en ratones B6 provoca una elevada mortalidad. Sin embargo, el tratamiento con AcM específicos para la isoforma GPBP-1 (mAb14 y N12) prolonga la supervivencia de estos ratones. Además, observamos que la mortalidad en estos grupos es similar a la obtenida tras el tratamiento con un AcM anti-TGF β , que actuaría como control en la reducción del proceso fibrótico.

El análisis anatomopatológico revela que en todos los grupos tratados se observa una disminución significativa en la severidad de las lesiones (Figura 3.20), detectándose en todos ellos un menor engrosamiento del septo alveolar acompañado de una intensa celularidad intersticial e intra-alveolar (infiltrado mono- y polimorfonuclear), la presencia de edema intersticial y una acumulación de colágeno en forma laxa. Por otro lado, el tratamiento con anti-TGF- β también reduce el área afectada (** $p < 0.001$); sin bien, a pesar de que en los otros grupos se observa una tendencia a la baja, las diferencias no son significativas (Figura 3.20b). La severidad de la fibrosis se evaluó adicionalmente mediante la cuantificación de la expresión colágeno tipo I

(fibrilar) por RTqPCR. De nuevo, la administración de ADR se acompaña de un incremento significativo de la expresión pulmonar de colágeno tipo I con respecto al grupo de ratones no tratados (Figura 3.21). En correlación con la disminución en la severidad de las lesiones histológicas, los tratamientos con los AcM anti-GPBP, o con anti-TGF β se acompañaron de una disminución muy importante en los niveles de ARNm para colágeno I (Figura 3.21).

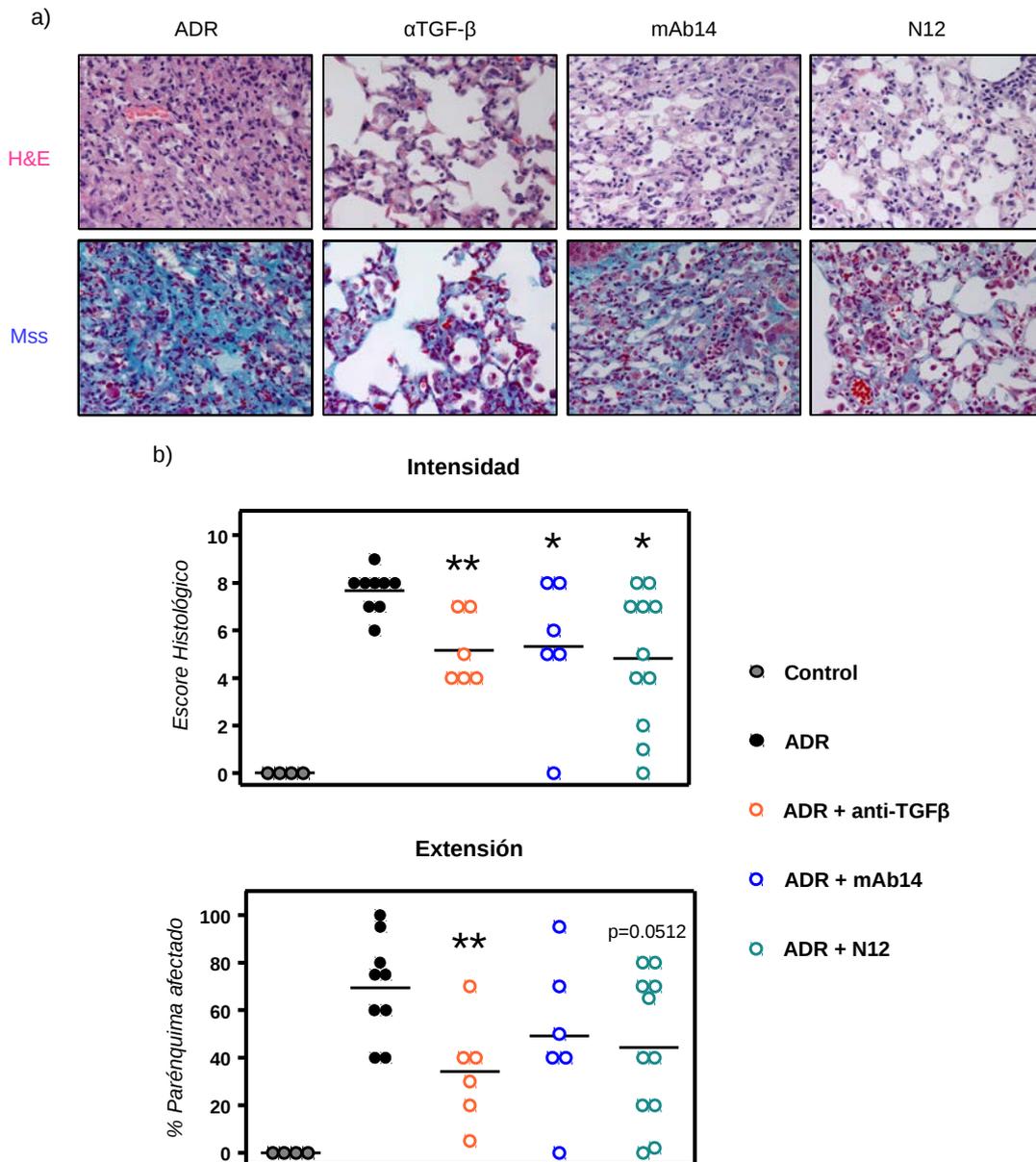
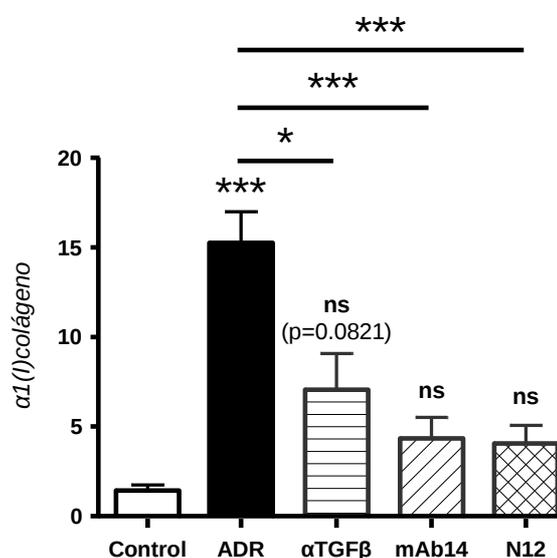


Figura 3.20. Tras la instilación de ADR las lesiones pulmonares presentes en los ratones tratados con AcM específicos anti-GPBP-1 son menores. Las alteraciones que se producen en el pulmón de los ratones tratados con mAb14 o N12, tras la inoculación de ADR, presentan una intensidad y una extensión menores a las encontradas en el grupo que sólo recibió ADR, existiendo diferencias significativas en la intensidad (* $p < 0.05$). Además, esta disminución es similar a la encontrada en el grupo tratado con anti-TGF β , si bien éste muestra diferencias altamente significativas con respecto al grupo tratado sólo con ADR (** $p < 0.001$).

Figura 3.21. La sobre-expresión de colágeno tipo I tras el tratamiento con anti-GPBP-1 aparece fuertemente disminuida. Tanto en el caso de mAb14 como de N12, se produce en el pulmón una disminución de la expresión de colágeno tipo I, siendo estadísticamente muy significativo. Además, dicha disminución es incluso mayor a la que produce tras el tratamiento con anti-TGF β . Sobre cada columna se representan los valores obtenidos en el análisis estadístico con respecto al grupo control.



7.3. Efectos sobre el desarrollo de FPA del tratamiento con Pinacidil y Myricetin, dos fármacos inhibidores de GPBP in vitro.

Para profundizar en la búsqueda de una posible estrategia terapéutica asociada al uso de inhibidores de GPBP en el tratamiento de la fibrosis pulmonar, el grupo del Dr. Juan Saus (FribroStatin; Universidad de Valencia), con el que mantenemos una colaboración activa, identificó 16 fármacos de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] con capacidad para modular la actividad de GPBP *in vitro*. Dichos compuestos fueron seleccionados en base a su capacidad para inhibir la autofosforilación GPBP *in vitro*. Para ello, se desarrolló un ensayo donde GPBP recombinante fue incubado con [³²P]- γ -ATP en presencia o ausencia del tampón de fosforilación (controles positivo y negativo del ensayo, respectivamente) durante 15 min., tras los cuales se añadieron los compuestos a analizar durante un período adicional de 12 min. Transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción con EDTA 0.5 M y Azul de bromofenol (0.01%) y 3 μ l de las muestras fueron transferidos a filtros de papel. Tras sucesivos lavados con H₃PO₄ 75 mM, los filtros se secaron y cuantificaron con un *phosphorimager*. En la figura 3.22 se muestra un ejemplo de dicho análisis en donde se observa la presencia de compuestos capaces de inhibir la autofosforilación de GPBP (círculos negros). En base a este estudio, se seleccionaron dos compuestos, Pinacidil y Myricetin, para la realización de los estudios *in vivo* en el modelo de FPA.

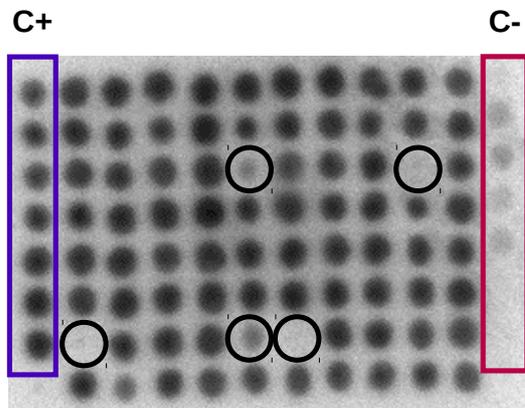


Figura 3.22. Ensayo HTS para actividad quinasa / autofosforilación de GPBP en presencia de distintos fármacos pertenecientes a la *Prestwick Chemical Library*® (realizado en el lab. del Dr. J. Saus). Algunos fármacos, entre ellos Pinacidil y Myricetin, son capaces de interactuar con GPBP y modular su función a través de la inhibición de su capacidad autofosforilativa (*círculos negros*). C+: control positivo de autofosforilación (GPBP+Tampón de fosforilación); C-: control negativo (GPBP sin tampón de fosforilación).

Tras instilación de 75 μ g de ADR en ratones C57BL/6 testamos, en primer lugar, distintas dosis de Pinacidil (0.245 mg/Kg, 0.082 mg/Kg y 0.027 mg/Kg) administradas diariamente por vía i.p. a partir del día 0 hasta el final del experimento (día 14). Dichas dosis se eligieron en base a que la dosis más alta (0.245 mg/Kg) es una adaptación al volumen y peso de un ratón de las dosis óptimas necesarias para modular GPBP *in vitro*. El análisis anatomopatológico revela que a una dosis diaria de 0.082 mg/Kg se produce una marcada disminución en la severidad de las lesiones producidas por ADR; a pesar de que la intensidad de la fibrosis tisular en las zonas afectadas es indistinguible al grupo tratado solo con ADR, la extensión del parénquima afectado por dichas lesiones se ve fuertemente reducida tras el tratamiento con 0.082 mg/Kg de Pinacidil (Figura 3.23). En paralelo con la histología, con dicho tratamiento encontramos una disminución en la expresión de la cadena α 1 del colágeno I, mostrando diferencias significativas con respecto al grupo tratado únicamente con ADR (* $p < 0.05$) (Figura 3.24). Además, a una dosis de Pinacidil tres veces inferior (0.027 mg/Kg) este efecto es incluso mayor, si bien no es significativo en relación a la dosis de 0.082 mg/Kg (Figura 3.24). No obstante, a dosis altas del fármaco (0.245 mg/Kg) el efecto terapéutico se pierde, siendo la expresión de colágeno I de igual intensidad que en el grupo tratado sólo con ADR (Figura 3.24).

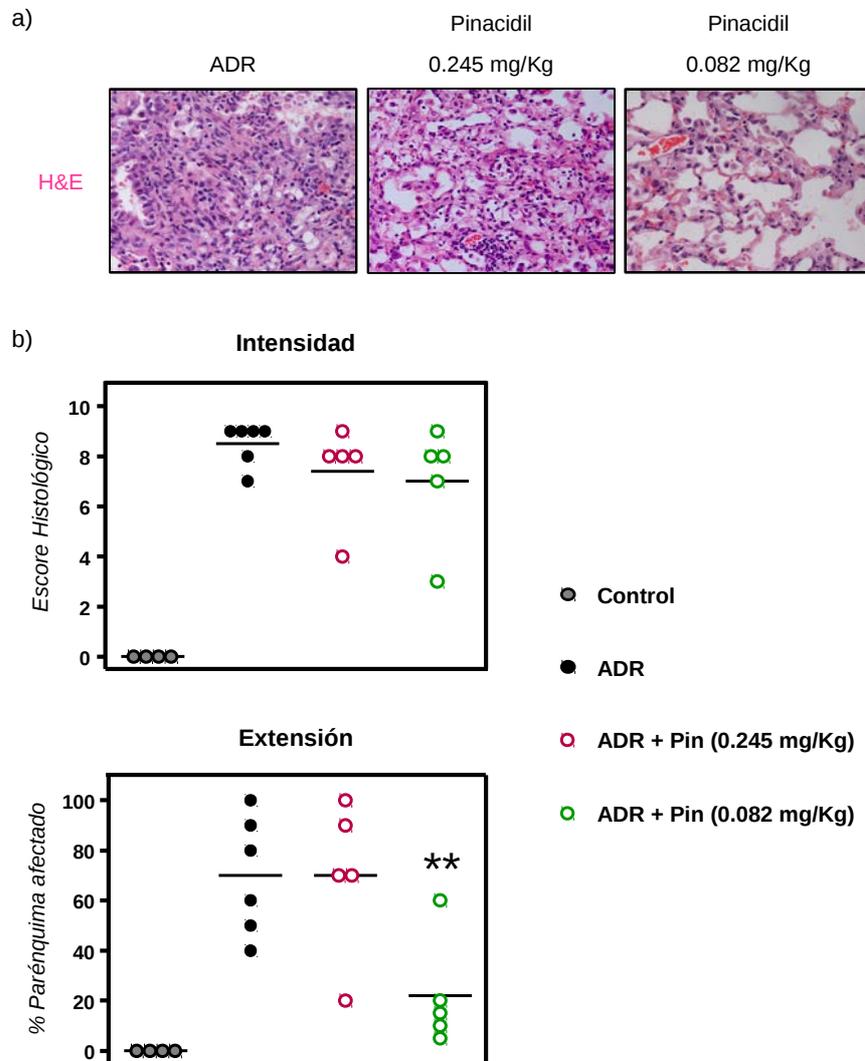
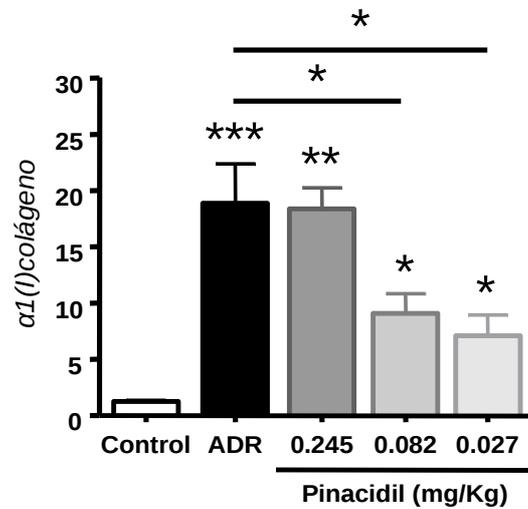


Figura 3.23. El fármaco Pinacidil es capaz de reducir las lesiones pulmonares provocadas por ADR, siendo más eficiente a dosis bajas. El tratamiento con 0.082 mg/Kg de Pinacidil tras la instilación de ADR por vía intratraqueal induce lesiones con una intensidad y una extensión menores a las encontradas sólo con ADR, existiendo diferencias muy significativas en la extensión (p<0.001); si bien, a una dosis de 0.245 mg/Kg dichas lesiones son similares.**

Figura 3.24. La expresión de colágeno I se ve reducida tras el tratamiento con dosis bajas de Pinacidil. En relación con lo observado en el estudio anatomopatológico, el tratamiento con dosis altas del fármaco no disminuye los niveles de expresión de colágeno I; en cambio, las dosis de 0.082 mg/Kg y 0.027 mg/Kg inducen una reducción significativa en dicha expresión (*, $p < 0.05$). Sobre cada columna se representan los valores obtenidos en el análisis estadístico respecto al grupo control.



Por otro lado, las curvas de mortalidad muestran una disminución de la tasa de mortalidad a dosis bajas de Pinacidil (0.082 mg/Kg) en comparación con el grupo tratado sólo con ADR (55-60% *versus* 70-75%) (Figura 3.25); siendo la mortalidad nula con la dosis de 0.027 mg/Kg (** $p < 0.01$), si bien en este grupo experimental no se llevaron a cabo estudios histológicos ya que prevaleció el análisis de las muestras por RTqPCR. En cambio, en aquellos grupos que recibieron dosis altas del fármaco la supervivencia es similar o incluso menor a la provocada tras la instilación de ADR (Figura 3.25).

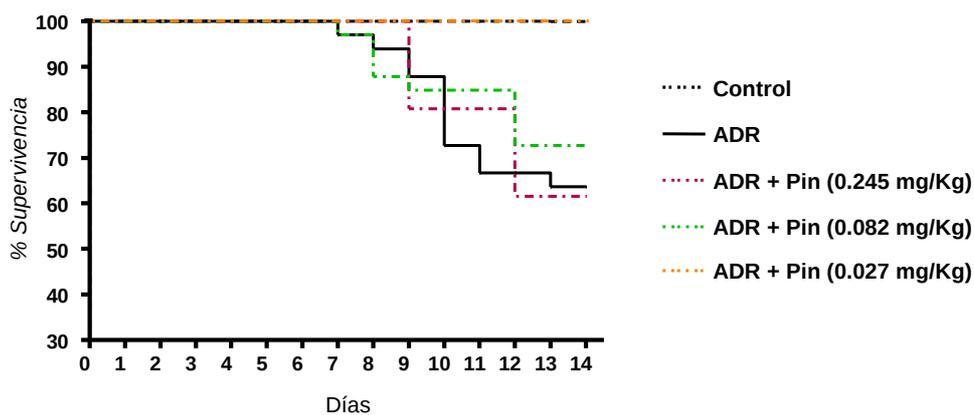


Figura 3.25. El tratamiento con Pinacidil reduce la mortalidad inducida por FPA. El gráfico de supervivencia nos muestra que la instilación de ADR en ratones C57BL/6 provoca una elevada mortalidad. Sin embargo, el tratamiento con una dosis de Pinacidil de 0.082 mg/Kg prolonga la supervivencia de estos ratones. Además, el tratamiento con 0.027 mg/Kg resulta en una supervivencia del 100% de los casos. No ocurre lo mismo a dosis altas del fármaco, donde la mortalidad es similar al grupo tratado únicamente con ADR.

De forma paralela a Pinacidil, estudiamos la respuesta a distintas dosis de Myricetin (0.95 mg/Kg, 0.34 mg/Kg y 0.11 mg/Kg) inoculadas diariamente por vía sistémica i.p. desde el día 0 a la instilación de la ADR. El análisis histológico muestra que a una dosis diaria de 0.11 mg/Kg se produce una disminución en la severidad de las lesiones producidas por ADR, tanto en la intensidad de las lesiones como en la extensión del parénquima afectado; existiendo en este último caso, diferencias significativas (* $p < 0.05$) (Figura 3.26). Las dosis más altas de Myricetin también muestran un efecto limitante en el proceso fibrótico, aunque de forma menos eficiente y rozando la significación estadística en cuanto a la intensidad de las lesiones ($p = 0.0513$) (Figura 3.26).

Estos datos quedan avalados con el análisis de la expresión de colágeno I por RTqPCR, donde podemos ver una disminución estadísticamente significativa en todas las dosis ensayadas (* en el caso de 0.95 mg/Kg y ** en el caso de 0.34 mg/Kg y 0.11 mg/Kg) (Figura 3.27).

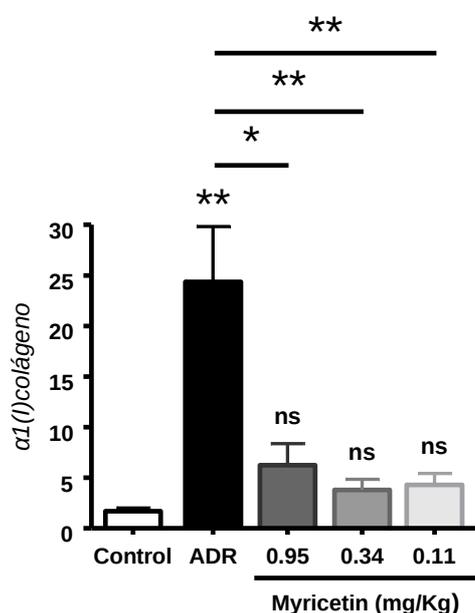


Figura 3.27. La expresión de colágeno I disminuye tras el tratamiento con Myricetin. Con todas las concentraciones de Myricetin estudiadas se observa una menor expresión de colágeno I, si bien las dosis de 0.34 mg/Kg y 0.11 mg/Kg presentan diferencias más significativas. Sobre cada columna se representan los valores obtenidos en el análisis estadístico respecto al grupo control.

Por otro lado, las curvas de mortalidad muestran una reducción de la mortalidad en los grupos tratados con 0.34 mg/Kg y 0.11 mg/Kg de Myricetin, siendo estadísticamente significativa en el primer caso (* $p < 0.05$); no así en aquel grupo que recibió 0.95 mg/Kg donde la mortalidad era similar a la desarrollada por el grupo tratado únicamente con ADR (Figura 3.28).

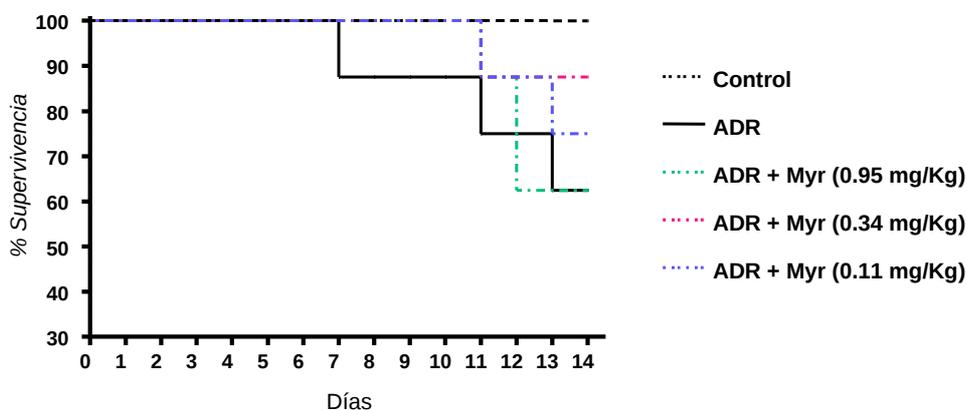
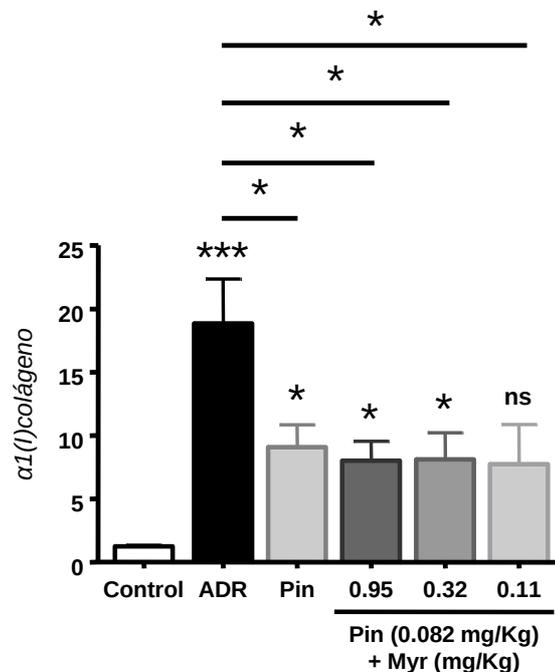


Figura 3.28. La administración de Myricetin prolonga la supervivencia de los ratones en la FPA. El tratamiento con una dosis de 0.34 mg/Kg de Myricetin disminuye la mortalidad de los ratones en aproximadamente un 25% respecto al grupo tratado sólo ADR. No ocurre lo mismo a dosis altas del fármaco, donde la mortalidad es igual a ADR.

En vista de los datos anteriores y con el fin de evaluar un posible efecto sinérgico entre los fármacos, decidimos llevar a cabo un experimento en el que se administraban de forma simultánea Pinacidil y Myricetin tras instilación de ADR en ratones B6 machos de 11-12 semanas de edad. Ya que la dosis de Pinacidil de 0.082 mg/Kg presentaba un efecto terapéutico intermedio y que las tres dosis de Myricetin testadas mostraban un patrón de expresión de colágeno I similar, establecimos 4 grupos experimentales: 1) 0.082 mg/Kg de Pinacidil (como control de tratamiento); 2) 0.082 mg/Kg de Pinacidil + 0.95 mg/Kg de Myr; 3) 0.082 mg/Kg de Pinacidil + 0.34 mg/Kg de Myr; y 4) 0.082 mg/Kg de Pinacidil + 0.11 mg/Kg de Myr. En todos los casos, los fármacos se administraron por vía i.p. diariamente a partir del día 0 de la inoculación de ADR por vía intratraqueal.

Los estudios de RTqPCR en el pulmón mostraron que con todos los tratamientos se producía una disminución en la expresión de ARNm de colágeno I estadísticamente significativa (* $p < 0.05$) (Figura 3.29). Además, esta reducción es similar en todos ellos, no existiendo diferencias entre el grupo tratado con 0.082 mg/Kg de Pinacidil y todas las combinaciones de éste con Myricetin; si bien, cabe destacar que el grupo que presenta una menor desviación estadística es el tratado con 0.082 mg/Kg de Pinacidil + 0.95 mg/Kg de Myricetin.

Figura 3.29. La combinación de Pinacidil y Myricetin no actúa de forma sinérgica en la disminución de colágeno I. Cuando administramos de forma simultánea 0.082 mg/Kg de Pinacidil con dosis crecientes de Myricetin (0.11 mg/Kg, 0.34 mg/Kg y 0.95 mg/Kg) detectamos una disminución en la expresión de colágeno I similar a la obtenida con la misma dosis de Pinacidil. Sobre cada columna se representan los valores obtenidos en el análisis estadístico respecto al grupo control.



Con todos estos resultados podemos establecer que en el modelo de FPA existe una relación entre la acumulación aberrante de colágeno y la sobreexpresión de GPBP. Como demuestran los estudios llevados a cabo con AcM específicos, GPBP actuaría controlando dicho proceso a nivel de la matriz extracelular. Además, los estudios con inhibidores farmacológicos ponen de manifiesto la existencia de nuevas estrategias terapéuticas.

DISCUSIÓN

En el presente estudio hemos desarrollado un nuevo modelo experimental de fibrosis pulmonar en roedores. En este modelo la administración endotraqueal de ADR induce un proceso inflamatorio agudo del parénquima pulmonar que en 7 días alcanza su grado máximo y que en el plazo de 2 semanas evoluciona a una fibrosis intersticial con abundante presencia de colágeno de los tipos I y IV. En un estudio inicial mostramos que el desarrollo de fibrosis por ADR se asocia con un incremento en la expresión génica de citocinas pro-inflamatorias de la inmunidad innata clásicas y de aquellas producidas por los diferentes subtipos de células T-CD4⁺ así como de los factores de transcripción característicos de las tres subpoblaciones efectoras de linfocitos TH (TH1, TH2 y TH17), sin que exista un predominio claro de alguno de estos fenotipos. Nos hemos centrado principalmente en el análisis del papel de GPBP en la patogénia de la fibrosis pulmonar por ADR. En primer lugar, mostramos que la aparición de la fibrosis se asocia con un incremento de la expresión pulmonar de GPBP, tanto a nivel de proteína como de ARN, y con un aumento en los niveles circulantes de GPBP-1. En segundo lugar, la inhibición de GPBP-1 mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos, tiene un efecto terapéutico sobre el desarrollo de fibrosis sin afectar el cuadro inflamatorio. Por último, hemos identificado dos compuestos de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*®, Pinacidil y Myricetin, capaces de inhibir la actividad quinasa de GPBP *in vitro* y que poseen una actividad terapéutica *in vivo* en el modelo fibrosis pulmonar por ADR.

Dada la ausencia de un modelo experimental capaz de reproducir todas las características clínicas de la FPI en humanos, con la consiguiente limitación a la hora de comprender los mecanismos tanto celulares como moleculares implicados en su evolución, la primera parte del presente trabajo se ha centrado en el desarrollo y caracterización de un nuevo modelo de fibrosis pulmonar por administración intratraqueal de ADR. Nuestro primer objetivo fue comprobar la capacidad fibrogénica de la ADR y establecer la dosis mínima para la inducción de fibrosis pulmonar por dicho fármaco. Para ello tomamos como punto de partida el modelo de fibrosis cutánea descrito en ratones BALB/c por R.T. Dorr y cols. (Dorr et al., 1980), que reproduce las lesiones cutáneas provocadas por la extravasación accidental de ADR en el sitio de punción endovenosa en pacientes sometidos a quimioterapia antitumoral. La primera variación que hicimos sobre este modelo fue la utilización de ratones B6, en lugar de los BALB/c, dada la mayor susceptibilidad de los B6 a la inducción de fibrosis pulmonar por Bleomicina, otra antraciclina de la misma familia que ADR (Adamson, 1976), y cuyo uso experimental en modelos animales como agente profibrótico está bien establecido en la literatura biomédica (Moore and Hogaboam, 2008). Así, la administración de 60 µg de ADR por vía intradérmica en ratones B6 comenzó a provocar lesiones dérmicas a partir del 6º día, adquiriendo su máxima expresión a los 10 días. Macroscópicamente se observó alopecia e hiperqueratosis en la zona de inyección,

donde la piel apareció engrosada y endurecida, en tanto que el análisis anatomopatológico mostró acantosis y deposición de tejido fibroso denso. A pesar de que los resultados de Dorr y cols. (Dorr et al., 1980) muestran un desarrollo máximo de las lesiones de forma más temprana, entre 3-5 días, las características clínicas e histológicas de nuestros ratones B6 coinciden con lo descrito en su modelo con ratones BALB/c. La dosis empleada en estos experimentos sirvió de referencia para la puesta a punto del modelo de fibrosis pulmonar tras administración intratraqueal de ADR (FPA).

Una vez comprobada la capacidad fibrogénica de nuestra ADR, se procedió a inocularla por vía intratraqueal a los ratones B6, empleando dos dosis diferentes del fármaco, 75 µg o 25 µg, en una sola inyección. La reproducibilidad de las lesiones histológicas, tanto inter- como intra-ensayo, fue notablemente mayor con la dosis de 75 µg. El aspecto anatomopatológico del pulmón en estos ratones recuerda el de una neumonía intersticial, con engrosamiento del septo alveolar, a costa de un marcado infiltrado inflamatorio y proliferación de las células epiteliales, llegando a obliterar completamente el espacio alveolar. Además, mediante tinción con Tricrómico de Masson se evidenció un marcado cúmulo de colágeno en los pulmones en que se instiló ADR, refrendado por el análisis por RTqPCR que mostró un incremento en la expresión tisular del ARNm de los colágenos de tipo I y de tipo IV. Este tipo de lesiones las encontramos tanto en el día 7 como en el 14 tras inoculación, si bien en el primer caso fueron menos prominentes, con predominio de la inflamación perivascular y peribronquial. Cuando se utilizó la dosis de 25 µg de ADR, las lesiones se limitaron a la pleura y áreas subpleurales, existiendo mas variabilidad en el grado de afectación entre los animales del mismo grupo. Esta menor reproducibilidad de la extensión de las lesiones pulmonares con la dosis más baja, nos aconsejó establecer en 75 µg las dosis de ADR a emplear en este modelo en los experimentos posteriores.

Pese a que son bien conocidos los efectos del tratamiento con ADR sobre el corazón (Verschoore et al., 1987), (Friedberg et al., 2003), (Bredenfeld et al., 2004), (Dimopoulou et al., 2006), apenas hay estudios sobre los mecanismos implicados en la toxicidad pulmonar inducida por dicho fármaco, a pesar de la existencia de casos documentados en pacientes que reciben altas dosis de quimioterapia (Brockstein et al., 2000). La toxicidad inducida por ADR en pacientes puede causar varias complicaciones pulmonares como broncoespasmo, edema local, neumonitis intersticial y fibrosis pulmonar (Minchin et al., 1988), (Meadors et al., 2006). Además, la inducción estándar de tres ciclos de quimioterapia CAF (Ciclofosfamida, Adriamicina, 5-Fluorouracilo) en pacientes con cáncer de mama provoca una disminución significativa de la capacidad media de difusión de los pulmones para el monóxido de carbono (DLCO). Asimismo, el *BALF* de estos pacientes muestra un incremento significativo de IL-6, IL-8, neutrófilos y linfocitos; lo que pone de

manifiesto una disfunción pulmonar, en la que la inflamación puede actuar como un factor impulsor del desarrollo de un síndrome de toxicidad pulmonar (Bhalla et al., 2000).

En este sentido, la Bleomicina y la Mitomicina son los quimioterápicos más fuertemente asociados con daño pulmonar, promoviendo fibrosis pulmonar (Meadors et al., 2006). En combinación con otros fármacos, como ADR, ciclofosfamida, vincristina, procarbazona, prednisona y gencitabina, pueden causar una variedad de manifestaciones pulmonares patológicas en los pacientes que los reciben, que van desde el broncoespasmo temporal (que se resuelve espontáneamente a las pocas horas de haber retirado el tratamiento) a la neumonitis intersticial aguda, la neumonitis crónica y la fibrosis pulmonar (Brusamolino et al., 2006), (Macann et al., 2008). Además, la instilación intratraqueal de Bleomicina junto con dactinomicina, mitomicina c, ADR y ciclofosfamida en ratones provoca un incremento en el contenido tisular de hidroxiprolina, un indicador de fibrosis (Kehrer et al., 1986). Por otro lado, R.F. Minchin y cols. (Minchin et al., 1988) examinaron en perros los efectos bioquímicos e histopatológicos sobre el pulmón de la inyección de ADR en la arteria pulmonar, revelando que altas concentraciones del fármaco (65 µg/ml) provocan necrosis del endotelio arterial acompañado de edema periarterial, edema subpleural y enfisema pulmonar. Asimismo, y de forma similar a lo que ocurre en nuestro modelo, el estudio confirma que el daño producido por la ADR en el tejido pulmonar es dosis-dependiente, siendo la dosis mínima en perros de 10 µg/ml. Sin embargo, estudios recientes en pacientes (Bhalla et al., 2000), (Eisenbeis et al., 2001), (Martin et al., 2005), (Brusamolino et al., 2006), (Macann et al., 2008), muestran que si bien el pulmón humano se asemeja al del perro en la absorción y retención de ADR, la tasa de acumulación del fármaco es menor en el primero (Minchin et al., 1984), (Minchin et al., 1988).

El BALF es una herramienta diagnóstica muy extendida en clínica humana, al ser un procedimiento relativamente poco agresivo. Su utilización comprende desde las infecciones oportunistas, el asma bronquial o el cáncer pulmonar, hasta las neumopatías intersticiales, como la FPI o la sarcoidosis (Welker et al., 2004). En estas últimas entidades el BALF se emplea a su vez para monitorizar la respuesta a los distintos procedimientos terapéuticos, permitiendo la identificación de pacientes respondedores *versus* no respondedores a fármacos con importantes efectos secundarios, ayudando así a decidir la continuidad o la retirada de una medida terapéutica (Watters et al., 1987), (Boomars et al., 1995), (Tabuena et al., 2005). El BALF también ha permitido conocer procesos patogénicos básicos y ha ayudado a clasificar los diferentes tipos de enfermedad intersticial (2000), (2002), (Kieszko et al., 2004), (Welker et al., 2004), (Tabuena et al., 2005). No obstante, el lavado broncoalveolar proporciona una información parcial, siendo muy útil para analizar los fenómenos que tienen lugar en la luz alveolar, pero no tanto para evaluar

aquellos que afectan a la pared del alveolo. La interpretación de los resultados del BALF se sustenta en el análisis diferencial de las células obtenidas (citología convencional). Además, cuando las posibilidades tecnológicas lo permiten, posibilita la valoración funcional de esas células, mediante análisis de los marcadores de superficie (Dauber et al., 1992), de los patrones de producción de diferentes moléculas, como las citocinas, o incluso su comportamiento en cultivos celulares.

El resultado más llamativo en el análisis citométrico del BALF es el marcado incremento en neutrófilos y otras células de la inmunidad innata como eosinófilos y células NK, sugiriendo su implicación en la patogénesis y progresión de la enfermedad, tal y como ha sido mostrado anteriormente en pacientes con FPI (Reynolds et al., 1977), (Yasuoka et al., 1985), (Peterson et al., 1987), (Hällgren et al., 1989), (Hiwatari et al., 1991), (Obayashi et al., 1997). La relevancia de los granulocitos en la patogenia de la FPI queda refrendada por la presencia marcada de citocinas implicadas en la quimiotaxis y activación de neutrófilos, monocitos y linfocitos en el fluido pulmonar; incluyendo CCL-3, CCL-2 e IL-8 (Standiford et al., 1993a), (Standiford et al., 1993b), (Car et al., 1994), (Ogushi et al., 1997). El paralelismo entre los hallazgos en nuestros ratones tratados con ADR y los pacientes con FPI se extiende al aumento en el número de linfocitos en el BALF, con un ratio elevado de células T-CD4⁺/CD8⁺ (Papisiris et al., 2005), (Parambil et al., 2005), (Parra et al., 2007) y a la disminución del número de macrófagos (Hunninghake et al., 1981), (Ozaki et al., 1992), (Standiford et al., 1993a), (Standiford et al., 1993b), población predominante en el BALF de los ratones control. Dentro de la población de linfocitos, las células predominantes en los ratones tratados con ADR fueron los linfocitos T-CD4⁺. Además la mayoría de estos linfocitos exhibían el fenotipo CD69⁺CD44⁺CD62L⁻CD45Rb⁻, característico de célula activada.

En consonancia con los datos del BALF, en el parénquima pulmonar se observó una marcada acumulación de poblaciones celulares características de la inmunidad innata (macrófagos, granulocitos, células NK y células dendríticas). En cambio, el número absoluto de linfocitos T-CD4⁺, T-CD8⁺ y B no fue significativamente mayor que el encontrado en los controles no inyectados, aunque la exposición a ADR indujo modificaciones fenotípicas en las células T, aumentando significativamente la frecuencia de linfocitos T con fenotipo de célula activada CD69⁺CD44⁺CD62L⁻CD45Rb⁻. Una circunstancia similar se repitió en el caso de las células dendríticas, que en los ratones tratados con ADR muestran un fenotipo maduro, caracterizado por la expresión de IA^b (MHC de clase II) y de la molécula co-estimuladora CD80 (B7.1). La falta de un incremento en el número absoluto de linfocitos intraparenquimatosos, a diferencia de los resultados observados en el BALF, puede deberse a que, junto a las células que infiltran el parénquima, tras digestión completa del pulmón se recogen también aquellas presentes en los

vasos sanguíneos, dado que en los pulmones obtenidos sólo se había realizado un lavado bronquioalveolar pero no del árbol vascular, lo cual podría distorsionar los resultados.

Estudios fenotípicos de las células obtenidas en el BALF tras la administración intratraqueal de Bleomicina muestran que, al igual que ocurre con ADR, la respuesta inflamatoria comienza con un infiltrado agudo de neutrófilos, seguido por la transición a una inflamación crónica predominantemente linfocítica (Chandler et al., 1983), (Thrall and Barton, 1984), (Izbicki et al., 2002), (Oikonomou et al., 2006); exhibiendo ambas poblaciones un fenotipo de célula activada (Karpel et al., 1989), (Tarnell et al., 1992). Además, el estudio de los linfocitos presentes en el parénquima pulmonar en ratas tratadas con Bleomicina revela que el ratio CD4:CD8 normal (1:1) se vió incrementado a los 7 días tras la inoculación a 2:1, revirtiéndose a 1:2 en etapas posteriores del proceso de la enfermedad. Curiosamente, el incremento en la población de células T efectoras ocurre en el momento en que la síntesis de colágeno está siendo muy activa. En cambio, coincidiendo con la disminución del colágeno tisular, en etapas tardías de la enfermedad, se produce un aumento en el número de células T supresoras (Kumar, 1984), (Thrall and Barton, 1984). En nuestro modelo de fibrosis pulmonar por ADR, el análisis del BALF se centró en la fase de inflamación aguda, por lo que las células T-CD4⁺ y T-CD8⁺ con fenotipo de células activadas que detectamos serán, en su mayor parte, células efectoras. Por otro lado, no se conoce mucho del papel de las células B en la fibrosis pulmonar humana, si bien tras la instilación de Bleomicina se ha demostrado un aumento en el número de células B tanto a nivel tisular como en el BALF (Thrall and Barton, 1984), (Izbicki et al., 2002) y se han descrito agregados de estas células en biopsias pulmonares de pacientes con FPI (Wallace et al., 1996). Asimismo, se ha observado que el porcentaje de macrófagos en el BALF de animales tratados con Bleomicina disminuye de forma considerable en comparación con los animales control tratados con salino, en los que el espacio alveolar se encuentra poblado principalmente por estas células. A pesar de esta disminución numérica, el porcentaje de macrófagos que expresan moléculas MHC de clase II está significativamente elevado tras el tratamiento con Bleomicina, indicando que están activados y que participan en la presentación de antígenos (Struhar et al., 1990). Todos estos datos reflejan que la fase de inflamación aguda inducida tras la administración de ADR tiene un marcado paralelismo con la cascada inflamatoria inicial que conduce a la fibrosis pulmonar tras instilación de Bleomicina.

Con objeto de profundizar en el conocimiento molecular de los fenómenos inmunológicos que acontecen en el pulmón tras la administración intrabronquial de ADR se analizó la expresión de diferentes citocinas pro- y anti-inflamatorias, mediante RT-PCR cuantitativa, en el ARN extraído del parénquima pulmonar. Estos estudios se llevaron a cabo tanto en la fase inicial de la

FP inducida por ADR (día 7) como en la fase de inflamación establecida y comienzo de las lesiones fibróticas (día 14 tras instilación de ADR).

En primer lugar se evaluó la expresión tisular de citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6, GM-CSF y TNF- α . Estas citocinas, características de la respuesta inmune innata, son secretadas principalmente por monocitos/macrófagos. Los resultados obtenidos son similares a los referidos previamente en pacientes con FPI y en modelos de fibrosis pulmonar, indicando un importante aumento en la expresión de estas citocinas en los dos puntos evolutivos estudiados, siendo TNF- α la citocina que más incrementó su expresión en la fase aguda post-instilación de ADR. En este sentido, en la patogénesis de la FPI se ha implicado la producción inadecuada de TNF- α , principalmente por incremento en su producción por las células epiteliales alveolares (Nash et al., 1993), (Piguet et al., 1993a), (Hasegawa et al., 1997), (Ziegenhagen et al., 1998). Asimismo, determinados polimorfismos en el gen de TNF- α se han asociado con un aumento del riesgo a desarrollar la enfermedad (Whyte et al., 2000). Además, numerosos estudios en modelos animales muestran que tanto a los 5 como a los 15 días de la instilación intratraqueal o sistémica de Bleomicina hay un incremento en los niveles tisulares de TNF- α , IL-1 β e IL-6, tanto de proteína como de ARNm (Piguet et al., 1989), (Piguet et al., 1990), (Phan and Kunkel, 1992), (Gurujeyalakshmi and Giri, 1995), (Santana et al., 1995), (Thrall et al., 1997), (Ortiz et al., 1998). En concordancia con estos resultados, la neutralización de TNF- α con anticuerpos monoclonales (Piguet et al., 1989), (Giri et al., 1993) o con formas solubles de los receptores de TNF- α (p75 y p55) (Piguet et al., 1993b) y el tratamiento con antagonistas del receptor de IL-1 β (Piguet et al., 1993b) logran prevenir o atenuar el desarrollo de neumonitis inducida por Bleomicina en ratones. De igual modo, ratones *tnf*^{-/-} están completamente protegidos del desarrollo tanto de inflamación (con ausencia de cualquier célula inflamatoria) como de fibrosis pulmonar en respuesta a la administración intravenosa de Bleomicina (Oikonomou et al., 2006).

Por otro lado, se ha detectado un aumento en la expresión de GM-CSF tanto en el BALF de pacientes con FPI como en ratones con fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina, dirigiendo el reclutamiento de fagocitos mononucleares y la producción de la quimiocina CCL-2 (MCP-1) con efecto sobre estas células (Baran et al., 2007).

Todos estos datos, junto con el aumento de las poblaciones propias de la inmunidad innata (macrófagos, granulocitos, células NK y células dendríticas) detectado en el BALF tras la instilación de ADR, respaldan el papel central de las células de la inmunidad innata en la FPA. Por otra parte, el incremento en la producción de estas citocinas pro-inflamatorias en las vías aéreas inflamadas actuaría promoviendo el infiltrado de neutrófilos.

La intervención de las células de la inmunidad innata en las reacciones inflamatorias ha adquirido una especial relevancia tras la descripción de las plataformas moleculares citosólicas denominadas inflamasomas y las posibles consecuencias derivadas de una activación aberrante de las mismas. En concreto, el inflamasoma de NALP3 se ha implicado en enfermedades pulmonares fibrosantes como la silicosis y la asbestosis (Cassel et al., 2008), (Dostert et al., 2008), (Martinon et al., 2009). Por un lado, la estimulación *in vitro* de macrófagos con microcristales, como el sílice o el asbesto (amianto), resulta en una activación de la caspasa-1 a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (Hornung et al., 2008), (Franchi et al., 2009). Además, se ha demostrado que los macrófagos peritoneales de animales deficientes en distintos componentes del inflamasoma NALP3 son incapaces de secretar las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-18 en respuesta a ambas sustancias (Cassel et al., 2008). Por otro lado, estudios *in vivo* con ratones deficientes en ASC y en NALP3 demuestran que la inflamación pulmonar y la deposición de colágeno tras la exposición a sílice o Bleomicina se haya reducida en comparación con las lesiones encontradas en los ratones sin estos defectos (Gasse et al., 2007), (Cassel et al., 2008).

En los experimentos llevados a cabo en el modelo de FP por ADR observamos, en primer lugar, que ADR es capaz de inducir una rápida activación *in vitro* de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM). Este efecto, detectable a los 5 minutos de incubación y que alcanza su cénit transcurridos 15 min, está relacionado con la activación del factor de transcripción NF κ B. Por otro lado, la misma dosis de ADR induce un aumento en la cantidad de ROS intracelular en estos macrófagos. Dicho aumento es específico de la presencia de ADR, ya que el tratamiento complementario con Apocynin, un inhibidor de la NADPH oxidasa, provoca la disminución de radicales libres hasta niveles similares a los detectados en las células sin tratar. Estos resultados se ajustan a los datos obtenidos en pacientes con FPI que revelan un importante desequilibrio en las especies reactivas de oxígeno en el pulmón, probablemente causado por un incremento de la producción de factores oxidantes por células inflamatorias (neutrófilos, monocitos y macrófagos), células del parénquima y la deficiencia de glutation extracelular (Kinnula et al., 2005). Además, un exceso de estrés oxidativo provoca efectos deletéreos que podrían contribuir a la patogénesis de la FPI, incluyendo la activación de cascadas de señalización sensibles a reducción-oxidación, cambios en la expresión de citocinas y quimiocinas, modificación del balance entre proteasas y anti-proteasas, inducción de apoptosis y activación de fibroblastos (Walters et al., 2008). Por otro lado, la presencia de agentes exógenos, como el asbesto, la sílice, la radiación ionizante y la Bleomicina, pueden causar fibrosis pulmonar en modelos animales, a través de la producción de ROS (Hoshino et al., 2003), (Janssen et al., 1993), (Nakamura et al., 1997). Estudios realizados con estos modelos demuestran que la exposición al agente externo no sólo es capaz de

incrementar la carga oxidativa en el pulmón sino que el tratamiento con antioxidantes es capaz de proteger de la enfermedad *in vivo*. Los antioxidantes más ampliamente utilizados en estos modelos incluyen glutatión, N-acetilcisteína (NAC) y superóxido dismutasa (SOD). De forma notable, el tratamiento con NAC disminuye significativamente la reacción inflamatoria primaria, la deposición de colágeno y la progresión de fibrosis pulmonar en el modelo de Bleomicina (Hagiwara et al., 2000), (Mata et al., 2003), (Serrano-Mollar et al., 2003). Además, el tratamiento con SOD y sus derivados induce una reducción del estrés oxidativo, la inflamación pulmonar y el desarrollo de fibrosis en un amplio rango de modelos animales (Tamagawa et al., 2000), (Oury et al., 2001), (Bowler et al., 2002), (Vujaskovic et al., 2002), (Kinnula and Crapo, 2003), (Fattman et al., 2003), (Day, 2004).

Basándonos en la demostración de que ADR es capaz de activar *in vitro* a los BMDM vía NFκB, induciendo la producción de especies reactivas de oxígeno, y de que *in vivo* la inducción de fibrosis por ADR conlleva un aumento de la expresión génica de IL-1β, decidimos evaluar la implicación del inflamasoma NALP3 en dicho proceso. Para ello partimos de la descripción previa de que la activación celular a través de ligandos de TLRs o de receptores citosólicos como NOD-1 o NOD-2 produce una primera señal consistente en el aumento de producción de pro-IL-1β (inmadura) (31 kDa), a través de la cascada de señalización de NFκB y la translocación al núcleo del factor de transcripción AP-1 (Lee and Kim, 2007), (Becker and O'Neill, 2007), (Couillin et al., 2009), (Harder et al., 2009), (Gong et al., 2010). Posteriormente, en presencia de ATP extracelular se generaría una señal de peligro (segunda señal) a través de otros receptores de la familia de NLRs, NALP3, capaz de activar el inflamasoma de su mismo nombre, promoviendo la activación de caspasa-1 y la consecuente maduración de IL-1β, con la aparición de su forma activa de 17 kDa (Martinon et al., 2002). Sin embargo, nuestros resultados tras incubar BMDMs con ADR no pudieron demostrar la producción de IL-1β (en cualquiera de sus formas) ni la activación de la caspasa-1. Además, la ADR tampoco fue capaz de promover el ensamblaje del inflamasoma inducido por el flujo de K⁺ a través del receptor P2x7, al contrario de lo que ocurre tras la adición de ATP extracelular. Esta ausencia de activación de NALP3 y del procesamiento de IL-1β *in vitro* puede deberse a que los macrófagos derivados de la médula ósea pueden representar una subpoblación macrofágica más inmadura que los macrófagos periféricos con un umbral de activación reducido; lo que además puede explicar el incremento que detectamos en la expresión génica de IL-1β en el pulmón. Por lo que obviamente no podemos descartar la implicación de NALP3 en el desarrollo de la FP inducida por ADR *in vivo*.

Dado que un componente relevante en las lesiones tisulares del pulmón tras la instilación de ADR es la fibrosis, se evaluó también la expresión de citocinas pro-fibróticas. En los días 7 y

14 tras administración de ADR se evidenció un aumento en la expresión de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 siendo esta última la citocina en la que observamos una diferencia estadística más significativa. La expresión diferencial de las tres isoformas de TGF- β durante el desarrollo de fibrosis pulmonar por ADR sugiere que cada una de ellas podría tener funciones diferentes *in vivo*. A pesar de que TGF- β 1 contribuye activamente a la fibrosis desarrollada en pacientes con FPI, el papel que cumplen TGF- β 2 y TGF- β 3 en la patología de la fibrosis pulmonar es controvertido. Varios estudios sugieren que TGF- β 1 es la dominante (Khalil et al., 1996b), (Khalil et al., 1996a), (Coker et al., 1997), (Gorelik and Flavell, 2002), mientras que otros (Santana et al., 1995) proponen que todas estas isoformas están implicadas por igual. En este último caso, se demostró que las tres isoformas se distribuyen de manera similar en el pulmón de ratas sanas, englobando las vías aéreas, los vasos sanguíneos, el parénquima pulmonar y los macrófagos alveolares. Durante la fase inflamatoria (5-7 días después de la administración de Bleomicina) las áreas dañadas presentaron un aumento de expresión tanto del ARNm como de la proteína de las tres isoformas, teniendo predominio en las células parenquimales y en los macrófagos alveolares. En cambio, a medida que avanzaba el proceso fibrótico, entre los días 10 y 14, este patrón se modificó incrementándose la expresión de las tres isoformas en el epitelio bronquial, en estrecha asociación con un aumento en la intensidad de la reacción inmunológica. Por otro lado, estudios *in vitro* de dosis-respuesta con Bleomicina muestran un incremento de TGF- β 1, tanto a nivel de transcripción, como de expresión génica y de producción de proteína (Breen et al., 1992). A pesar de que todas las isoformas de TGF- β inducen la síntesis de pro-colágeno por fibroblastos pulmonares en presencia de Bleomicina, TGF- β 3 fue la isoforma predominante en este ensayo y, además, fue capaz de reducir la degradación intracelular de pro-colágeno (Breen et al., 1992).

Los macrófagos alveolares aparecen como la fuente principal de casi todas las formas activas de TGF- β implicadas en la fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina (Khalil et al., 1996a). Sin embargo, también se ha demostrado que la fibrosis puede obedecer a mecanismos independientes de Smad/TGF- β 1, tanto en el pulmón como en otros tejidos (Ashcroft et al., 1999), (Ma et al., 2003), (Kaviratne et al., 2004) sugiriendo que otros mediadores profibróticos como IL-4, IL-5, IL-13 e IL-21 pueden actuar de forma independiente a la ruta de señalización de TGF- β /Smad en la estimulación de la síntesis y deposición de colágeno. Por otro lado, diversos autores han detectado un aumento en la patología pulmonar cuando la vía Smad/TGF- β está bloqueada (Nakao et al., 2000), (Hansen et al., 2000), indicando que TGF- β puede actuar tanto suprimiendo como induciendo la remodelación tisular en función del escenario en el que se desarrolle la reacción inflamatoria. De este modo, la fuente celular de TGF- β parece ser crítica, ya que el TGF- β 1 derivado de los macrófagos tiene más actividad profibrótica (Lee et al., 2001a) que el TGF- β 1 derivado de células T, cuyo papel supresor parece mayor (Kitani et al., 2003). Esto

es debido a que en los linfocitos T las propiedades fibrogénicas de TGF- β 1 pueden ser controladas por la co-secreción de IL-10, sugiriendo que el efecto anti-fibrótico de IL-10 es dominante sobre el efecto pro-fibrótico de TGF- β 1, y protegiendo al animal del desarrollo de fibrosis (Kitani et al., 2003). En nuestro caso, el aumento en los niveles de expresión de TGF- β tras la administración de ADR se detectó sobre el tejido pulmonar completo, por lo que no podemos atribuir esta producción a una población celular concreta. Aun así, parece claro que las tres isoformas de TGF- β , -1, -2 y -3, estarían participando en la patogenia de la enfermedad, estimulando la proliferación de fibroblastos y miofibroblastos, con la consecuente acumulación de colágeno; si bien TGF- β 3 parece ser la isoforma dominante en nuestros ratones inyectados con ADR. Por otro lado, el tratamiento con un AcM anti-TGF- β en ratones tratados con ADR reduce significativamente el desarrollo de las lesiones fibróticas, tanto desde el punto de vista histológico como en la expresión de colágeno I, demostrando que TGF- β actúa como mediador de la fibrosis en nuestro modelo de FPA, lo que concuerda con lo descrito en el modelo de fibrosis pulmonar por Bleomicina (Breen et al., 1992), (Giri et al., 1993), (Khalil et al., 1996a), (Cutroneo et al., 2007), (Manali et al., 2011).

Finalmente, se evaluó en el tejido pulmonar la expresión de diversas citocinas y de los factores de transcripción que definen a los diferentes subtipos funcionales de linfocitos T-CD4⁺ efectores (TH1, TH2, TH17) y T-reguladores. Cuando estudiamos la expresión de las citocinas de la respuesta TH1 se observa un aumento tanto de la citocina efectora IFN- γ como de la citocina inductora IL-12; si bien, IFN- γ aumenta tanto a día 7 como a día 14, mientras que IL-12 se sobreexpresa sólo en etapas tardías del proceso fibrótico (día 14). Además, encontramos un pico en la expresión del factor de transcripción T-bet en el 7º día tras administración de ADR.

Los resultados publicados en el modelo de inducción de fibrosis pulmonar por Bleomicina en ratones B6, con respecto a la expresión de IFN- γ son contradictorios. Así, algunos autores describen un aumento significativo en la expresión de IFN- γ en el parénquima pulmonar y en BALF en relación con el aumento en la inflamación tisular y con el grado de severidad clínica (Izbicki et al., 2002), (Segel et al., 2003). Además, en los ratones *ifn*^{-/-} inyectados con Bleomicina la infiltración del parénquima pulmonar y la acumulación de colágeno fueron mucho menos marcados que en los controles WT (Chen et al., 2001). En este mismo sentido, el tratamiento con un AcM anti-IL-12 fue capaz de reducir el grado de inflamación y fibrosis inducido en el tejido pulmonar por la administración de Bleomicina (Maeyama et al., 2001). En conjunto, estos resultados sugieren que el IFN- γ y la IL-12 median, al menos parte, la inflamación y fibrosis inducidas por Bleomicina y se ajustan a los encontrados en nuestros ratones tras la administración intratraqueal de ADR. En cambio, otros estudios de fibrosis pulmonar (Xu et al.,

2006) y de fibrosis cutánea (Lakos et al., 2006) inducidas por administración local de Bleomicina en ratones *t-bet*^{-/-} muestran el desarrollo de lesiones fibróticas más severas que en los animales WT. Además, en ambos casos, este aumento de fibrosis se asoció con una elevada producción de las citocinas de perfil TH2 (IL-4, IL-5 e IL-13), una disminución en la producción de IFN- γ y una expresión aumentada de TGF- β . Estos resultados sugieren, al contrario de lo detectado en nuestros ratones tras la inoculación de ADR, que la vía de T-bet confiere resistencia a la fibrosis inducida por Bleomicina; desempeñando un papel fisiológico en la regulación de la reparación tisular, al promover una respuesta de perfil TH1 que impide la acumulación excesiva de matriz extracelular. En cualquier caso, el aumento en la expresión de IFN- γ encontrado puede deberse, además, al hecho de que esta citocina no se produce exclusivamente por células TH1, siendo una fuente importante de ella las células T-CD8⁺ y NKs.

Con respecto a las citocinas características de la respuesta TH2, tanto la expresión de la citocina inductora (IL-4) como de las citocinas efectoras (IL-4 e IL-13) y del factor de transcripción GATA-3 están aumentados de forma muy significativa con respecto a los controles que no recibieron ADR. Hay que tener en cuenta que estas citocinas además pueden ser secretadas por otros tipos celulares, siendo una fuente importante de IL-4 las NKTs y de IL-13 las DCs, macrófagos, basófilos, eosinófilos y NKs (Wills-Karp, 2004), (Voehringer et al., 2006), (Kim et al., 2008). De forma similar, la administración de Bleomicina por vía intratraqueal estimula la producción de IL-13, aunque su pico máximo de expresión se observa a día 12 (tanto en el ARNm como en la proteína) tras su administración en vez de a día 7 como observamos en nuestro modelo con ADR.

Muchos estudios muestran que las citocinas tipo TH2 derivadas de diferentes poblaciones celulares están involucradas en una gran variedad de enfermedades fibróticas (Ong et al., 1999), (Hoffmann et al., 2001), (Sandler et al., 2003), (Wynn, 2004), (Lakos et al., 2006), (Aliprantis et al., 2007), entre ellas la FPI (Furuie et al., 1997). En este sentido, se han encontrado niveles elevados de IL-4 e IL-13 en BALF y pulmón de pacientes con FPI (Emura et al., 1990), (Wallace et al., 1995), (Hancock et al., 1998), (Wallace and Howie, 1999); existiendo una correlación entre los niveles tisulares de IL-13 y la progresión y severidad de la enfermedad (Wallace et al., 1995), (Hancock et al., 1998), (Wallace and Howie, 1999), (Golec et al., 2008). Estas dos citocinas comparten muchas actividades funcionales ya que ambas utilizan la misma cascada de señalización; IL-4R α /Stat6 (Zurawski et al., 1993). Sin embargo, con el desarrollo de ratones deficientes y transgénicos para IL-13 (McKenzie et al., 1998), (Zhu et al., 1999), y la utilización de antagonistas de IL-13 (Donaldson et al., 1998), (Chiaramonte et al., 1999), se han descubierto funciones únicas y no redundantes para estas dos citocinas en numerosos modelos. Así, estudios

en los que se inhibían IL-4 e IL-13 de forma independiente revelaron que IL-13 es la citocina efectora dominante en muchos modelos experimentales de fibrosis, incluyendo la fibrosis pulmonar por Bleomicina (Chiaramonte et al., 1999), (Blease et al., 2001), (Kumar et al., 2002), (Kolodsick et al., 2004), (Aliprantis et al., 2007), (Keane et al., 2007). Además, la sobreexpresión de IL-13 en el pulmón induce por sí sola en los ratones un aumento significativo de la fibrosis en las mucosas de las vías aéreas, en ausencia de cualquier estímulo inflamatorio adicional (Poynard et al., 2003); mientras que diversos métodos de inhibición de IL-13 son efectivos en el control de la síntesis de colágeno inducida por Bleomicina (Belperio et al., 2002), (Fichtner-Feigl et al., 2006), (Jakubzick et al., 2003).

Como se mencionó anteriormente, existen evidencias de que las citocinas TH2 cooperan con TGF- β en la inducción de fibrosis. En este sentido, experimentos realizados por S. Fichtner-Feigl sugieren que la fibrosis pulmonar conducida por TGF- β 1 en algunos casos podría ser dependiente de la señalización mediada por IL-13 a través del receptor IL-13R α 2 (Fichtner-Feigl et al., 2006), que originariamente se describió como un receptor “señuelo” para IL-13, capaz de participar en la inhibición de la fibrosis (Chiaramonte et al., 1999), (Wood et al., 2003); mientras que dos estudios independientes de C.G. Lee (Lee et al., 2001a) y S. Lanone (Lanone et al., 2002) reflejan que IL-13 es capaz de inducir la producción por los macrófagos de la forma “latente” TGF- β 1, al mismo tiempo que estimula la producción de proteínas que degradan las LAP (proteínas asociadas a latencia), resultando indirectamente en la generación de la forma activa de TGF- β . En base a estos datos, y dado que a los 7 días de la administración de ADR detectamos un incremento muy importante en los niveles tisulares de IL-13 en consonancia con un aumento en la expresión de todas las isoformas de TGF- β , no podemos descartar la implicación de este mecanismo en la patogenia de la FPA. Además, tras la instilación de ADR, tanto la subpoblación TH1 como TH2 aparecen aumentadas, sin predominio aparente de ninguna de ellas sobre la otra ni la presencia del desequilibrio persistente TH1/TH2 atribuido a la progresión de la fibrosis pulmonar. Por tanto, el siguiente paso fue cuantificar la expresión tisular de las citocinas y el factor de transcripción característicos de la subpoblación TH17 en el contexto de la FPA. En este sentido, Wilson y cols. (Wilson et al., 2010) sugieren que el desarrollo de fibrosis inducida por Bleomicina depende más de la vía de IL-17a que de la vía de IL-13, aunque no está clara la razón de esta discrepancia en los resultados.

Al evaluar el perfil de respuesta TH17, observamos un aumento en la expresión del factor de transcripción ROR γ T, de las citocinas inductoras (IL-6 y TGF- β 1) y de las citocinas efectoras (IL-17a e IL-21). También está aumentada la expresión de la IL-23, citocina esencial para la supervivencia de la población TH17. Diveu y cols. describieron en 2009 que la citocina IL-27 es

capaz de inhibir la producción de IL-17a e IL-17f a través de la supresión del factor de transcripción ROR γ T, específico de la población TH17, de una manera dependiente de STAT-1 (Diveu et al., 2009). Cabría esperar, por lo tanto, que el aumento en la expresión de dicho factor de transcripción se correlacionase con una disminución en la expresión de IL-27, aspecto que nuestros resultados confirman en los pulmones de los ratones tratados con ADR, a los 14 días de instilar el fármaco. No obstante, 7 días antes habíamos encontrado un aumento en la expresión de esta citocina, que podríamos justificar, por una parte, por el hecho de que ROR γ T muestra una baja expresión y, por otra, porque IL-27 participa en el inicio de la diferenciación a TH1, a través de la inducción de T-bet (Takeda et al., 2003), cuyo pico de expresión se produce también el día 7^o en nuestros ratones.

Se ha especulado sobre el papel de las células TH17 en la patogénesis de enfermedades inflamatorias pulmonares como el asma severo, ya que promueven el reclutamiento y supervivencia de neutrófilos (Nembrini et al., 2009). Además, un estudio de K. Kurasawa en pacientes con escleroderma muestra un incremento en los niveles de expresión de IL-17 tanto en suero como en las células T de piel y pulmón (Kurasawa et al., 2000), indicando que la sobreproducción de IL-17 podría jugar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Además, estudios realizados con ratones *il17a*^{-/-} muestran que esta citocina es esencial para el desarrollo de fibrosis inducida por Bleomicina (Wilson et al., 2010). No obstante, este aumento en la expresión de la citocina podría ser circunstancial, y no prueba inequívocamente el papel patogénico de las células TH17 en el desarrollo de la enfermedad. Así, la citocina IL-17 no deriva únicamente de las células TH17, si no que puede ser producida también por otros tipos celulares, incluyendo células NKT, macrófagos, neutrófilos y células T $\gamma\delta$, siendo esta última la mayor fuente de IL-17 (Ferretti et al., 2003), (Michel et al., 2007), (Gu et al., 2008), (Roark et al., 2008). En este sentido, estudios recientes demuestran que las células T $\gamma\delta$ pulmonares, y no las células TH17, son la fuente principal de IL-17a tras la primera infección con *Mycobacterium tuberculosis* en ratones (Lockhart et al., 2006). De igual modo, Braun RK y cols (Braun et al., 2008) describieron que en el modelo de FP por Bleomicina las células T $\gamma\delta$ eran la principal fuente de IL-17, si bien, los ratones deficientes en el receptor T $\gamma\delta$ mostraban una reducción significativa de la infiltración celular en las vías respiratorias y en la expresión de IL-6 en el pulmón, acompañado de un retraso en la reparación tisular y un aumento de los depósitos de colágeno en el intersticio pulmonar; indicando que la IL-17 secretada por estas células media la inflamación pulmonar pero no el desarrollo de fibrosis en este modelo. Por último, el incremento en la producción de citocinas tales como TGF- β , IL-6 e IL-1 β (Bettelli et al., 2006), (Acosta-Rodriguez et al., 2007) en las vías aéreas inflamadas tras la instilación de ADR podría actuar como un soporte adicional *in situ* para la diferenciación de las células T-CD4⁺ hacia el fenotipo TH17, provocando una marcada

infiltración por neutrófilos y el establecimiento de un cuadro inflamatorio que podría favorecer el desarrollo de fibrosis.

En base a esto, decidimos evaluar en ratones IL-17R-KO la reacción fibrótica desencadenada tras la administración endotraqueal de ADR. Además, el experimento se combinó con el tratamiento de algunos grupos de ratones (WT y IL-17R^{-/-}) con un AcM bloqueante de IL-6, citocina inductora del fenotipo TH17. Tanto el análisis anatomopatológico como la cuantificación de la expresión de colágeno I mostró hallazgos similares en todos los grupos experimentales, si bien el tratamiento con anti-IL-6 en ambas estirpes (B6 e IL-17R-KO) mejoró la curva de mortalidad. Estos datos indican que estas citocinas aparentemente no son las responsables únicas del proceso inflamatorio aunque el efecto sobre la mortalidad sugiere que están parcialmente implicados.

En paralelo con el aumento en la actividad TH17 hay un aumento en la expresión de los factores asociados a las células T-reg, tanto en las citocinas IL-2 y TGF- β (inductoras) e IL-10 (efectora) como en el factor de transcripción FoxP3. Las células Treg tienen un papel emergente en la patogenia de diversas enfermedades como el asma (Akdis and Akdis, 2009), la FPI (Kotsianidis et al., 2009) y la fibrosis renal (Mittal et al., 2009); si bien, los datos obtenidos tras la utilización de diversos modelos murinos son contradictorios. Se ha identificado a las células Treg CD4⁺CD25⁺ como las principales productoras de IL-10, una citocina inmunosupresora capaz de regular respuestas inflamatorias crónicas a través de muchos mecanismos (Moore et al., 2001). En humanos, IL-10 suprime significativamente la síntesis de colágeno tipo I en fibroblastos derivados de tejido cicatricial (Wangoo et al., 1997), indicando que puede inhibir la fibrosis de forma directa (Wang et al., 1998). Además, al contrario de nuestros resultados en FPA, en correlación con una mayor severidad de la enfermedad Kotsianidis y cols. muestran que pacientes con FPI presentan niveles reducidos de linfocitos Treg, en comparación con voluntarios sanos, tanto en el BALF como en la sangre circulante (Kotsianidis et al., 2009). En concordancia con esto se ha observado que IL-10 es capaz de modular la fibrosis en numerosos modelos murinos (Wynn et al., 1998), (Hesse et al., 2004), (Mu et al., 2005), (Hoffmann et al., 2000), incluido el modelo de fibrosis pulmonar por instilación de Bleomicina (Holsti et al., 2004). No obstante, algunos estudios presentan resultados dispares. Así, se ha descrito, por un lado, que ratones deficientes en IL-10 o con una expresión reducida de IL-10 en el pulmón están más predispuestos a padecer fibrosis pulmonar, con una elevada inflamación local, tras exposición a la radiación ionizante (Haase et al., 2007). Asimismo, el tratamiento con IL-10 reduce significativamente la fibrosis pulmonar por Bleomicina en ratones (Thompson et al., 1998), (Louis et al., 1998), (Arai et al., 2000), (Demols et al., 2002), (Nakagome et al., 2006). Además, la

administración de un plásmido que sobre-expresa TGF- β 1 en dicho modelo, induce la generación de una población de células Treg productoras de TGF- β 1 e IL-10, reduciendo la fibrosis. Este plásmido no tiene efecto en ratones deficientes en IL-10, lo que indica que esta citocina juega un papel clave en esta actividad supresora (Kitani et al., 2003). En contraste, estudios realizados por R.L. Kradin en el modelo de Bleomicina muestran que ratones deficientes en IL-10 no están protegidos de padecer la enfermedad, presentando un incremento de la inflamación pulmonar, lo que sugiere que IL-10 tiene un papel modulador de la respuesta inflamatoria pero no de la respuesta fibrótica (Kradin et al., 2004). Finalmente, Lee y cols. muestran que ratones transgénicos que sobre-expresan IL-10 de forma crónica en el pulmón tienen un considerable efecto pro-fibrótico, con remodelación de las vías aéreas a través de un mecanismo tanto dependiente como independiente de IL-13 (Lee et al., 2002); ya que un aumento de expresión de IL-10 es capaz de estimular la producción de IL-13, que juega un papel crítico en la hipersecreción mucosa en las vías aéreas (característica de trastornos respiratorios como el asma, la bronquitis crónica y fibrosis quística) a través de un mecanismo dependiente de IL-4R α /Stat-6, pero no en la respuesta inflamatoria o la fibrosis en estos animales. Esto se apoya en el hecho de que la fibrosis tisular inducida por IL-10 no se ve disminuida en ausencia de IL-13, Stat-6 o IL-4R α . Además, la sobre-expresión de IL-10 estimula la acumulación de TGF- β 1 a través de una vía independiente de IL-13/Stat-6; lo que indica que la IL-10 promueve fibrosis tisular, al menos en parte, a través de la inducción de TGF- β 1 (Lee et al., 2002). Por otro lado, la expresión del factor de transcripción Foxp3 en esta población es también esencial para la producción de TGF- β que, junto con IL-10, controlan la función celular de las Treg a través de diversos mecanismos (Moore et al., 2001); y cuya expresión encontramos aumentada de forma considerable en el pulmón de los ratones tratados con ADR.

Por tanto, el papel real de las células Treg en el control o la inducción de la fibrosis pulmonar tras instilación intratraqueal de ADR en ratones es controvertido. Así, no parece incongruente considerar que el incremento en su número obedezca a un mecanismo compensador en el contexto de una respuesta global de todas las subpoblaciones de células T-CD4, en especial las células TH17, ante un estímulo de una gran intensidad. Esta señal de peligro podría proceder de la destrucción masiva de células del epitelio bronquial tras irrumpir la ADR en el árbol respiratorio. Por otro lado, también podría especularse que las células Treg, a través de la producción de TGF- β o de IL-10, participen en la inducción y/o en el mantenimiento de la reacción fibrótica.

Todos estos resultados parecen indicar que en la patogenia de la fibrosis por ADR ninguna de las subpoblaciones T-CD4⁺ parece ser esencial para el desarrollo de las lesiones

fibróticas, ya que en este escenario los marcadores de actividad de todas las subpoblaciones aparecen aumentados de forma generalizada. Si bien, dada la naturaleza y las funciones biológicas de las citocinas secretadas tampoco podemos concluir que su papel sea absolutamente irrelevante y que su aparición en el escenario inflamatorio se produzca como un mero artefacto derivado de la evolución de la patología. De este modo, parece muy improbable que un sólo tipo de célula, citocina o factor de crecimiento sea el responsable del fenotipo de la fibrosis pulmonar, siendo más plausible la interacción entre numerosas citocinas y poblaciones celulares.

En este sentido podríamos aventurarnos a decir que la reacción inflamatoria desencadenada durante la inducción de FPA, junto con la inducción de todas las citocinas estudiadas en estos pulmones, sigue un patrón similar al descrito por Bringardner y cols. en su "Hipótesis Plástica" (Bringardner et al., 2008). En ella sugieren que numerosos tipos celulares tienen la capacidad de cambiar su patrón de diferenciación y convertirse en otras células. Tal es el caso de la flexibilidad y plasticidad que exhiben las poblaciones TH; si bien hay aspectos en los que estas células parecen comportarse como linajes estables, existen evidencias que denotan que estas poblaciones son capaces de cambiar su fenotipo con cierta facilidad, modificando su patrón de expresión de citocinas y de sus distintos factores de transcripción (*master genes*) (Lee et al., 2009), (Zhou et al., 2009a), (Zhou et al., 2009b), (O'Shea and Paul, 2010). En la misma dirección, Wilson MS y cols. (Wilson et al., 2010) argumentan recientemente que la cinética de IFN- γ , IL-17a e IL-13 en las lesiones de fibrosis pulmonar inducida por administración intratraqueal de Bleomicina sugiere que la respuesta inflamatoria y fibrótica está asociada con un tipo de respuesta TH1/TH17 en los estadíos iniciales y una respuesta mixta TH1/TH17/TH2 en las fases más tardías, que podría ajustarse también a nuestro modelo.

La última parte del trabajo se centra en el estudio del posible papel que GPBP puede jugar en la regulación del proceso fibrótico inducido tras la administración de ADR y la posibilidad de validar a GPBP como una posible diana terapéutica en esta enfermedad. Varios motivos nos llevaron a estudiar la implicación de GPBP en la patogénia de la fibrosis pulmonar. En primer lugar, GPBP-1 es capaz de unir y fosforilar el colágeno de tipo IV (Raya et al., 1999). En segundo lugar, la expresión de GPBP se regula positivamente por TNF- α (Raya et al., 2000), una citocina que se ha implicado en la patogénia de la fibrosis pulmonar (Nash et al., 1993), (Piguet et al., 1993a), (Hasegawa et al., 1997), (Ziegenhagen et al., 1998), (Bringardner et al., 2008). Además, ratones NZW que desarrollan espontáneamente una glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos muestran un aumento en la expresión glomerular de GPBP-1 en asociación con la desorganización y expansión del colágeno tipo IV de la MBG y depósitos de IgA en las

zonas donde dicha membrana basal se encuentra desdoblada (Revert et al., 2007). Por último, la sobre-expresión renal de GPBP-1 en ratones normales (C57BL/6) induce una glomeruloesclerosis y depósitos glomerulares de IgA, en ausencia de autoAcs circulantes, cualitativamente similar, aunque menos severa, a la observada en los ratones NZW en ausencia de autoAcs circulantes (Revert et al., 2007). El presente estudio constituye un punto de partida para probar la implicación de GPBP en la patogénia de la FP por ADR. Utilizando un modelo de fibrosis tisular, la inducción de FP tras instilación intratraqueal de ADR, demostramos que en asociación con la acumulación de colágeno de tipo I y tipo IV se observa un incremento en la expresión pulmonar de GPBP tanto a nivel de ARNm como de proteína acompañado de un incremento en los niveles de GPBP-1 circulante. Aunque en nuestro estudio no hemos analizado todavía la posible presencia de alteraciones ultraestructurales a nivel de la membrana basal alveolar tras la inducción de FP por ADR ni si la expresión aberrante de GPBP en los pulmones fibróticos se asocia a dichas alteraciones y/o co-localiza con los acúmulos de colágeno de tipo I, el hecho de que el tratamiento con los dos AcM anti-GPBP-1 diferentes tenga un efecto terapéutico similar al observado tras la inhibición de TGF- β , nos permite afirmar que GPBP-1 es un factor clave en el desarrollo de esta enfermedad.

Otro aspecto que queda por dilucidar en el presente trabajo es el origen celular del GPBP-1 observado durante la inducción de FP por ADR. En este sentido, es importante destacar que las células RAW264.7 (una línea celular de macrófagos murinos) son capaces de producir y secretar GPBP-1 tras estimulación con LPS y ADR (J. Saus, F. Revert, R. Merino Pérez, J. Merino Pérez, F. Revert-Ros. Methods for treating and diagnosing disease. Utility Patent Application PCT/EP2012/052923. Publication nº WO 2012/113785). Estos resultados nos llevan a especular que los macrófagos, que han sido implicados en la patogenia de la FPI (Duffield et al., 2005), (Li et al., 2011) y cuyo número se ve fuertemente incrementado en el tejido pulmonar tras la administración de ADR, constituye una o incluso la fuente principal de GPBP-1 en los pulmones fibróticos en respuesta al propio fármaco inductor del proceso y a estímulos tales como el TNF- α u otras citocinas pro-inflamatorias, producidos y secretados por alguna de las múltiples poblaciones inmunocompetentes presentes en las lesiones. Estudios de inducción de FP por ADR en ratones tras la eliminación local de los macrófagos pulmonares (ej: tras administración intratraqueal de liposomas cargados con clodronate) (Weisser et al., 2012), nos ayudarán a clarificar este aspecto importante.

El cribado de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*®, compuesta por casi 900 moléculas orgánicas ya autorizadas para diferentes usos clínicos y, por lo tanto, con una toxicidad escasa o nula, permitió la identificación de dos compuestos, Pinacidil y Myricetin, capaces de

inhibir GPBP *in vitro*. En nuestro estudio hemos evaluado la eficacia terapéutica de ambos fármacos solos o en combinación en el control de la FP por ADR. Los resultados fueron positivos en ambos casos, mejorando clínicamente la evolución del cuadro pulmonar inducido por instilación de ADR. Sin embargo, el efecto terapéutico de cada uno de los fármacos por separado no se potenció significativamente cuando estos se aplicaron de forma conjunta (falta de sinergismo). El efecto terapéutico se relacionó con las dosis de los fármacos pero, curiosamente, la relación dosis/efecto fue inversa. La dosis empleada inicialmente de cada fármaco fue aquella que reproducía en el organismo completo del animal la concentración con la que se inhibía el efecto de la quinasa *in vitro* (0.245 mg/kg de Pinacidil y 0.34 mg/kg de Myricetin). Sin embargo, el efecto terapéutico fue más evidente con dosis inferiores (0.082 y 0.027 mg/kg de Pinacidil y 0.11 mg/kg de Myricetin), mientras que con dosis superiores a las iniciales la eficacia fue prácticamente nula, o incluso tuvo un efecto perjudicial, al incrementar la mortalidad con respecto al grupo control. La mejoría clínica se correlacionó con una marcada disminución en la expresión tisular de los colágenos de tipo I y tipo IV, siendo más marcada en los grupos tratados con dosis bajas de ambos fármacos.

Esta relación inversa entre la dosis de los fármacos y su efecto en la fibrosis pulmonar podría residir en los efectos pleiotrópicos de los fármacos. Sobre la base de que estos fármacos se diseñaron inicialmente para otras indicaciones terapéuticas, hay que tener en cuenta que estos productos son pequeñas moléculas que pueden impactar en múltiples mecanismos biológicos. Pinacidil ($C_{13}H_{21}N_5O$) es un compuesto químico con capacidad permeabilizante de los canales de potasio en las membranas (Gollasch et al., 1995). Indirectamente ocasiona una reducción del calcio intracelular que conduce a la relajación del músculo liso vascular. De ahí su efecto vasodilatador y su propuesta inicial como fármaco anti-hipertensivo. Myricetin ($C_{15}H_{10}O_8$) es un flavonoide natural, con propiedades antioxidantes, presente en frutas y vegetales. Forma parte de los compuestos fenólicos del vino tinto. A concentraciones elevadas incrementa la captación de LDL-colesterol por los fagocitos y ha sido propuesto como un producto beneficioso en el cáncer de próstata (Knekt et al., 2002). Adicionalmente, el tratamiento con las dosis elevadas de estos fármacos podría ocasionar un efecto rebote incrementando la expresión y actividad de GPBP a nivel pulmonar. En este sentido, hemos observado que la inhibición de GPBP-1 con el AcM mAb-14 se asocia con un incremento en los niveles de ARNm de GPBP en el pulmón (datos no mostrados).

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio planteamos la idea de que una desregulación en la expresión de GPBP-1, secundaria al fenómeno inflamatorio, podría constituir un mecanismo patogénico general en la fibrosis tisular. Así, la sobre-expresión de GPBP-1

resultaría en la desestructuración de las membranas basales (alveolar, glomerular, endotelial, etc.) (Revert et al., 2007) lo cual podría servir como la señal de inicio del proceso fibrótico a través de la inducción de fenómenos de TEM o TEndM (Iwano et al., 2002), (Willis et al., 2005), (Kim et al., 2006), (Hashimoto et al., 2010). Obviamente, se requieren experimentos adicionales para verificar esta hipótesis.

CONCLUSIONES

1. La administración de ADR por vía intratraqueal en ratones B6 desencadena en el pulmón una serie de mecanismos inflamatorios inductores de fibrosis, que culminan en un aumento de la expresión de colágeno y, en última instancia, en la obliteración de los alveolos; constituyendo un modelo de Fibrosis Pulmonar dosis – dependiente y con una notable reproducibilidad de las lesiones histológicas, tanto inter- como intra-ensayo.
2. Estudios fenotípicos de las células obtenidas en el BALF y en la digestión del parénquima pulmonar tras la administración intratraqueal de ADR muestran que la respuesta inflamatoria comienza con un infiltrado agudo de neutrófilos y otras poblaciones celulares características de la inmunidad innata (macrófagos, granulocitos, células NK y células dendríticas con un fenotipo maduro IAb⁺CD80⁺), seguido por la transición a una inflamación crónica predominantemente linfocítica, con un ratio elevado de células T-CD4⁺/CD8⁺; exhibiendo ambas poblaciones un fenotipo de célula activada (CD69⁺CD44⁺CD62L⁻CD45Rb).
3. De manera similar a lo descrito en pacientes con FPI, la instilación intratraqueal de ADR induce un aumento en la expresión de las citocinas pro-inflamatorias L-1 β , IL-6, GM-CSF y TNF- α , características de la respuesta inmune innata; siendo TNF- α la citocina que más incrementó su expresión en la fase aguda post-administración de ADR. Estos datos, junto con el aumento de las poblaciones propias de la inmunidad innata detectado en el BALF, respaldan el papel central de las células de la inmunidad innata en la FPA.
4. La ADR es capaz de inducir *in vitro* una rápida activación de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM), promoviendo la activación temprana y transitoria del factor de transcripción NF κ B. Además, dicha activación se acompaña de un aumento en la cantidad de ROS intracelular, específico de la presencia de ADR. Sin embargo, BMDMs incubados con ADR no mostraron producción de IL-1 β (en cualquiera de sus formas) ni activación de NALP3 *in vitro*; si bien, no podemos descartar la implicación de este inflamasoma en el desarrollo de la FP inducida por ADR *in vivo*.
5. La administración de ADR induce un aumento en la expresión en las tres isoformas de la citocina pro-fibrótica TGF- β estudiadas; si bien TGF- β 3 parece ser la isoforma dominante en nuestros ratones inyectados con ADR. Además, el tratamiento con AcM anti-TGF- β en estos ratones reduce significativamente el desarrollo de las lesiones fibróticas, tanto desde el punto de vista histológico como en la expresión de colágeno I, demostrando que TGF- β actúa como mediador de la fibrosis en nuestro modelo.

6. En la patogenia de la fibrosis por ADR ninguna de las subpoblaciones T-CD4⁺ parece ser predominante en el desarrollo de las lesiones fibróticas, ya que en este escenario los marcadores de actividad de todas las subpoblaciones aparecen aumentados de forma generalizada; sugiriendo que la respuesta inflamatoria y fibrótica está asociada con un tipo de respuesta TH1/TH17 en los estadios iniciales y una respuesta mixta TH1/TH17/TH2 en las fases más tardías.
7. En nuestro modelo de inducción de FP tras instilación intratraqueal de ADR, en asociación con la acumulación de colágeno de tipo I y tipo IV, se observa un incremento en la expresión pulmonar de GPBP tanto a nivel de ARNm como de proteína acompañado de un incremento en los niveles de GPBP-1 circulante.
8. Tras la instilación de FPA, el tratamiento con AcM anti-GPBP (mAb14 o N12) con efecto bloqueante específico de la isoforma GPBP-1 indujo una disminución significativa en la severidad de las lesiones histológicas, en correlación con una reducción importante en los niveles de ARNm para colágeno I. Además, la supervivencia en estos ratones fue significativamente mayor, destacando el grupo de N12.
9. Por último, la administración de Pinacidil y Myricetin, solos o en combinación, en el modelo de FPA mejoró clínicamente la evolución del cuadro pulmonar con una relación dosis/efecto inversa. Sin embargo, el efecto terapéutico de cada uno de los fármacos por separado no se potenció significativamente cuando estos se aplicaron de forma conjunta (falta de sinergismo). Además, este efecto terapéutico se correlacionó con una marcada disminución en la expresión tisular de los colágenos de tipo I y tipo IV, siendo más marcada en los grupos tratados con dosis bajas de ambos fármacos.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G, Lanzavecchia, A Sallusto, F (2007) Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8:942-949.

Adamson, I.Y. (1976) Pulmonary toxicity of bleomycin. *Environ Health Perspect* 16:119-126.

Afkarian, M., Sedy, J.R, Yang, J, Jacobson, N.G, Cereb, N, Yang, S.Y, Murphy, T.L Murphy, K.M (2002) T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nat Immunol* 3:549-557.

Akdis, C.A. Akdis, M (2009) Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 123:735-46; quiz 747-8.

Alcorn, J.F., Guala, A.S, van der Velden, J, McElhinney, B, Irvin, C.G, Davis, R.J Janssen-Heininger, Y.M.W (2008) Jun N-terminal kinase 1 regulates epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF-beta1. *J Cell Sci* 121:1036-1045.

Aliprantis, A.O., Wang, J, Fathman, J.W, Lemaire, R, Dorfman, D.M, Lafyatis, R Glimcher, L.H (2007) Transcription factor T-bet regulates skin sclerosis through its function in innate immunity and via IL-13. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2827-2830.

Ambrus, J.L.J. Sridhar, N.R (1997) Immunologic aspects of renal disease. *JAMA* 278:1938-1945.

Anscher, M.S. (2010) Targeting the TGF-beta1 pathway to prevent normal tissue injury after cancer therapy. *Oncologist* 15:350-359.

Apostolou, I. von Boehmer, H (2004) In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 199:1401-1408.

Apostolou, I., Sarukhan, A, Klein, L von Boehmer, H (2002) Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3:756-763.

Arai, T., Abe, K, Matsuoka, H, Yoshida, M, Mori, M, Goya, S, Kida, H, Nishino, K, Osaki, T, Tachibana, I, Kaneda, Y Hayashi, S (2000) Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:L914-22.

Aranami, T. Yamamura, T (2008) Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int* 57:115-120.

Araya, J., Cambier, S, Morris, A, Finkbeiner, W Nishimura, S.L (2006) Integrin-mediated transforming growth factor-beta activation regulates homeostasis of the pulmonary epithelial-mesenchymal trophic unit. *Am J Pathol* 169:405-415.

Arras, M., Huaux, F, Vink, A, Delos, M, Coutelier, J.P, Many, M.C, Barbarin, V, Renauld, J.C Lison, D (2001) Interleukin-9 reduces lung fibrosis and type 2 immune polarization induced by silica particles in a murine model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24:368-375.

Arras, M., Louahed, J, Simoen, V, Barbarin, V, Misson, P, van den Brûle, S, Delos, M, Knoop, L, Renauld, J, Lison, D Huaux, F (2006) B lymphocytes are critical for lung fibrosis control and prostaglandin E2 regulation in IL-9 transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:573-580.

Ashcroft, F.M. (2005) ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *J Clin Invest* 115:2047-2058.

Ashcroft, G.S., Yang, X, Glick, A.B, Weinstein, M, Letterio, J.L, Mizel, D.E, Anzano, M, Greenwell-Wild, T, Wahl, S.M, Deng, C Roberts, A.B (1999) Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol* 1:260-266.

Avella, P. Walker, M (1999) Goodpasture's syndrome: a nursing challenge. *Dimens Crit Care Nurs* 18:2-12.

Baciewicz, F.A.J., Arredondo, M, Chaudhuri, B, Crist, K.A, Basilius, D, Bandyopadhyah, S, Thomford, N.R Chaudhuri, P.K (1991) Pharmacokinetics and toxicity of isolated perfusion of lung with doxorubicin. *J Surg Res* 50:124-128.

Baran, C.P., Opalek, J.M., McMaken, S., Newland, C.A., O'Brien, J.M.J., Hunter, M.G., Bringardner, B.D., Monick, M.M., Brigstock, D.R., Stromberg, P.C., Hunninghake, G.W., Marsh, C.B. (2007) Important roles for macrophage colony-stimulating factor, CC chemokine ligand 2, and mononuclear phagocytes in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 176:78-89.

Barbarin, V., Nihoul, A., Misson, P., Arras, M., Delos, M., Leclercq, I., Lison, D., Huaux, F. (2005) The role of pro- and anti-inflammatory responses in silica-induced lung fibrosis. *Respir Res* 6:112.

Barcellos-Hoff, M.H., Dix, T.A. (1996) Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol Endocrinol* 10:1077-1083.

Baroni, G.S., D'Ambrosio, L., Curto, P., Casini, A., Mancini, R., Jezequel, A.M., Benedetti, A. (1996) Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology* 23:1189-1199.

Barrett, N.A., Austen, K.F. (2009) Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. *Immunity* 31:425-437.

Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., Tomic-Canic, M. (2008) Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 16:585-601.

Batten, M., Ramamoorthi, N., Kljavin, N.M., Ma, C.S., Cox, J.H., Dengler, H.S., Danilenko, D.M., Caplazi, P., Wong, M., Fulcher, D.A., Cook, M.C., King, C., Tangye, S.G., de Sauvage, F.J., Ghilardi, N. (2010) IL-27 supports germinal center function by enhancing IL-21 production and the function of T follicular helper cells. *J Exp Med* 207:2895-2906.

Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., Hornung, V., Latz, E. (2009) Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 183:787-791.

Becker, C., Fantini, M.C., Neurath, M.F. (2006) TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:97-106.

Becker, C.E., O'Neill, L.A.J. (2007) Inflammasomes in inflammatory disorders: the role of TLRs and their interactions with NLRs. *Semin Immunopathol* 29:239-248.

Bedard, K., Krause, K. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245-313.

Bellini, A., Mattoli, S. (2007) The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest* 87:858-870.

Belperio, J.A., Dy, M., Burdick, M.D., Xue, Y.Y., Li, K., Elias, J.A., Keane, M.P. (2002) Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:419-427.

Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., Ochs, H.D. (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20-21.

Bernal, D., Quinones, S., Saus, J. (1993) The human mRNA encoding the Goodpasture antigen is alternatively spliced. *J Biol Chem* 268:12090-12094.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.

Bhalla, K.S., Wilczynski, S.W., Abushama, A.M., Petros, W.P., McDonald, C.S., Loftis, J.S., Chao, N.J., Vredenburgh, J.J., Folz, R.J. (2000) Pulmonary toxicity of induction chemotherapy prior to standard or high-dose chemotherapy with autologous hematopoietic support. *Am J Respir Crit Care Med* 161:17-25.

Bian, Y., Terse, A., Du, J., Hall, B., Molinolo, A., Zhang, P., Chen, W., Flanders, K.C., Gutkind, J.S., Wakefield, L.M., Kulkarni, A.B. (2009) Progressive tumor formation in mice with conditional deletion of TGF-beta signaling in head and neck epithelia is associated with activation of the PI3K/Akt pathway. *Cancer Res* 69:5918-5926.

Blease, K., Jakubzick, C., Westwick, J., Lukacs, N., Kunkel, S.L., Hogaboam, C.M. (2001) Therapeutic effect of IL-

13 immunoneutralization during chronic experimental fungal asthma. *J Immunol* 166:5219-5224.

Bocchino, M., Agnese, S, Fagone, E, Svegliati, S, Grieco, D, Vancheri, C, Gabrielli, A, Sanduzzi, A, Avvedimento, E.V (2010) Reactive oxygen species are required for maintenance and differentiation of primary lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* 5:e14003.

Boomars, K.A., Wagenaar, S.S, Mulder, P.G, van Velzen-Blad, H van den Bosch, J.M (1995) Relationship between cells obtained by bronchoalveolar lavage and survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 50:1087-1092.

Borza, D. (2007) Autoepitopes and alloepitopes of type IV collagen: role in the molecular pathogenesis of anti-GBM antibody glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol* 106:e37-43.

Bowler, R.P., Nicks, M, Warnick, K, Crapo, J.D (2002) Role of extracellular superoxide dismutase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L719-26.

Braun, R.K., Ferrick, C, Neubauer, P, Sjoding, M, Sterner-Kock, A, Kock, M, Putney, L, Ferrick, D.A, Hyde, D.M, Love, R.B (2008) IL-17 producing gammadelta T cells are required for a controlled inflammatory response after bleomycin-induced lung injury. *Inflammation* 31:167-179.

Bredenfeld, H., Franklin, J, Nogova, L, Josting, A, Fries, S, Mailänder, V, Oertel, J, Diehl, V, Engert, A (2004) Severe pulmonary toxicity in patients with advanced-stage Hodgkin's disease treated with a modified bleomycin, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, procarbazine, prednisone, and gemcitabine (BEACOPP) regimen is probably related to the combination of gemcitabine and bleomycin: a report of the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 22:2424-2429.

Breen, E., Shull, S, Burne, S, Absher, M, Kelley, J, Phan, S, Cutroneo, K.R (1992) Bleomycin regulation of transforming growth factor-beta mRNA in rat lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6:146-152.

Bringardner, B.D., Baran, C.P, Eubank, T.D, Marsh, C.B (2008) The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal* 10:287-301.

Brockstein, B.E., Smiley, C, Al-Sadir, J, Williams, S.F (2000) Cardiac and pulmonary toxicity in patients undergoing high-dose chemotherapy for lymphoma and breast cancer: prognostic factors. *Bone Marrow Transplant* 25:885-894.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W, Hjerrild, K.A, Paeper, B, Clark, L.B, Yasayko, S.A, Wilkinson, J.E, Galas, D, Ziegler, S.F, Ramsdell, F (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27:68-73.

Brusamolino, E., Baio, A, Orlandi, E, Arcaini, L, Passamonti, F, Griva, V, Casagrande, W, Pascutto, C, Franchini, P, Lazzarino, M (2006) Long-term events in adult patients with clinical stage IA-IIA nonbulky Hodgkin's lymphoma treated with four cycles of doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine and adjuvant radiotherapy: a single-institution 15-year follow-up. *Clin Cancer Res* 12:6487-6493.

Bujak, M. Frangogiannis, N.G (2009) The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 57:165-176.

Burchill, M.A., Yang, J, Vogtenhuber, C, Blazar, B.R, Farrar, M.A (2007) IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 178:280-290.

Cantin, A.M., North, S.L, Fells, G.A, Hubbard, R.C, Crystal, R.G (1987) Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 79:1665-1673.

Car, B.D., Meloni, F, Luisetti, M, Semenzato, G, Gialdroni-Grassi, G, Walz, A (1994) Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 149:655-659.

Carneseccchi, S., Deffert, C, Donati, Y, Basset, O, Hinz, B, Preynat-Seauve, O, Guichard, C, Arbiser, J.L, Banfi, B, Pache, J, Barazzzone-Argiroffo, C, Krause, K (2011) A key role for NOX4 in epithelial cell death during development of lung fibrosis. *Antioxid Redox Signal* 15:607-619.

Cassel, S.L., Eisenbarth, S.C, Iyer, S.S, Sadler, J.J, Colegio, O.R, Tephly, L.A, Carter, A.B, Rothman, P.B, Flavell, R.A, Sutterwala, F.S (2008) The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9035-9040.

Chandler, D.B., Hyde, D.M Giri, S.N (1983) Morphometric estimates of infiltrative cellular changes during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Am J Pathol* 112:170-177.

Chapman, H.A. (2011) Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. *Annu Rev Physiol* 73:413-435.

Chaudhary, N.I., Schnapp, A Park, J.E (2006) Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am J Respir Crit Care Med* 173:769-776.

Chen, E.S., Greenlee, B.M, Wills-Karp, M Moller, D.R (2001) Attenuation of lung inflammation and fibrosis in interferon-gamma-deficient mice after intratracheal bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24:545-555.

Chen, Z., Laurence, A, Kanno, Y, Pacher-Zavisin, M, Zhu, B, Tato, C, Yoshimura, A, Hennighausen, L O'Shea, J.J (2006) Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8137-8142.

Chiaromonte, M.G., Donaldson, D.D, Cheever, A.W Wynn, T.A (1999) An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J Clin Invest* 104:777-785.

Chiaromonte, M.G., Mentink-Kane, M, Jacobson, B.A, Cheever, A.W, Whitters, M.J, Goad, M.E.P, Wong, A, Collins, M, Donaldson, D.D, Grusby, M.J Wynn, T.A (2003) Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. *J Exp Med* 197:687-701.

Christensen, P.J., Goodman, R.E, Pastoriza, L, Moore, B Toews, G.B (1999) Induction of lung fibrosis in the mouse by intratracheal instillation of fluorescein isothiocyanate is not T-cell-dependent. *Am J Pathol* 155:1773-1779.

Coffman, R.L., Seymour, B.W, Hudak, S, Jackson, J Rennick, D (1989) Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 245:308-310.

Cohen, I.S., Mosher, M.B, O'Keefe, E.J, Klaus, S.N De Conti, R.C (1973) Cutaneous toxicity of bleomycin therapy. *Arch Dermatol* 107:553-555.

Coker, R.K., Laurent, G.J, Shahzeidi, S, Lympany, P.A, du Bois, R.M, Jeffery, P.K McAnulty, R.J (1997) 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* 150:981-991.

Cool, C.D., Groshong, S.D, Rai, P.R, Henson, P.M, Stewart, J.S Brown, K.K (2006) Fibroblast foci are not discrete sites of lung injury or repair: the fibroblast reticulum. *Am J Respir Crit Care Med* 174:654-658.

Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R, Arancibia-Cárcamo, C.V, Hall, J, Sun, C, Belkaid, Y Powrie, F (2007) A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204:1757-1764.

Cortez, D.M., Feldman, M.D, Mummidi, S, Valente, A.J, Steffensen, B, Vincenti, M, Barnes, J.L Chandrasekar, B (2007) IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP-beta, NF-kappaB, and AP-1 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H3356-65.

Corthay, A. (2009) How do regulatory T cells work?. *Scand J Immunol* 70:326-336.

Coughlin, S.R. (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407:258-264.

Couillin, I., Vasseur, V, Charron, S, Gasse, P, Tavernier, M, Guillet, J, Lagente, V, Fick, L, Jacobs, M, Coelho, F.R, Moser, R Ryffel, B (2009) IL-1R1/MyD88 signaling is critical for elastase-induced lung inflammation and emphysema. *J Immunol* 183:8195-8202.

Crapo, J.D. (2003) Oxidative stress as an initiator of cytokine release and cell damage. *Eur Respir J Suppl* 44:4s-6s.

Cua, D.J., Sherlock, J, Chen, Y, Murphy, C.A, Joyce, B, Seymour, B, Lucian, L, To, W, Kwan, S, Churakova, T, Zurawski, S, Wiekowski, M, Lira, S.A, Gorman, D, Kastelein, R.A Sedgwick, J.D (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744-748.

Cucoranu, I., Clempus, R, Dikalova, A, Phelan, P.J, Ariyan, S, Dikalov, S Sorescu, D (2005) NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res* 97:900-907.

Curotto de Lafaille, M.A. Lafaille, J.J (2009) Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or

a division of labor?. *Immunity* 30:626-635.

Curotto de Lafaille, M.A., Kutchukhidze, N, Shen, S, Ding, Y, Yee, H Lafaille, J.J (2008) Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* 29:114-126.

Cutroneo, K.R., White, S.L, Phan, S.H Ehrlich, H.P (2007) Therapies for bleomycin induced lung fibrosis through regulation of TGF-beta1 induced collagen gene expression. *J Cell Physiol* 211:585-589.

D'Armiento, J., Dalal, S.S, Okada, Y, Berg, R.A Chada, K (1992) Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell* 71:955-961.

Dauber, J.H., Wagner, M, Brunsvold, S, Paradis, I.L, Ernst, L.A Waggoner, A (1992) Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in bronchoalveolar lavage fluid: comparison of a two-color technique with a standard immunoperoxidase assay. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:531-541.

Davidson, N.J., Leach, M.W, Fort, M.M, Thompson-Snipes, L, Kühn, R, Müller, W, Berg, D.J Rennick, D.M (1996) T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *J Exp Med* 184:241-251.

Davidson, T.S., DiPaolo, R.J, Andersson, J Shevach, E.M (2007) Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 178:4022-4026.

Davies, H.R., Richeldi, L Walters, E.H (2003) Immunomodulatory agents for idiopathic pulmonary fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* :CD003134.

Davies, M., Robinson, M, Smith, E, Huntley, S, Prime, S Paterson, I (2005) Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways. *J Cell Biochem* 95:918-931.

Davis, G.S., Leslie, K.O Hemenway, D.R (1998) Silicosis in mice: effects of dose, time, and genetic strain. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 17:81-97.

Day, B.J. (2004) Catalytic antioxidants: a radical approach to new therapeutics. *Drug Discov Today* 9:557-566.

Degryse, A.L. Lawson, W.E (2011) Progress toward improving animal models for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Med Sci* 341:444-449.

Del Prete, G.F., De Carli, M, Mastromauro, C, Biagiotti, R, Macchia, D, Falagiani, P, Ricci, M Romagnani, S (1991) Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* 88:346-350.

Demols, A., Van Laethem, J, Quertinmont, E, Degraef, C, Delhaye, M, Geerts, A Deviere, J (2002) Endogenous interleukin-10 modulates fibrosis and regeneration in experimental chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G1105-12.

Derynck, R. Akhurst, R.J (2007) Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol* 9:1000-1004.

Diaz, J.A., Booth, A.J, Lu, G, Wood, S.C, Pinsky, D.J Bishop, D.K (2009) Critical role for IL-6 in hypertrophy and fibrosis in chronic cardiac allograft rejection. *Am J Transplant* 9:1773-1783.

Dimopoulou, I., Bamias, A, Lyberopoulos, P Dimopoulos, M.A (2006) Pulmonary toxicity from novel antineoplastic agents. *Ann Oncol* 17:372-379.

Diveu, C., McGeachy, M.J, Boniface, K, Stumhofer, J.S, Sathe, M, Joyce-Shaikh, B, Chen, Y, Tato, C.M, McClanahan, T.K, de Waal Malefyt, R, Hunter, C.A, Cua, D.J Kastelein, R.A (2009) IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol* 182:5748-5756.

Dobashi, N., Fujita, J, Ohtsuki, Y, Yamadori, I, Yoshinouchi, T, Kamei, T, Tokuda, M, Hojo, S, Okada, H Takahara, J (1998) Detection of anti-cytokeratin 8 antibody in the serum of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis and pulmonary fibrosis associated with collagen vascular disorders. *Thorax* 53:969-974.

Docherty, N.G., O'Sullivan, O.E, Healy, D.A, Murphy, M, O'Neill, A.J, Fitzpatrick, J.M Watson, R.W.G (2006) TGF-beta1-induced EMT can occur independently of its proapoptotic effects and is aided by EGF receptor activation. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F1202-12.

Donaldson, D.D., Whitters, M.J, Fitz, L.J, Neben, T.Y, Finnerty, H, Henderson, S.L, O'Hara, R.M.J, Beier, D.R, Turner, K.J, Wood, C.R Collins, M (1998) The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1. *J Immunol* 161:2317-2324.

Dorr, R.T., Alberts, D.S Chen, H.S (1980) Experimental model of doxorubicin extravasation in the mouse. *J Pharmacol Methods* 4:237-250.

Dostert, C., Pétrilli, V, Van Bruggen, R, Steele, C, Mossman, B.T Tschopp, J (2008) Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320:674-677.

Duffield, J.S., Forbes, S.J, Constandinou, C.M, Clay, S, Partolina, M, Vuthoori, S, Wu, S, Lang, R Iredale, J.P (2005) Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 115:56-65.

Eisenbeis, C.F., Winn, D, Poelman, S, Polsky, C.V, Rubenstein, J.H Olopade, O.I (2001) A case of pulmonary toxicity associated with G-CSF and doxorubicin administration. *Ann Hematol* 80:121-123.

Emura, M., Nagai, S, Takeuchi, M, Kitaichi, M Izumi, T (1990) In vitro production of B cell growth factor and B cell differentiation factor by peripheral blood mononuclear cells and bronchoalveolar lavage T lymphocytes from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 82:133-139.

Esmon, C.T. (2005) The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol* 131:417-430.

Esparza-Lopez, J., Montiel, J.L, Vilchis-Landeros, M.M, Okadome, T, Miyazono, K López-Casillas, F (2001) Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J Biol Chem* 276:14588-14596.

Estes, J.D., Wietgreffe, S, Schacker, T, Southern, P, Beilman, G, Reilly, C, Milush, J.M, Lifson, J.D, Sodora, D.L, Carlis, J.V Haase, A.T (2007) Simian immunodeficiency virus-induced lymphatic tissue fibrosis is mediated by transforming growth factor beta 1-positive regulatory T cells and begins in early infection. *J Infect Dis* 195:551-561.

Everett, T.H.4. Olgin, J.E (2007) Atrial fibrosis and the mechanisms of atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 4:S24-7.

Fan, J.M., Huang, X.R, Ng, Y.Y, Nikolic-Paterson, D.J, Mu, W, Atkins, R.C Lan, H.Y (2001) Interleukin-1 induces tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation through a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism in vitro. *Am J Kidney Dis* 37:820-831.

Fan, L., Benson, H.L, Vittal, R, Mickler, E.A, Presson, R, Fisher, A.J, Cummings, O.W, Heidler, K.M, Keller, M.R, Burlingham, W.J Wilkes, D.S (2011) Neutralizing IL-17 prevents obliterative bronchiolitis in murine orthotopic lung transplantation. *Am J Transplant* 11:911-922.

Fattman, C.L., Chang, L, Termin, T.A, Petersen, L, Enghild, J.J Oury, T.D (2003) Enhanced bleomycin-induced pulmonary damage in mice lacking extracellular superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 35:763-771.

Faulkner, H., Renauld, J.C, Van Snick, J Grecnis, R.K (1998) Interleukin-9 enhances resistance to the intestinal nematode *Trichuris muris*. *Infect Immun* 66:3832-3840.

Faust, S.M., Lu, G, Marini, B.L, Zou, W, Gordon, D, Iwakura, Y, Laouar, Y Bishop, D.K (2009) Role of T cell TGFbeta signaling and IL-17 in allograft acceptance and fibrosis associated with chronic rejection. *J Immunol* 183:7297-7306.

Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L.J, Rosen, H McHeyzer-Williams, M.G (2009) The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat Immunol* 10:375-384.

Feghali-Bostwick, C.A., Tsai, C.G, Valentine, V.G, Kantrow, S, Stoner, M.W, Pilewski, J.M, Gadgil, A, George, M.P, Gibson, K.F, Choi, A.M.K, Kaminski, N, Zhang, Y Duncan, S.R (2007) Cellular and humoral autoreactivity in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol* 179:2592-2599.

Felton, V.M., Borok, Z Willis, B.C (2009) N-acetylcysteine inhibits alveolar epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297:L805-12.

Feng, W., Li, W, Liu, W, Wang, F, Li, Y Yan, W (2009) IL-17 induces myocardial fibrosis and enhances RANKL/OPG and MMP/TIMP signaling in isoproterenol-induced heart failure. *Exp Mol Pathol* 87:212-218.

Ferber, I.A., Brocke, S, Taylor-Edwards, C, Ridgway, W, Dinisco, C, Steinman, L, Dalton, D Fathman, C.G

(1996) Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 156:5-7.

Ferretti, S., Bonneau, O, Dubois, G.R, Jones, C.E Trifilieff, A (2003) IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol* 170:2106-2112.

Fichtner-Feigl, S., Strober, W, Kawakami, K, Puri, R.K Kitani, A (2006) IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med* 12:99-106.

Fontana, L., Chen, Y, Prijatelj, P, Sakai, T, Fässler, R, Sakai, L.Y Rifkin, D.B (2005) Fibronectin is required for integrin alphavbeta6-mediated activation of latent TGF-beta complexes containing LTBP-1. *FASEB J* 19:1798-1808.

Fontenot, J.D., Gavin, M.A Rudensky, A.Y (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.

Franchi, L., Eigenbrod, T Núñez, G (2009) Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol* 183:792-796.

Franko, A.J., Sharplin, J, Ward, W.F Taylor, J.M (1996) Evidence for two patterns of inheritance of sensitivity to induction of lung fibrosis in mice by radiation, one of which involves two genes. *Radiat Res* 146:68-74.

Friedberg, J.W., Neuberger, D, Kim, H, Miyata, S, McCauley, M, Fisher, D.C, Takvorian, T Canellos, G.P (2003) Gemcitabine added to doxorubicin, bleomycin, and vinblastine for the treatment of de novo Hodgkin disease: unacceptable acute pulmonary toxicity. *Cancer* 98:978-982.

Fugmann, T., Hausser, A, Schöffler, P, Schmid, S, Pfizenmaier, K Olayioye, M.A (2007) Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. *J Cell Biol* 178:15-22.

Fujita, J., Dobashi, N, Ohtsuki, Y, Yamadori, I, Yoshinouchi, T, Kamei, T, Tokuda, M, Hojo, S, Okada, H Takahara, J (1999) Elevation of anti-cytokeratin 19 antibody in sera of the patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary fibrosis associated with collagen vascular disorders. *Lung* 177:311-319.

Furuie, H., Yamasaki, H, Suga, M Ando, M (1997) Altered accessory cell function of alveolar macrophages: a possible mechanism for induction of Th2 secretory profile in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 10:787-794.

Fuschiotti, P. (2011) Role of IL-13 in systemic sclerosis. *Cytokine* 56:544-549.

Gasse, P., Mary, C, Guenon, I, Noulin, N, Charron, S, Schnyder-Candrian, S, Schnyder, B, Akira, S, Quesniaux, V.F.J, Lagente, V, Ryffel, B Couillin, I (2007) IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 117:3786-3799.

Gasse, P., Riteau, N, Vacher, R, Michel, M, Fautrel, A, di Padova, F, Fick, L, Charron, S, Lagente, V, Eberl, G, Le Bert, M, Quesniaux, V.F.J, Huaux, F, Leite-de-Moraes, M, Ryffel, B Couillin, I (2011) IL-1 and IL-23 mediate early IL-17A production in pulmonary inflammation leading to late fibrosis. *PLoS One* 6:e23185.

Gharaee-Kermani, M., Hatano, K, Nozaki, Y Phan, S.H (2005) Gender-based differences in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 166:1593-1606.

Gilbert, H.S. (1984) Myelofibrosis revisited: characterization and classification of myelofibrosis in the setting of myeloproliferative disease. *Prog Clin Biol Res* 154:3-17.

Gilmore, T.D. (2006) Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25:6680-6684.

Giri, S.N., Hyde, D.M Hollinger, M.A (1993) Effect of antibody to transforming growth factor beta on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. *Thorax* 48:959-966.

Giri, S.N., Hyde, D.M Marafino, B.J.J (1986) Ameliorating effect of murine interferon gamma on bleomycin-induced lung collagen fibrosis in mice. *Biochem Med Metab Biol* 36:194-197.

Goldstein, R.H., Lucey, E.C, Franzblau, C Snider, G.L (1979) Failure of mechanical properties to parallel changes in lung connective tissue composition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Am Rev Respir Dis* 120:67-73.

Golec, M., Lambers, C, Hofbauer, E, Geleff, S, Bankier, A, Czerny, M Ziesche, R (2008) Assessment of gene

transcription demonstrates connection with the clinical course of idiopathic interstitial pneumonia. *Respiration* 76:261-269.

Gollasch, M., Bychkov, R, Ried, C, Behrendt, F, Scholze, S, Luft, F.C Haller, H (1995) Pinacidil relaxes porcine and human coronary arteries by activating ATP-dependent potassium channels in smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 275:681-692.

Gong, Y., Wang, X, Wang, J, Yang, Z, Li, S, Yang, J, Liu, L, Lei, X Shao, F (2010) Chemical probing reveals insights into the signaling mechanism of inflammasome activation. *Cell Res* 20:1289-1305.

Gordon, S. Martinez, F.O (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32:593-604.

Gordon, S. Taylor, P.R (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5:953-964.

Gorelik, L. Flavell, R.A (2002) Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2:46-53.

Gorelik, L., Constant, S Flavell, R.A (2002) Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med* 195:1499-1505.

Gorelik, L., Fields, P.E Flavell, R.A (2000) Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol* 165:4773-4777.

Gran, B., Zhang, G, Yu, S, Li, J, Chen, X, Ventura, E.S, Kamoun, M Rostami, A (2002) IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol* 169:7104-7110.

Granero, F., Revert, F, Revert-Ros, F, Lainez, S, Martínez-Martínez, P Saus, J (2005) A human-specific TNF-responsive promoter for Goodpasture antigen-binding protein. *FEBS J* 272:5291-5305.

Griendling, K.K. (2006) NADPH oxidases: new regulators of old functions. *Antioxid Redox Signal* 8:1443-1445.

Griffith, B., Pendyala, S, Hecker, L, Lee, P.J, Natarajan, V Thannickal, V.J (2009) NOX enzymes and pulmonary disease. *Antioxid Redox Signal* 11:2505-2516.

Gu, Y., Yang, J, Ouyang, X, Liu, W, Li, H, Yang, J, Bromberg, J, Chen, S, Mayer, L, Unkeless, J.C Xiong, H (2008) Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells. *Eur J Immunol* 38:1807-1813.

Gurujeyalakshmi, G. Giri, S.N (1995) Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: downregulation of TGF-beta and procollagen I and III gene expression. *Exp Lung Res* 21:791-808.

Haase, M.G., Klawitter, A, Geyer, P Baretton, G.B (2007) Expression of the immunomodulator IL-10 in type I pneumocytes of the rat: alterations of IL-10 expression in radiation-induced lung damage. *J Histochem Cytochem* 55:1167-1172.

Hagiwara, S.I., Ishii, Y Kitamura, S (2000) Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 162:225-231.

Hällgren, R., Bjermer, L, Lundgren, R Venge, P (1989) The eosinophil component of the alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis. Signs of eosinophil activation in the lung are related to impaired lung function. *Am Rev Respir Dis* 139:373-377.

Han, G., Zhang, H, Xie, C.H Zhou, Y.F (2011) Th2-like immune response in radiation-induced lung fibrosis. *Oncol Rep* 26:383-388.

Hanada, K., Kumagai, K, Yasuda, S, Miura, Y, Kawano, M, Fukasawa, M Nishijima, M (2003) Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426:803-809.

Hancock, A., Armstrong, L, Gama, R Millar, A (1998) Production of interleukin 13 by alveolar macrophages from normal and fibrotic lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:60-65.

Hansen, G., McIntire, J.J, Yeung, V.P, Berry, G, Thorbecke, G.J, Chen, L, DeKruyff, R.H Umetsu, D.T (2000) CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Clin Invest* 105:61-70.

Harder, J., Franchi, L, Muñoz-Planillo, R, Park, J, Reimer, T Núñez, G (2009) Activation of the Nlrp3 inflammasome by *Streptococcus pyogenes* requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor. *J Immunol* 183:5823-5829.

Harrington, L.E., Hatton, R.D, Mangan, P.R, Turner, H, Murphy, T.L, Murphy, K.M Weaver, C.T (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123-1132.

Hasegawa, M., Fujimoto, M, Kikuchi, K Takehara, K (1997) Elevated serum tumor necrosis factor-alpha levels in patients with systemic sclerosis: association with pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 24:663-665.

Hashimoto, N., Phan, S.H, Imaizumi, K, Matsuo, M, Nakashima, H, Kawabe, T, Shimokata, K Hasegawa, Y (2010) Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43:161-172.

Haston, C.K. Travis, E.L (1997) Murine susceptibility to radiation-induced pulmonary fibrosis is influenced by a genetic factor implicated in susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Cancer Res* 57:5286-5291.

Haynes, N.M., Allen, C.D.C, Lesley, R, Ansel, K.M, Killeen, N Cyster, J.G (2007) Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol* 179:5099-5108.

Hecker, L., Vittal, R, Jones, T, Jagirdar, R, Luckhardt, T.R, Horowitz, J.C, Pennathur, S, Martinez, F.J Thannickal, V.J (2009) NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med* 15:1077-1081.

Heldin, C.H., Miyazono, K ten Dijke, P (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471.

Heller, F., Fuss, I.J, Nieuwenhuis, E.E, Blumberg, R.S Strober, W (2002) Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 17:629-638.

Herbert, D.R., Hölscher, C, Mohrs, M, Arendse, B, Schwegmann, A, Radwanska, M, Leeto, M, Kirsch, R, Hall, P, Mossmann, H, Claussen, B, Förster, I Brombacher, F (2004) Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20:623-635.

Herzog, E.L. Bucala, R (2010) Fibrocytes in health and disease. *Exp Hematol* 38:548-556.

Hesse, M., Modolell, M, La Flamme, A.C, Schito, M, Fuentes, J.M, Cheever, A.W, Pearce, E.J Wynn, T.A (2001) Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol* 167:6533-6544.

Hesse, M., Piccirillo, C.A, Belkaid, Y, Prufer, J, Mentink-Kane, M, Leusink, M, Cheever, A.W, Shevach, E.M Wynn, T.A (2004) The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol* 172:3157-3166.

Hiwatari, N., Shimura, S, Sasaki, T, Aikawa, T, Ando, Y, Ishihara, H, Sekizawa, K, Sasaki, H Takishima, T (1991) Prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis in patients with mucous hypersecretion. *Am Rev Respir Dis* 143:182-185.

Ho, I.C., Hodge, M.R, Rooney, J.W Glimcher, L.H (1996) The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 85:973-983.

Hoffmann, K.F., Cheever, A.W Wynn, T.A (2000) IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol* 164:6406-6416.

Hoffmann, K.F., McCarty, T.C, Segal, D.H, Chiamonte, M, Hesse, M, Davis, E.M, Cheever, A.W, Meltzer, P.S, Morse, H.C.3 Wynn, T.A (2001) Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions. *FASEB J* 15:2545-2547.

Holsti, M.A., Chitnis, T, Panzo, R.J, Bronson, R.T, Yagita, H, Sayegh, M.H Tzianabos, A.O (2004) Regulation of postsurgical fibrosis by the programmed death-1 inhibitory pathway. *J Immunol* 172:5774-5781.

Hori, S., Nomura, T Sakaguchi, S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor

Foxp3. *Science* 299:1057-1061.

Hornung, V., Bauernfeind, F, Halle, A, Samstad, E.O, Kono, H, Rock, K.L, Fitzgerald, K.A Latz, E (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9:847-856.

Hoshino, T., Nakamura, H, Okamoto, M, Kato, S, Araya, S, Nomiyama, K, Oizumi, K, Young, H.A, Aizawa, H Yodoi, J (2003) Redox-active protein thioredoxin prevents proinflammatory cytokine- or bleomycin-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 168:1075-1083.

Hsieh, C.S., Macatonia, S.E, Tripp, C.S, Wolf, S.F, O'Garra, A Murphy, K.M (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260:547-549.

Hu, H.Z., Li, G.L, Lim, Y.K, Chan, S.H Yap, E.H (1999) Kinetics of interferon-gamma secretion and its regulatory factors in the early phase of acute graft-versus-host disease. *Immunology* 98:379-385.

Hubbard, R., Johnston, I Britton, J (1998) Survival in patients with cryptogenic fibrosing alveolitis: a population-based cohort study. *Chest* 113:396-400.

Humbles, A.A., Lloyd, C.M, McMillan, S.J, Friend, D.S, Xanthou, G, McKenna, E.E, Ghiran, S, Gerard, N.P, Yu, C, Orkin, S.H Gerard, C (2004) A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science* 305:1776-1779.

Hunninghake, G.W., Gadek, J.E, Lawley, T.J Crystal, R.G (1981) Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 68:259-269.

Hutloff, A., Büchner, K, Reiter, K, Baelde, H.J, Odendahl, M, Jacobi, A, Dörner, T Kroczeck, R.A (2004) Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50:3211-3220.

Injac, R. Strukelj, B (2008) Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. *Technol Cancer Res Treat* 7:497-516.

Ivanov, I.I., McKenzie, B.S, Zhou, L, Tadokoro, C.E, Lepelley, A, Lafaille, J.J, Cua, D.J Littman, D.R (2006) The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121-1133.

Iwano, M., Plieth, D, Danoff, T.M, Xue, C, Okada, H Neilson, E.G (2002) Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110:341-350.

Izbicki, G., Segel, M.J, Christensen, T.G, Conner, M.W Breuer, R (2002) Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* 83:111-119.

Jakubzick, C., Choi, E.S, Joshi, B.H, Keane, M.P, Kunkel, S.L, Puri, R.K Hogaboam, C.M (2003) Therapeutic attenuation of pulmonary fibrosis via targeting of IL-4- and IL-13-responsive cells. *J Immunol* 171:2684-2693.

Janick-Buckner, D., Ranges, G.E Hacker, M.P (1989a) Effect of cytotoxic monoclonal antibody depletion of T-lymphocyte subpopulations on bleomycin-induced lung damage in C57BL/6J mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 100:474-484.

Janick-Buckner, D., Ranges, G.E Hacker, M.P (1989b) Alteration of bronchoalveolar lavage cell populations following bleomycin treatment in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 100:465-473.

Janssen, Y.M., Van Houten, B, Borm, P.J Mossman, B.T (1993) Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 69:261-274.

Jeong, W., Park, O Gao, B (2008) Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology* 134:248-258.

Jindal, S.K. Agarwal, R (2005) Autoimmunity and interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 11:438-446.

Johnston, C.J., Williams, J.P, Okunieff, P Finkelstein, J.N (2002) Radiation-induced pulmonary fibrosis: examination of chemokine and chemokine receptor families. *Radiat Res* 157:256-265.

Johnston, C.J., Wright, T.W, Rubin, P Finkelstein, J.N (1998) Alterations in the expression of chemokine mRNA levels in fibrosis-resistant and -sensitive mice after thoracic irradiation. *Exp Lung Res* 24:321-337.

Johnston, R.J., Poholek, A.C, DiToro, D, Yusuf, I, Eto, D, Barnett, B, Dent, A.L, Craft, J Crotty, S (2009) Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 325:1006-1010.

Jones, L.K., O'Sullivan, K.M, Semple, T, Kuligowski, M.P, Fukami, K, Ma, F.Y, Nikolic-Paterson, D.J, Holdsworth, S.R Kitching, A.R (2009) IL-1RI deficiency ameliorates early experimental renal interstitial fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 24:3024-3032.

Jordan, M.S., Boesteanu, A, Reed, A.J, Petrone, A.L, Holenbeck, A.E, Lerman, M.A, Najj, A Caton, A.J (2001) Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2:301-306.

Josefowicz, S.Z. Rudensky, A (2009) Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 30:616-625.

Julicher, R.H., Sterrenberg, L, Haenen, G.R, Bast, A Noordhoek, J (1988) The effect of chronic adriamycin treatment on heart kidney and liver tissue of male and female rat. *Arch Toxicol* 61:275-281.

Kaartinen, V., Voncken, J.W, Shuler, C, Warburton, D, Bu, D, Heisterkamp, N Groffen, J (1995) Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 11:415-421.

Kalluri, R. Neilson, E.G (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112:1776-1784.

Kalluri, R., Melendez, E, Rumpf, K.W, Sattler, K, Müller, G.A, Strutz, F Neilson, E.G (1996) Specificity of circulating and tissue-bound autoantibodies in Goodpasture syndrome. *Proc Assoc Am Physicians* 108:134-139.

Kalluri, R., Wilson, C.B, Weber, M, Gunwar, S, Chonko, A.M, Neilson, E.G Hudson, B.G (1995) Identification of the alpha 3 chain of type IV collagen as the common autoantigen in antibasement membrane disease and Goodpasture syndrome. *J Am Soc Nephrol* 6:1178-1185.

Karpel, J.P., Aldrich, T.K, Mitsudo, S Norin, A.J (1989) Lung lymphocytes in bleomycin-induced pulmonary disease. *Lung* 167:163-172.

Katzenstein, A.L. Myers, J.L (1998) Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 157:1301-1315.

Kaviratne, M., Hesse, M, Leusink, M, Cheever, A.W, Davies, S.J, McKerrow, J.H, Wakefield, L.M, Letterio, J.J Wynn, T.A (2004) IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *J Immunol* 173:4020-4029.

Keane, M.P., Belperio, J.A, Burdick, M.D Strieter, R.M (2001) IL-12 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:L92-7.

Keane, M.P., Gomperts, B.N, Weigt, S, Xue, Y.Y, Burdick, M.D, Nakamura, H, Zisman, D.A, Ardehali, A, Saggari, R, Lynch, J.P.3, Hogaboam, C, Kunkel, S.L, Lukacs, N.W, Ross, D.J, Grusby, M.J, Strieter, R.M Belperio, J.A (2007) IL-13 is pivotal in the fibro-obliterative process of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Immunol* 178:511-519.

Kehrer, J.P., Lee, Y.C Smith, R.D (1986) Effect of intratracheally administered anticancer drugs on lung hydroxyproline content. *Toxicol Lett* 30:63-70.

Khalil, N., Corne, S, Whitman, C Yacyszyn, H (1996a) Plasmin regulates the activation of cell-associated latent TGF-beta 1 secreted by rat alveolar macrophages after in vivo bleomycin injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15:252-259.

Khalil, N., O'Connor, R.N, Flanders, K.C Unruh, H (1996b) TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14:131-138.

Khattari, R., Cox, T, Yasayko, S Ramsdell, F (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4:337-342.

Kieszko, R., Krawczyk, P, Michnar, M, Chocholska, S Milanowski, J (2004) The yield of endobronchial biopsy in pulmonary sarcoidosis: connection between spirometric impairment and lymphocyte subpopulations in bronchoalveolar lavage fluid. *Respiration* 71:72-76.

- Kim, E.Y., Battaile, J.T, Patel, A.C, You, Y, Agapov, E, Grayson, M.H, Benoit, L.A, Byers, D.E, Alevy, Y, Tucker, J, Swanson, S, Tidwell, R, Tyner, J.W, Morton, J.D, Castro, M, Polineni, D, Patterson, G.A, Schwendener, R.A, Allard, J.D, Peltz, G, Holtzman, M.J (2008) Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nat Med* 14:633-640.
- Kim, H. Leonard, W.J (2007) CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J Exp Med* 204:1543-1551.
- Kim, J.H., Kim, H.Y, Kim, S, Chung, J, Park, W.S Chung, D.H (2005) Natural killer T (NKT) cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis by producing interferon-gamma. *Am J Pathol* 167:1231-1241.
- Kim, K.K., Kugler, M.C, Wolters, P.J, Robillard, L, Galvez, M.G, Brumwell, A.N, Sheppard, D Chapman, H.A (2006) Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13180-13185.
- Kim, K.K., Wei, Y, Szekeres, C, Kugler, M.C, Wolters, P.J, Hill, M.L, Frank, J.A, Brumwell, A.N, Wheeler, S.E, Kreidberg, J.A Chapman, H.A (2009a) Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 119:213-224.
- Kim, Y., Kugler, M.C, Wei, Y, Kim, K.K, Li, X, Brumwell, A.N Chapman, H.A (2009b) Integrin alpha3beta1-dependent beta-catenin phosphorylation links epithelial Smad signaling to cell contacts. *J Cell Biol* 184:309-322.
- Kinder, B.W., Brown, K.K, Schwarz, M.I, Ix, J.H, Kervitsky, A King, T.E.J (2008) Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 133:226-232.
- King, C., Tangye, S.G Mackay, C.R (2008) T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol* 26:741-766.
- King, T.E.J., Albera, C, Bradford, W.Z, Costabel, U, Hormel, P, Lancaster, L, Noble, P.W, Sahn, S.A, Szwarcberg, J, Thomeer, M, Valeyre, D, du Bois, R.M (2009) Effect of interferon gamma-1b on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (INSPIRE): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 374:222-228.
- Kinnula, V.L. Crapo, J.D (2003) Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 167:1600-1619.
- Kinnula, V.L., Fattman, C.L, Tan, R.J Oury, T.D (2005) Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 172:417-422.
- Kirkbride, K.C., Townsend, T.A, Bruinsma, M.W, Barnett, J.V Blobe, G.C (2008) Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *J Biol Chem* 283:7628-7637.
- Kitani, A., Fuss, I, Nakamura, K, Kumaki, F, Usui, T Strober, W (2003) Transforming growth factor (TGF)-beta1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF-beta1-mediated fibrosis. *J Exp Med* 198:1179-1188.
- Kluth, D.C. Rees, A.J (1999) Anti-glomerular basement membrane disease. *J Am Soc Nephrol* 10:2446-2453.
- Knekt, P., Kumpulainen, J, Järvinen, R, Rissanen, H, Heliövaara, M, Reunanen, A, Hakulinen, T Aromaa, A (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 76:560-568.
- Kolb, M., Margetts, P.J, Anthony, D.C, Pitossi, F Gauldie, J (2001) Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 107:1529-1536.
- Kolodsick, J.E., Toews, G.B, Jakubzick, C, Hogaboam, C, Moore, T.A, McKenzie, A, Wilke, C.A, Chrisman, C.J Moore, B.B (2004) Protection from fluorescein isothiocyanate-induced fibrosis in IL-13-deficient, but not IL-4-deficient, mice results from impaired collagen synthesis by fibroblasts. *J Immunol* 172:4068-4076.
- Komura, K., Yanaba, K, Horikawa, M, Ogawa, F, Fujimoto, M, Tedder, T.F Sato, S (2008) CD19 regulates the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in a mouse model. *Arthritis Rheum* 58:3574-3584.
- Kopf, M., Le Gros, G, Bachmann, M, Lamers, M.C, Bluethmann, H Köhler, G (1993) Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362:245-248.
- Korfhagen, T.R., Swantz, R.J, Wert, S.E, McCarty, J.M, Kerlakian, C.B, Glasser, S.W Whitsett, J.A (1994) Respiratory epithelial cell expression of human transforming growth factor-alpha induces lung fibrosis in transgenic mice. *J Clin Invest* 93:1691-1699.

- Korn, T., Bettelli, E, Gao, W, Awasthi, A, Jäger, A, Strom, T.B, Oukka, M, Kuchroo, V.K (2007) IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448:484-487.
- Korn, T., Bettelli, E, Oukka, M, Kuchroo, V.K (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27:485-517.
- Kotsianidis, I., Nakou, E, Bouchliou, I, Tzouvelekis, A, Spanoudakis, E, Steiropoulos, P, Sotiriou, I, Aidinis, V, Margaritis, D, Tsatalas, C, Bouros, D (2009) Global impairment of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179:1121-1130.
- Kradin, R.L., Sakamoto, H, Jain, F, Zhao, L, Hymowitz, G, Pfeffer, F (2004) IL-10 inhibits inflammation but does not affect fibrosis in the pulmonary response to bleomycin. *Exp Mol Pathol* 76:205-211.
- Kretschmer, K., Apostolou, I, Hawiger, D, Khazaie, K, Nussenzweig, M.C von Boehmer, H (2005) Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 6:1219-1227.
- Kumar, R.K. (1984) Separation and characterization of lymphocytes from rat lung parenchyma. *Exp Lung Res* 7:113-122.
- Kumar, R.K., Herbert, C, Yang, M, Koskinen, A.M.L, McKenzie, A.N.J Foster, P.S (2002) Role of interleukin-13 in eosinophil accumulation and airway remodelling in a mouse model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy* 32:1104-1111.
- Kuperman, D.A., Huang, X, Koth, L.L, Chang, G.H, Dolganov, G.M, Zhu, Z, Elias, J.A, Sheppard, D, Erle, D.J (2002) Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med* 8:885-889.
- Kurasawa, K., Hirose, K, Sano, H, Endo, H, Shinkai, H, Nawata, Y, Takabayashi, K, Iwamoto, I (2000) Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 43:2455-2463.
- Laan, M., Cui, Z.H, Hoshino, H, Lötval, J, Sjöstrand, M, Gruenert, D.C, Skoogh, B.E, Lindén, A (1999) Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* 162:2347-2352.
- Lakatos, H.F., Burgess, H.A, Thatcher, T.H, Redonnet, M.R, Hernady, E, Williams, J.P, Sime, P.J (2006) Oropharyngeal aspiration of a silica suspension produces a superior model of silicosis in the mouse when compared to intratracheal instillation. *Exp Lung Res* 32:181-199.
- Lakos, G., Melichian, D, Wu, M, Varga, J (2006) Increased bleomycin-induced skin fibrosis in mice lacking the Th1-specific transcription factor T-bet. *Pathobiology* 73:224-237.
- Lamkanfi, M., Mueller, J.L, Vitari, A.C, Misaghi, S, Fedorova, A, Deshayes, K, Lee, W.P, Hoffman, H.M, Dixit, V.M (2009) Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol* 187:61-70.
- Lan, H.Y. (2011) Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci* 7:1056-1067.
- Lanone, S., Zheng, T, Zhu, Z, Liu, W, Lee, C.G, Ma, B, Chen, Q, Homer, R.J, Wang, J, Rabach, L.A, Rabach, M.E, Shipley, J.M, Shapiro, S.D, Senior, R.M, Elias, J.A (2002) Overlapping and enzyme-specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and -12 in IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Clin Invest* 110:463-474.
- Larché, M., Akdis, C.A, Valenta, R (2006) Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6:761-771.
- Lardot, C.G., Huaux, F.A, Broeckaert, F.R, Declerck, P.J, Delos, M, Fubini, B, Lison, D.F (1998) Role of urokinase in the fibrogenic response of the lung to mineral particles. *Am J Respir Crit Care Med* 157:617-628.
- Lawson, W.E., Polosukhin, V.V, Stathopoulos, G.T, Zoia, O, Han, W, Lane, K.B, Li, B, Donnelly, E.F, Holburn, G.E, Lewis, K.G, Collins, R.D, Hull, W.M, Glasser, S.W, Whitsett, J.A, Blackwell, T.S (2005) Increased and prolonged pulmonary fibrosis in surfactant protein C-deficient mice following intratracheal bleomycin. *Am J Pathol* 167:1267-1277.
- Lee, C.G., Homer, R.J, Cohn, L, Link, H, Jung, S, Craft, J.E, Graham, B.S, Johnson, T.R, Elias, J.A (2002) Transgenic overexpression of interleukin (IL)-10 in the lung causes mucus metaplasia, tissue inflammation, and airway remodeling via IL-13-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 277:35466-35474.
- Lee, C.G., Homer, R.J, Zhu, Z, Lanone, S, Wang, X, Kotliansky, V, Shipley, J.M, Gotwals, P, Noble, P, Chen, Q, Senior, R.M, Elias, J.A (2001a) Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med* 194:809-821.

Lee, J.H., Kaminski, N, Dolganov, G, Grunig, G, Koth, L, Solomon, C, Erle, D.J Sheppard, D (2001b) Interleukin-13 induces dramatically different transcriptional programs in three human airway cell types. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:474-485.

Lee, M.S. Kim, Y (2007) Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem* 76:447-480.

Lee, Y.K., Mukasa, R, Hatton, R.D Weaver, C.T (2009) Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol* 21:274-280.

Lemmon, M.A. Ferguson, K.M (2001) Molecular determinants in pleckstrin homology domains that allow specific recognition of phosphoinositides. *Biochem Soc Trans* 29:377-384.

Lemmon, M.A., Ferguson, K.M Abrams, C.S (2002) Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Lett* 513:71-76.

Letterio, J.J. Roberts, A.B (1996) Transforming growth factor-beta1-deficient mice: identification of isoform-specific activities in vivo. *J Leukoc Biol* 59:769-774.

Leung, B.P., McInnes, I.B, Esfandiari, E, Wei, X.Q Liew, F.Y (2000) Combined effects of IL-12 and IL-18 on the induction of collagen-induced arthritis. *J Immunol* 164:6495-6502.

Levi-Schaffer, F., Garbuzenko, E, Rubin, A, Reich, R, Pickholz, D, Gillery, P, Emonard, H, Nagler, A Maquart, F.A (1999) Human eosinophils regulate human lung- and skin-derived fibroblast properties in vitro: a role for transforming growth factor beta (TGF-beta). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9660-9665.

Levick, S.P., McLarty, J.L, Murray, D.B, Freeman, R.M, Carver, W.E Brower, G.L (2009) Cardiac mast cells mediate left ventricular fibrosis in the hypertensive rat heart. *Hypertension* 53:1041-1047.

Li, Y., Jiang, D, Liang, J, Meltzer, E.B, Gray, A, Miura, R, Wogensen, L, Yamaguchi, Y Noble, P.W (2011) Severe lung fibrosis requires an invasive fibroblast phenotype regulated by hyaluronan and CD44. *J Exp Med* 208:1459-1471.

Lim, H.W. Kim, C.H (2007) Loss of IL-7 receptor alpha on CD4+ T cells defines terminally differentiated B cell-helping effector T cells in a B cell-rich lymphoid tissue. *J Immunol* 179:7448-7456.

Lin, H.Y. Moustakas, A (1994) TGF-beta receptors: structure and function. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 40:337-349.

Lio, C.J. Hsieh, C (2008) A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28:100-111.

Liu, F., Liu, J, Weng, D, Chen, Y, Song, L, He, Q Chen, J (2010) CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells depletion may attenuate the development of silica-induced lung fibrosis in mice. *PLoS One* 5:e15404.

Liu, Y., Meyer, C, Müller, A, Herweck, F, Li, Q, Müllenbach, R, Mertens, P.R, Dooley, S Weng, H (2011) IL-13 induces connective tissue growth factor in rat hepatic stellate cells via TGF- β -independent Smad signaling. *J Immunol* 187:2814-2823.

Lockhart, E., Green, A.M Flynn, J.L (2006) IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 177:4662-4669.

Longphre, M., Li, D, Gallup, M, Drori, E, Ordoñez, C.L, Redman, T, Wenzel, S, Bice, D.E, Fahy, J.V Basbaum, C (1999) Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 104:1375-1382.

López-Casillas, F., Wrana, J.L Massagué, J (1993) Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 73:1435-1444.

Louis, H., Van Laethem, J.L, Wu, W, Quertinmont, E, Degraef, C, Van den Berg, K, Demols, A, Goldman, M, Le Moine, O, Geerts, A Devière, J (1998) Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 28:1607-1615.

Lown, J.W. Sim, S.K (1977) The mechanism of the bleomycin-induced cleavage of DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 77:1150-1157.

Lubberts, E., Koenders, M.I, Oppers-Walgreen, B, van den Bersselaar, L, Coenen-de Roo, C.J.J, Joosten, L.A.B van den Berg, W.B (2004) Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of

collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 50:650-659.

Luzina, I.G., Todd, N.W., Iacono, A.T., Atamas, S.P. (2008) Roles of T lymphocytes in pulmonary fibrosis. *J Leukoc Biol* 83:237-244.

Ma, L., Yang, H., Gaspert, A., Carlesso, G., Barty, M.M., Davidson, J.M., Sheppard, D., Fogo, A.B. (2003) Transforming growth factor-beta-dependent and -independent pathways of induction of tubulointerstitial fibrosis in beta6(-/-) mice. *Am J Pathol* 163:1261-1273.

Macann, A., Bredenfeld, H., Müller, R., Diehl, V., Engert, A., Eich, H.T. (2008) Radiotherapy does not influence the severe pulmonary toxicity observed with the administration of gemcitabine and bleomycin in patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma treated with the BAGCOPP regimen: a report by the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 70:161-165.

Maeyama, T., Kuwano, K., Kawasaki, M., Kunitake, R., Hagimoto, N., Hara, N. (2001) Attenuation of bleomycin-induced pneumopathy in mice by monoclonal antibody to interleukin-12. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L1128-37.

Manali, E.D., Moschos, C., Triantafyllidou, C., Kotanidou, A., Psallidas, I., Karabela, S.P., Roussos, C., Papisiris, S., Armaganidis, A., Stathopoulos, G.T., Maniatis, N.A. (2011) Static and dynamic mechanics of the murine lung after intratracheal bleomycin. *BMC Pulm Med* 11:33.

Manel, N., Unutmaz, D., Littman, D.R. (2008) The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol* 9:641-649.

Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., Weaver, C.T. (2006) Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441:231-234.

Manoury-Schwartz, B., Chiochia, G., Bessis, N., Abehsira-Amar, O., Batteux, F., Muller, S., Huang, S., Boissier, M.C., Fournier, C. (1997) High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J Immunol* 158:5501-5506.

Manoury, B., Nenan, S., Guenon, I., Boichot, E., Planquois, J., Bertrand, C.P., Lagente, V. (2006) Macrophage metalloelastase (MMP-12) deficiency does not alter bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Inflamm (Lond)* 3:2.

Marchal-Sommé, J., Uzunhan, Y., Marchand-Adam, S., Valeyre, D., Soumelis, V., Crestani, B., Soler, P. (2006) Cutting edge: nonproliferating mature immune cells form a novel type of organized lymphoid structure in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol* 176:5735-5739.

Marczak, A., Wrzesień-Kuś, A., Krykowski, E., Robak, T., Józwiak, Z. (2003) The interaction of daunorubicin and mitoxantrone with the red blood cells of acute myeloid leukemia patients. *Cell Mol Biol Lett* 8:885-890.

Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D.M., Vucic, D., French, D.M., Lee, W.P., Roose-Girma, M., Erickson, S., Dixit, V.M. (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430:213-218.

Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M., Dixit, V.M. (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440:228-232.

Martin, W.G., Ristow, K.M., Habermann, T.M., Colgan, J.P., Witzig, T.E., Ansell, S.M. (2005) Bleomycin pulmonary toxicity has a negative impact on the outcome of patients with Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 23:7614-7620.

Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M. (2008) Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13:453-461.

Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J. (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10:417-426.

Martinon, F., Mayor, A., Tschopp, J. (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 27:229-265.

Marwick, J.A., Caramori, G., Casolari, P., Mazzoni, F., Kirkham, P.A., Adcock, I.M., Chung, K.F., Papi, A. (2010) A role for phosphoinositol 3-kinase delta in the impairment of glucocorticoid responsiveness in patients with chronic

obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 125:1146-1153.

Marwick, J.A., Caramori, G, Stevenson, C.S, Casolari, P, Jazrawi, E, Barnes, P.J, Ito, K, Adcock, I.M, Kirkham, P.A Papi, A (2009) Inhibition of PI3Kdelta restores glucocorticoid function in smoking-induced airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 179:542-548.

Massagué, J. Chen, Y.G (2000) Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14:627-644.

Mata, M., Ruíz, A, Cerdá, M, Martínez-Losa, M, Cortijo, J, Santangelo, F, Serrano-Mollar, A, Llombart-Bosch, A, Morcillo, E.J (2003) Oral N-acetylcysteine reduces bleomycin-induced lung damage and mucin Muc5ac expression in rats. *Eur Respir J* 22:900-905.

McDonald, S., Rubin, P, Chang, A.Y, Penney, D.P, Finkelstein, J.N, Grossberg, S, Feins, R Gregory, P.K (1993) Pulmonary changes induced by combined mouse beta-interferon (rMuIFN-beta) and irradiation in normal mice--toxic versus protective effects. *Radiother Oncol* 26:212-218.

McDonald, S., Rubin, P, Phillips, T.L Marks, L.B (1995) Injury to the lung from cancer therapy: clinical syndromes, measurable endpoints, and potential scoring systems. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31:1187-1203.

McKenzie, B.S., Kastelein, R.A Cua, D.J (2006) Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 27:17-23.

McKenzie, G.J., Emson, C.L, Bell, S.E, Anderson, S, Fallon, P, Zurawski, G, Murray, R, Grencis, R McKenzie, A.N (1998) Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. *Immunity* 9:423-432.

Meadors, M., Floyd, J Perry, M.C (2006) Pulmonary toxicity of chemotherapy. *Semin Oncol* 33:98-105.

Mentink-Kane, M.M. Wynn, T.A (2004) Opposing roles for IL-13 and IL-13 receptor alpha 2 in health and disease. *Immunol Rev* 202:191-202.

Mentink-Kane, M.M., Cheever, A.W, Wilson, M.S, Madala, S.K, Beers, L.M, Ramalingam, T.R Wynn, T.A (2011) Accelerated and progressive and lethal liver fibrosis in mice that lack interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13Rα2. *Gastroenterology* 141:2200-2209.

Michel, M., Keller, A.C, Paget, C, Fujio, M, Trottein, F, Savage, P.B, Wong, C, Schneider, E, Dy, M Leite-de-Moraes, M.C (2007) Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* 204:995-1001.

Migliaccio, C.T., Buford, M.C, Jessop, F Holian, A (2008) The IL-4Ralpha pathway in macrophages and its potential role in silica-induced pulmonary fibrosis. *J Leukoc Biol* 83:630-639.

Millan, F.A., Denhez, F, Kondaiah, P Akhurst, R.J (1991) Embryonic gene expression patterns of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 suggest different developmental functions in vivo. *Development* 111:131-143.

Minchin, R.F., Johnston, M.R, Aiken, M.A Boyd, M.R (1984) Pharmacokinetics of doxorubicin in isolated lung of dogs and humans perfused in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 229:193-198.

Minchin, R.F., Johnston, M.R, Schuller, H.M, Aiken, M.A Boyd, M.R (1988) Pulmonary toxicity of doxorubicin administered by in situ isolated lung perfusion in dogs. *Cancer* 61:1320-1325.

Minshall, E.M., Leung, D.Y, Martin, R.J, Song, Y.L, Cameron, L, Ernst, P Hamid, Q (1997) Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:326-333.

Mittal, S.K., Sharma, R.K, Gupta, A Naik, S (2009) Increased interleukin-10 production without expansion of CD4+CD25+ T-regulatory cells in early stable renal transplant patients on calcineurin inhibitors. *Transplantation* 88:435-441.

Miyazaki, Y., Araki, K, Vesin, C, Garcia, I, Kapanci, Y, Whitsett, J.A, Piguet, P.F Vassalli, P (1995) Expression of a tumor necrosis factor-alpha transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis. A mouse model of progressive pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 96:250-259.

Moore, B.B. Hogaboam, C.M (2008) Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294:L152-60.

Moore, B.B., Kolodsick, J.E, Thannickal, V.J, Cooke, K, Moore, T.A, Hogaboam, C, Wilke, C.A Toews, G.B (2005) CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am J Pathol* 166:675-684.

- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R, Coffman, R.L O'Garra, A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765.
- Mora, A.L., Torres-González, E, Rojas, M, Corredor, C, Ritzenthaler, J, Xu, J, Roman, J, Brigham, K Stecenko, A (2006) Activation of alveolar macrophages via the alternative pathway in herpesvirus-induced lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:466-473.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H, Bond, M.W, Giedlin, M.A Coffman, R.L (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357.
- Moustakas, A., Souchelnytskyi, S Heldin, C.H (2001) Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 114:4359-4369.
- Mu, W., Ouyang, X, Agarwal, A, Zhang, L, Long, D.A, Cruz, P.E, Roncal, C.A, Glushakova, O.Y, Chiodo, V.A, Atkinson, M.A, Hauswirth, W.W, Flotte, T.R, Rodriguez-Iturbe, B Johnson, R.J (2005) IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 16:3651-3660.
- Mucida, D., Kutchukhidze, N, Erazo, A, Russo, M, Lafaille, J.J Curotto de Lafaille, M.A (2005) Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest* 115:1923-1933.
- Mullen, A.C., High, F.A, Hutchins, A.S, Lee, H.W, Villarino, A.V, Livingston, D.M, Kung, A.L, Cereb, N, Yao, T.P, Yang, S.Y Reiner, S.L (2001) Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292:1907-1910.
- Munger, J.S., Huang, X, Kawakatsu, H, Griffiths, M.J, Dalton, S.L, Wu, J, Pittet, J.F, Kaminski, N, Garat, C, Matthay, M.A, Rifkin, D.B Sheppard, D (1999) The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96:319-328.
- Murphy, C.A., Langrish, C.L, Chen, Y, Blumenschein, W, McClanahan, T, Kastelein, R.A, Sedgwick, J.D Cua, D.J (2003) Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198:1951-1957.
- Murray, L.A., Argentieri, R.L, Farrell, F.X, Bracht, M, Sheng, H, Whitaker, B, Beck, H, Tsui, P, Cochlin, K, Evanoff, H.L, Hogaboam, C.M Das, A.M (2008) Hyper-responsiveness of IPF/UIP fibroblasts: interplay between TGFbeta1, IL-13 and CCL2. *Int J Biochem Cell Biol* 40:2174-2182.
- Murray, L.A., Chen, Q, Kramer, M.S, Hesson, D.P, Argentieri, R.L, Peng, X, Gulati, M, Homer, R.J, Russell, T, van Rooijen, N, Elias, J.A, Hogaboam, C.M Herzog, E.L (2011) TGF-beta driven lung fibrosis is macrophage dependent and blocked by Serum amyloid P. *Int J Biochem Cell Biol* 43:154-162.
- Murray, L.A., Rosada, R, Moreira, A.P, Joshi, A, Kramer, M.S, Hesson, D.P, Argentieri, R.L, Mathai, S, Gulati, M, Herzog, E.L Hogaboam, C.M (2010) Serum amyloid P therapeutically attenuates murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis via its effects on macrophages. *PLoS One* 5:e9683.
- Murray, P.J. Wynn, T.A (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11:723-737.
- Nakagome, K., Dohi, M, Okunishi, K, Tanaka, R, Miyazaki, J Yamamoto, K (2006) In vivo IL-10 gene delivery attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis by inhibiting the production and activation of TGF-beta in the lung. *Thorax* 61:886-894.
- Nakamura, H., Nakamura, K Yodoi, J (1997) Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 15:351-369.
- Nakao, A., Miike, S, Hatano, M, Okumura, K, Tokuhisa, T, Ra, C Iwamoto, I (2000) Blockade of transforming growth factor beta/Smad signaling in T cells by overexpression of Smad7 enhances antigen-induced airway inflammation and airway reactivity. *J Exp Med* 192:151-158.
- Nash, J.R., McLaughlin, P.J, Butcher, D Corrin, B (1993) Expression of tumour necrosis factor-alpha in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Histopathology* 22:343-347.
- Natsume, M., Tsuji, H, Harada, A, Akiyama, M, Yano, T, Ishikura, H, Nakanishi, I, Matsushima, K, Kaneko, S Mukaida, N (1999) Attenuated liver fibrosis and depressed serum albumin levels in carbon tetrachloride-treated IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol* 66:601-608.
- Nembrini, C., Marsland, B.J Kopf, M (2009) IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation. *J Allergy*

Clin Immunol 123:986-94; quiz 995-6.

Nurieva, R.I., Chung, Y, Hwang, D, Yang, X.O, Kang, H.S, Ma, L, Wang, Y, Watowich, S.S, Jetten, A.M, Tian, Q, Dong, C (2008) Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29:138-149.

Nurieva, R.I., Chung, Y, Martinez, G.J, Yang, X.O, Tanaka, S, Matskevitch, T.D, Wang, Y, Dong, C (2009) Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325:1001-1005.

O'Shea, J.J. Paul, W.E (2010) Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 327:1098-1102.

Obayashi, Y., Yamadori, I, Fujita, J, Yoshinouchi, T, Ueda, N, Takahara, J (1997) The role of neutrophils in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 112:1338-1343.

Ogushi, F., Tani, K, Maniwa, K, Ichikawa, W, Tada, H, Kawano, T, Sone, S (1997) Interleukin-8 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis or idiopathic pulmonary fibrosis. *J Med Invest* 44:53-58.

Oh, M., Oh, S.Y, Yu, J, Myers, A.C, Leonard, W.J, Liu, Y.J, Zhu, Z, Zheng, T (2011) IL-13 induces skin fibrosis in atopic dermatitis by thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol* 186:7232-7242.

Oikonomou, N., Harokopos, V, Zalevsky, J, Valavanis, C, Kotanidou, A, Szymkowski, D.E, Kollias, G, Aidinis, V (2006) Soluble TNF mediates the transition from pulmonary inflammation to fibrosis. *PLoS One* 1:e108.

Okazaki, T., Nakao, A, Nakano, H, Takahashi, F, Takahashi, K, Shimozato, O, Takeda, K, Yagita, H, Okumura, K (2001) Impairment of bleomycin-induced lung fibrosis in CD28-deficient mice. *J Immunol* 167:1977-1981.

Okazawa, A., Kanai, T, Watanabe, M, Yamazaki, M, Inoue, N, Ikeda, M, Kurimoto, M, Ishii, H, Hibi, T (2002) Th1-mediated intestinal inflammation in Crohn's disease may be induced by activation of lamina propria lymphocytes through synergistic stimulation of interleukin-12 and interleukin-18 without T cell receptor engagement. *Am J Gastroenterol* 97:3108-3117.

Oldroyd, S.D., Thomas, G.L, Gabbiani, G, El Nahas, A.M (1999) Interferon-gamma inhibits experimental renal fibrosis. *Kidney Int* 56:2116-2127.

Olman, M.A., Mackman, N, Gladson, C.L, Moser, K.M, Loskutoff, D.J (1995) Changes in procoagulant and fibrinolytic gene expression during bleomycin-induced lung injury in the mouse. *J Clin Invest* 96:1621-1630.

Ong, C., Wong, C, Roberts, C.R, Teh, H.S, Jirik, F.R (1998) Anti-IL-4 treatment prevents dermal collagen deposition in the tight-skin mouse model of scleroderma. *Eur J Immunol* 28:2619-2629.

Ong, C.J., Ip, S, Teh, S.J, Wong, C, Jirik, F.R, Grusby, M.J, Teh, H.S (1999) A role for T helper 2 cells in mediating skin fibrosis in tight-skin mice. *Cell Immunol* 196:60-68.

Oppmann, B., Lesley, R, Blom, B, Timans, J.C, Xu, Y, Hunte, B, Vega, F, Yu, N, Wang, J, Singh, K, Zonin, F, Vaisberg, E, Churakova, T, Liu, M, Gorman, D, Wagner, J, Zurawski, S, Liu, Y, Abrams, J.S, Moore, K.W, Rennick, D, de Waal-Malefyt, R, Hannum, C, Bazan, J.F, Kastelein, R.A (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13:715-725.

Ortiz, L.A., Lasky, J, Hamilton, R.F.J, Holian, A, Hoyle, G.W, Banks, W, Peschon, J.J, Brody, A.R, Lungarella, G, Friedman, M (1998) Expression of TNF and the necessity of TNF receptors in bleomycin-induced lung injury in mice. *Exp Lung Res* 24:721-743.

Oury, T.D., Thakker, K, Menache, M, Chang, L.Y, Crapo, J.D, Day, B.J (2001) Attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by a catalytic antioxidant metalloporphyrin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:164-169.

Ozaki, T., Hayashi, H, Tani, K, Ogushi, F, Yasuoka, S, Ogura, T (1992) Neutrophil chemotactic factors in the respiratory tract of patients with chronic airway diseases or idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 145:85-91.

Ozdamar, B., Bose, R, Barrios-Rodiles, M, Wang, H, Zhang, Y, Wrana, J.L (2005) Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 307:1603-1609.

Papiris, S.A., Kollintza, A, Kitsanta, P, Kapotsis, G, Karatza, M, Milic-Emili, J, Roussos, C, Daniil, Z (2005) Relationship of BAL and lung tissue CD4+ and CD8+ T lymphocytes, and their ratio in idiopathic pulmonary

fibrosis. *Chest* 128:2971-2977.

Parambil, J.G., Myers, J.L. Ryu, J.H (2005) Histopathologic features and outcome of patients with acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis undergoing surgical lung biopsy. *Chest* 128:3310-3315.

Pardo, A., Barrios, R, Gaxiola, M, Segura-Valdez, L, Carrillo, G, Estrada, A, Mejía, M Selman, M (2000) Increase of lung neutrophils in hypersensitivity pneumonitis is associated with lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1698-1704.

Parish, C.R. Liew, F.Y (1972) Immune response to chemically modified flagellin. 3. Enhanced cell-mediated immunity during high and low zone antibody tolerance to flagellin. *J Exp Med* 135:298-311.

Park, H., Li, Z, Yang, X.O, Chang, S.H, Nurieva, R, Wang, Y, Wang, Y, Hood, L, Zhu, Z, Tian, Q Dong, C (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6:1133-1141.

Parra, E.R., Kairalla, R.A, Ribeiro de Carvalho, C.R, Eher, E Capelozzi, V.L (2007) Inflammatory cell phenotyping of the pulmonary interstitium in idiopathic interstitial pneumonia. *Respiration* 74:159-169.

Parronchi, P., Macchia, D, Piccinni, M.P, Biswas, P, Simonelli, C, Maggi, E, Ricci, M, Ansari, A.A Romagnani, S (1991) Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4538-4542.

Paruchuri, S., Yang, J, Aikawa, E, Melero-Martin, J.M, Khan, Z.A, Loukogeorgakis, S, Schoen, F.J Bischoff, J (2006) Human pulmonary valve progenitor cells exhibit endothelial/mesenchymal plasticity in response to vascular endothelial growth factor-A and transforming growth factor-beta2. *Circ Res* 99:861-869.

Pechkovsky, D.V., Prasse, A, Kollert, F, Engel, K.M.Y, Dentler, J, Luttmann, W, Friedrich, K, Müller-Quernheim, J Zissel, G (2010) Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction. *Clin Immunol* 137:89-101.

Penadés, J.R., Bernal, D, Revert, F, Johansson, C, Fresquet, V.J, Cervera, J, Wieslander, J, Quinones, S Saus, J (1995) Characterization and expression of multiple alternatively spliced transcripts of the Goodpasture antigen gene region. Goodpasture antibodies recognize recombinant proteins representing the autoantigen and one of its alternative forms. *Eur J Biochem* 229:754-760.

Pesce, J.T., Ramalingam, T.R, Mentink-Kane, M.M, Wilson, M.S, El Kasmi, K.C, Smith, A.M, Thompson, R.W, Cheever, A.W, Murray, P.J Wynn, T.A (2009) Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog* 5:e1000371.

Peterson, M.W., Monick, M Hunninghake, G.W (1987) Prognostic role of eosinophils in pulmonary fibrosis. *Chest* 92:51-56.

Phan, S.H. Kunkel, S.L (1992) Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res* 18:29-43.

Phan, S.H., Armstrong, G, Sulavik, M.C, Schrier, D, Johnson, K.J Ward, P.A (1983) A comparative study of pulmonary fibrosis induced by bleomycin and an O₂ metabolite producing enzyme system. *Chest* 83:44S-45S.

Piera-Velazquez, S., Li, Z Jimenez, S.A (2011) Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol* 179:1074-1080.

Piguet, P.F., Collart, M.A, Grau, G.E, Kapanci, Y Vassalli, P (1989) Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *J Exp Med* 170:655-663.

Piguet, P.F., Collart, M.A, Grau, G.E, Sappino, A.P Vassalli, P (1990) Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature* 344:245-247.

Piguet, P.F., Ribaux, C, Karpuz, V, Grau, G.E Kapanci, Y (1993a) Expression and localization of tumor necrosis factor-alpha and its mRNA in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 143:651-655.

Piguet, P.F., Vesin, C, Grau, G.E Thompson, R.C (1993b) Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) prevents or cures pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin or silica. *Cytokine* 5:57-61.

Pittet, J.F., Griffiths, M.J, Geiser, T, Kaminski, N, Dalton, S.L, Huang, X, Brown, L.A, Gotwals, P.J, Kotliansky, V.E, Matthay, M.A Sheppard, D (2001) TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury. *J Clin Invest* 107:1537-

1544.

Postlethwaite, A.E., Shigemitsu, H Kanangat, S (2004) Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 16:733-738.

Poynard, T., Yuen, M, Ratziu, V Lai, C.L (2003) Viral hepatitis C. *Lancet* 362:2095-2100.

Prasse, A., Pechkovsky, D.V, Toews, G.B, Jungraithmayr, W, Kollert, F, Goldmann, T, Vollmer, E, Müller-Quernheim, J Zissel, G (2006) A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18. *Am J Respir Crit Care Med* 173:781-792.

Quinones, S., Bernal, D, García-Sogo, M, Elena, S.F Saus, J (1992) Exon/intron structure of the human alpha 3(IV) gene encompassing the Goodpasture antigen (alpha 3(IV)NC1). Identification of a potentially antigenic region at the triple helix/NC1 domain junction. *J Biol Chem* 267:19780-19784.

Raghu, G., Brown, K.K, Costabel, U, Cottin, V, du Bois, R.M, Lasky, J.A, Thomeer, M, Utz, J.P, Khandker, R.K, McDermott, L Fatenejad, S (2008) Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with etanercept: an exploratory, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 178:948-955.

Ramalingam, T.R., Pesce, J.T, Sheikh, F, Cheever, A.W, Mentink-Kane, M.M, Wilson, M.S, Stevens, S, Valenzuela, D.M, Murphy, A.J, Yancopoulos, G.D, Urban, J.F.J, Donnelly, R.P Wynn, T.A (2008) Unique functions of the type II interleukin 4 receptor identified in mice lacking the interleukin 13 receptor alpha1 chain. *Nat Immunol* 9:25-33.

Raya, A., Revert-Ros, F, Martínez-Martínez, P, Navarro, S, Rosello, E, Vieites, B, Granero, F, Forteza, J Saus, J (2000) Goodpasture antigen-binding protein, the kinase that phosphorylates the goodpasture antigen, is an alternatively spliced variant implicated in autoimmune pathogenesis. *J Biol Chem* 275:40392-40399.

Raya, A., Revert, F, Navarro, S Saus, J (1999) Characterization of a novel type of serine/threonine kinase that specifically phosphorylates the human goodpasture antigen. *J Biol Chem* 274:12642-12649.

Reiman, R.M., Thompson, R.W, Feng, C.G, Hari, D, Knight, R, Cheever, A.W, Rosenberg, H.F Wynn, T.A (2006) Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect Immun* 74:1471-1479.

Revert, F., Merino, R, Monteagudo, C, Macías, J, Peydró, A, Alcácer, J, Muniesa, P, Marquina, R, Blanco, M, Iglesias, M, Revert-Ros, F, Merino, J Saus, J (2007) Increased Goodpasture antigen-binding protein expression induces type IV collagen disorganization and deposit of immunoglobulin A in glomerular basement membrane. *Am J Pathol* 171:1419-1430.

Revert, F., Penadés, J.R, Plana, M, Bernal, D, Johansson, C, Itarte, E, Cervera, J, Wieslander, J, Quinones, S Saus, J (1995) Phosphorylation of the Goodpasture antigen by type A protein kinases. *J Biol Chem* 270:13254-13261.

Revert, F., Ventura, I, Martínez-Martínez, P, Granero-Moltó, F, Revert-Ros, F, Macías, J Saus, J (2008) Goodpasture antigen-binding protein is a soluble exportable protein that interacts with type IV collagen. Identification of novel membrane-bound isoforms. *J Biol Chem* 283:30246-30255.

Reynolds, H.Y., Fulmer, J.D, Kazmierowski, J.A, Roberts, W.C, Frank, M.M Crystal, R.G (1977) Analysis of cellular and protein content of broncho-alveolar lavage fluid from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and chronic hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Invest* 59:165-175.

Richeldi, L., Davies, H.R, Ferrara, G Franco, F (2003) Corticosteroids for idiopathic pulmonary fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* :CD002880.

Roark, C.L., Simonian, P.L, Fontenot, A.P, Born, W.K O'Brien, R.L (2008) gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol* 20:353-357.

Rogliani, P., Mura, M, Assunta Porretta, M Saltini, C (2008) New perspectives in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Ther Adv Respir Dis* 2:75-93.

Rudd, R.M., Prescott, R.J, Chalmers, J.C, Johnston, I.D.A (2007) British Thoracic Society Study on cryptogenic fibrosing alveolitis: Response to treatment and survival. *Thorax* 62:62-66.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N, Asano, M, Itoh, M Toda, M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-

tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.

Salama, A.D., Levy, J.B, Lightstone, L Pusey, C.D (2001) Goodpasture's disease. *Lancet* 358:917-920.

Salomon, B., Lenschow, D.J, Rhee, L, Ashourian, N, Singh, B, Sharpe, A Bluestone, J.A (2000) B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440.

Sandler, N.G., Mentink-Kane, M.M, Cheever, A.W Wynn, T.A (2003) Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. *J Immunol* 171:3655-3667.

Sandor, M., Weinstock, J.V Wynn, T.A (2003) Granulomas in schistosome and mycobacterial infections: a model of local immune responses. *Trends Immunol* 24:44-52.

Santana, A., Saxena, B, Noble, N.A, Gold, L.I Marshall, B.C (1995) Increased expression of transforming growth factor beta isoforms (beta 1, beta 2, beta 3) in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13:34-44.

Sato, S., Hasegawa, M, Fujimoto, M, Tedder, T.F Takehara, K (2000) Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* 165:6635-6643.

Sauer, K.A., Scholtes, P, Karwot, R Finotto, S (2006) Isolation of CD4+ T cells from murine lungs: a method to analyze ongoing immune responses in the lung. *Nat Protoc* 1:2870-2875.

Saus, J., Wieslander, J, Langeveld, J.P, Quinones, S Hudson, B.G (1988) Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3(IV) chain of collagen IV. *J Biol Chem* 263:13374-13380.

Sausville, E.A., Peisach, J Horwitz, S.B (1976) A role for ferrous ion and oxygen in the degradation of DNA by bleomycin. *Biochem Biophys Res Commun* 73:814-822.

Savage, C.O., Pusey, C.D, Kershaw, M.J, Cashman, S.J, Harrison, P, Hartley, B, Turner, D.R, Cameron, J.S, Evans, D.J Lockwood, C.M (1986) The Goodpasture antigen in Alport's syndrome: studies with a monoclonal antibody. *Kidney Int* 30:107-112.

Schmid, P., Cox, D, Bilbe, G, Maier, R McMaster, G.K (1991) Differential expression of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 genes during mouse embryogenesis. *Development* 111:117-130.

Schmierer, B. Hill, C.S (2007) TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:970-982.

Schrier, D.J., Kunkel, R.G Phan, S.H (1983a) The role of strain variation in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 127:63-66.

Schrier, D.J., Phan, S.H McGarry, B.M (1983b) The effects of the nude (nu/nu) mutation on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. A biochemical evaluation. *Am Rev Respir Dis* 127:614-617.

Scotton, C.J., Krupiczkojic, M.A, Königshoff, M, Mercer, P.F, Lee, Y.C.G, Kaminski, N, Morser, J, Post, J.M, Maher, T.M, Nicholson, A.G, Moffatt, J.D, Laurent, G.J, Derian, C.K, Eickelberg, O Chambers, R.C (2009) Increased local expression of coagulation factor X contributes to the fibrotic response in human and murine lung injury. *J Clin Invest* 119:2550-2563.

Seder, R.A., Gazzinelli, R, Sher, A Paul, W.E (1993) Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10188-10192.

Segel, M.J., Izbicki, G, Cohen, P.Y, Or, R, Christensen, T.G, Wallach-Dayana, S.B Breuer, R (2003) Role of interferon-gamma in the evolution of murine bleomycin lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L1255-62.

Serrano-Mollar, A., Closa, D, Prats, N, Blesa, S, Martinez-Losa, M, Cortijo, J, Estrela, J.M, Morcillo, E.J Bulbena, O (2003) In vivo antioxidant treatment protects against bleomycin-induced lung damage in rats. *Br J Pharmacol* 138:1037-1048.

Shao, D.D., Suresh, R, Vakil, V, Gomer, R.H Pilling, D (2008) Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation. *J Leukoc Biol* 83:1323-1333.

Sharma, S.K., MacLean, J.A, Pinto, C Kradin, R.L (1996) The effect of an anti-CD3 monoclonal antibody on bleomycin-induced lymphokine production and lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 154:193-200.

Sharplin, J. Franko, A.J (1989) A quantitative histological study of strain-dependent differences in the effects of irradiation on mouse lung during the early phase. *Radiat Res* 119:1-14.

Shevach, E.M. (2006) From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25:195-201.

Shimamura, T., Fujisawa, T, Husain, S.R, Kioi, M, Nakajima, A Puri, R.K (2008) Novel role of IL-13 in fibrosis induced by nonalcoholic steatohepatitis and its amelioration by IL-13R-directed cytotoxin in a rat model. *J Immunol* 181:4656-4665.

Simeonova, M., Ivanova, G, Enchev, V, Markova, N, Kamburov, M, Petkov, C, Devery, A, O'Connor, R Brougham, D (2009) Physicochemical characterization and in vitro behavior of daunorubicin-loaded poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Acta Biomater* 5:2109-2121.

Simons, J.M., Hart, B.A, Ip Vai Ching, T.R, Van Dijk, H Labadie, R.P (1990) Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic Biol Med* 8:251-258.

Singal, P.K. Iliskovic, N (1998) Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 339:900-905.

Singal, P.K., Deally, C.M Weinberg, L.E (1987) Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J Mol Cell Cardiol* 19:817-828.

Smeltz, R.B., Chen, J, Ehrhardt, R Shevach, E.M (2002) Role of IFN-gamma in Th1 differentiation: IFN-gamma regulates IL-18R alpha expression by preventing the negative effects of IL-4 and by inducing/maintaining IL-12 receptor beta 2 expression. *J Immunol* 168:6165-6172.

Song, E., Ouyang, N, Hörbelt, M, Antus, B, Wang, M Exton, M.S (2000) Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol* 204:19-28.

Standiford, T.J., Rolfe, M.R, Kunkel, S.L, Lynch, J.P.3, Becker, F.S, Orringer, M.B, Phan, S Strieter, R.M (1993a) Altered production and regulation of monocyte chemoattractant protein-1 from pulmonary fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 103:121S.

Standiford, T.J., Rolfe, M.W, Kunkel, S.L, Lynch, J.P.3, Burdick, M.D, Gilbert, A.R, Orringer, M.B, Whyte, R.I Strieter, R.M (1993b) Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in interstitial lung disease. *J Immunol* 151:2852-2863.

Starcher, B.C., Kuhn, C Overton, J.E (1978) Increased elastin and collagen content in the lungs of hamsters receiving an intratracheal injection of bleomycin. *Am Rev Respir Dis* 117:299-305.

Struhar, D., Greif, J Harbeck, R.J (1990) Class II antigens of the major histocompatibility complex are increased in lungs of bleomycin-treated rats. *Immunol Lett* 26:197-201.

Sun, C., Hall, J.A, Blank, R.B, Bouladoux, N, Oukka, M, Mora, J.R Belkaid, Y (2007) Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 204:1775-1785.

Sun, L., Louie, M.C, Vannella, K.M, Wilke, C.A, LeVine, A.M, Moore, B.B Shanley, T.P (2011) New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300:L341-53.

Swain, S.L., Weinberg, A.D, English, M Huston, G (1990) IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 145:3796-3806.

Swihart, K., Fruth, U, Messmer, N, Hug, K, Behin, R, Huang, S, Del Giudice, G, Aguet, M Louis, J.A (1995) Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response. *J Exp Med* 181:961-971.

Szabo, S.J., Dighe, A.S, Gubler, U Murphy, K.M (1997) Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 185:817-824.

Szabo, S.J., Kim, S.T, Costa, G.L, Zhang, X, Fathman, C.G Glimcher, L.H (2000) A novel transcription factor, Tbet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100:655-669.

Tabuena, R.P., Nagai, S, Tsutsumi, T, Handa, T, Minoru, T, Mikuniya, T, Shigematsu, M, Hamada, K, Izumi, T

Mishima, M (2005) Cell profiles of bronchoalveolar lavage fluid as prognosticators of idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia among Japanese Patients. *Respiration* 72:490-498.

Taillé, C., Grootenboer-Mignot, S, Boursier, C, Michel, L, Debray, M, Fagart, J, Barrientos, L, Mailleux, A, Cigna, N, Tubach, F, Marchal-Sommé, J, Soler, P, Chollet-Martin, S, Crestani, B (2011) Identification of perioplakin as a new target for autoreactivity in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 183:759-766.

Takeda, A., Hamano, S, Yamanaka, A, Hanada, T, Ishibashi, T, Mak, T.W, Yoshimura, A, Yoshida, H (2003) Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol* 170:4886-4890.

Tamagawa, K., Taooka, Y, Maeda, A, Hiyama, K, Ishioka, S, Yamakido, M (2000) Inhibitory effects of a lecithinized superoxide dismutase on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1279-1284.

Tang, Q., Boden, E.K, Henriksen, K.J, Bour-Jordan, H, Bi, M, Bluestone, J.A (2004) Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34:2996-3005.

Tarnell, E.B., Oliver, B.L, Johnson, G.M, Watts, F.L, Thrall, R.S (1992) Superoxide anion production by rat neutrophils at various stages of bleomycin-induced lung injury. *Lung* 170:41-50.

Thannickal, V.J, Fanburg, B.L (1995) Activation of an H₂O₂-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem* 270:30334-30338.

Thompson, K., Maltby, J, Fallowfield, J, McAulay, M, Millward-Sadler, H, Sheron, N (1998) Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 28:1597-1606.

Thorstenson, K.M, Khoruts, A (2001) Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J Immunol* 167:188-195.

Thrall, R.S, Barton, R.W (1984) A comparison of lymphocyte populations in lung tissue and in bronchoalveolar lavage fluid of rats at various times during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 129:279-283.

Thrall, R.S., McCormick, J.R, Jack, R.M, McReynolds, R.A, Ward, P.A (1979) Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat: inhibition by indomethacin. *Am J Pathol* 95:117-130.

Thrall, R.S., Vogel, S.N, Evans, R, Shultz, L.D (1997) Role of tumor necrosis factor-alpha in the spontaneous development of pulmonary fibrosis in viable motheaten mutant mice. *Am J Pathol* 151:1303-1310.

Tian, J., Pecaut, M.J, Slater, J.M, Gridley, D.S (2010) Spaceflight modulates expression of extracellular matrix, adhesion, and profibrotic molecules in mouse lung. *J Appl Physiol* 108:162-171.

Travis, M.A., Reizis, B, Melton, A.C, Masteller, E, Tang, Q, Proctor, J.M, Wang, Y, Bernstein, X, Huang, X, Reichardt, L.F, Bluestone, J.A, Sheppard, D (2007) Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* 449:361-365.

Travis, W.D., Matsui, K, Moss, J, Ferrans, V.J (2000) Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: prognostic significance of cellular and fibrosing patterns: survival comparison with usual interstitial pneumonia and desquamative interstitial pneumonia. *Am J Surg Pathol* 24:19-33.

Tsuchiya, N., Kuroki, K, Fujimoto, M, Murakami, Y, Tedder, T.F, Tokunaga, K, Takehara, K, Sato, S (2004) Association of a functional CD19 polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 50:4002-4007.

Tsujishita, Y, Hurley, J.H (2000) Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nat Struct Biol* 7:408-414.

Turner-Warwick, M., Burrows, B, Johnson, A (1980a) Cryptogenic fibrosing alveolitis: response to corticosteroid treatment and its effect on survival. *Thorax* 35:593-599.

Turner-Warwick, M., Burrows, B, Johnson, A (1980b) Cryptogenic fibrosing alveolitis: clinical features and their influence on survival. *Thorax* 35:171-180.

Turpin, E.A., Antao-Menezes, A, Cesta, M.F, Mangum, J.B, Wallace, D.G, Bermudez, E, Bonner, J.C (2010) Respiratory syncytial virus infection reduces lung inflammation and fibrosis in mice exposed to vanadium

pentoxide. *Respir Res* 11:20.

Ulloa, L., Doody, J Massagué, J (1999) Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* 397:710-713.

Umezawa, H. (1974) Chemistry and mechanism of action of bleomycin. *Fed Proc* 33:2296-2302.

Veldhoen, M., Hocking, R.J, Atkins, C.J, Locksley, R.M Stockinger, B (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179-189.

Vermeire, K., Heremans, H, Vandeputte, M, Huang, S, Billiau, A Matthys, P (1997) Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol* 158:5507-5513.

Verschoore, J., Lagrange, J.L, Boubilil, J.L, Aubanel, J.M, Blaive, B, Pinto, J Namer, M (1987) Pulmonary toxicity of a combination of low-dose doxorubicin and irradiation for inoperable lung cancer. *Radiother Oncol* 9:281-288.

Viloria-Petit, A.M., David, L, Jia, J.Y, Erdemir, T, Bane, A.L, Pinnaduwa, D, Roncari, L, Narimatsu, M, Bose, R, Moffat, J, Wong, J.W, Kerbel, R.S, O'Malley, F.P, Andrulis, I.L Wrana, J.L (2009) A role for the TGFbeta-Par6 polarity pathway in breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14028-14033.

Voehringer, D., Reese, T.A, Huang, X, Shinkai, K Locksley, R.M (2006) Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. *J Exp Med* 203:1435-1446.

Vogelzang, A., McGuire, H.M, Yu, D, Sprent, J, Mackay, C.R King, C (2008) A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity* 29:127-137.

Vujaskovic, Z., Batinic-Haberle, I, Rabbani, Z.N, Feng, Q, Kang, S.K, Spasojevic, I, Samulski, T.V, Fridovich, I, Dewhirst, M.W Anscher, M.S (2002) A small molecular weight catalytic metalloporphyrin antioxidant with superoxide dismutase (SOD) mimetic properties protects lungs from radiation-induced injury. *Free Radic Biol Med* 33:857-863.

Waghray, M., Cui, Z, Horowitz, J.C, Subramanian, I.M, Martinez, F.J, Toews, G.B Thannickal, V.J (2005) Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB J* 19:854-856.

Wallace, W.A. Howie, S.E (1999) Immunoreactive interleukin 4 and interferon-gamma expression by type II alveolar epithelial cells in interstitial lung disease. *J Pathol* 187:475-480.

Wallace, W.A., Howie, S.E, Krajewski, A.S Lamb, D (1996) The immunological architecture of B-lymphocyte aggregates in cryptogenic fibrosing alveolitis. *J Pathol* 178:323-329.

Wallace, W.A., Ramage, E.A, Lamb, D Howie, S.E (1995) A type 2 (Th2-like) pattern of immune response predominates in the pulmonary interstitium of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA). *Clin Exp Immunol* 101:436-441.

Wallace, W.A., Roberts, S.N, Caldwell, H, Thornton, E, Greening, A.P, Lamb, D Howie, S.E (1994a) Circulating antibodies to lung protein(s) in patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax* 49:218-224.

Wallace, W.A., Schofield, J.A, Lamb, D Howie, S.E (1994b) Localisation of a pulmonary autoantigen in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax* 49:1139-1145.

Walters, D.M., Cho, H Kleeberger, S.R (2008) Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2. *Antioxid Redox Signal* 10:321-332.

Wan, Y.Y. Flavell, R.A (2006) The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol Rev* 212:114-130.

Wang, B., André, I, Gonzalez, A, Katz, J.D, Aguet, M, Benoist, C Mathis, D (1997) Interferon-gamma impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13844-13849.

Wang, L., Chen, S Xu, K (2011) IL-17 expression is correlated with hepatitis B-related liver diseases and fibrosis. *Int J Mol Med* 27:385-392.

Wang, S.C., Ohata, M, Schrum, L, Rippe, R.A Tsukamoto, H (1998) Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 273:302-308.

Wangoo, A., Laban, C, Cook, H.T, Glenville, B Shaw, R.J (1997) Interleukin-10- and corticosteroid-induced

reduction in type I procollagen in a human ex vivo scar culture. *Int J Exp Pathol* 78:33-41.

Watanabe, T., Suzuki, J, Mitsuo, A, Nakano, S, Tamayama, Y, Katagiri, A, Amano, H, Morimoto, S, Tokano, Y, Takasaki, Y (2008) Striking alteration of some populations of T/B cells in systemic lupus erythematosus: relationship to expression of CD62L or some chemokine receptors. *Lupus* 17:26-33.

Watters, L.C., Schwarz, M.I, Cherniack, R.M, Waldron, J.A, Dunn, T.L, Stanford, R.E King, T.E (1987) Idiopathic pulmonary fibrosis. Pretreatment bronchoalveolar lavage cellular constituents and their relationships with lung histopathology and clinical response to therapy. *Am Rev Respir Dis* 135:696-704.

Weiss, R.B. (1992) The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?. *Semin Oncol* 19:670-686.

Weisser, S.B., van Rooijen, N Sly, L.M (2012) Depletion and reconstitution of macrophages in mice. *J Vis Exp* : 4105.

Welker, L., Jörres, R.A, Costabel, U Magnussen, H (2004) Predictive value of BAL cell differentials in the diagnosis of interstitial lung diseases. *Eur Respir J* 24:1000-1006.

Weng, H., Liu, Y, Chen, J, Huang, T, Xu, L, Godoy, P, Hu, J, Zhou, C, Stickel, F, Marx, A, Bohle, R.M, Zimmer, V, Lammert, F, Mueller, S, Gigou, M, Samuel, D, Mertens, P.R, Singer, M.V, Seitz, H.K Dooley, S (2009) The etiology of liver damage imparts cytokines transforming growth factor beta1 or interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis. *Hepatology* 50:230-243.

Wenner, C.A., Güler, M.L, Macatonia, S.E, O'Garra, A Murphy, K.M (1996) Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J Immunol* 156:1442-1447.

Werner, Y. Törnberg, B (1976) Cutaneous side effects of bleomycin therapy. *Acta Derm Venereol* 56:155-158.

Whyte, M., Hubbard, R, Meliconi, R, Whidborne, M, Eaton, V, Bingle, C, Timms, J, Duff, G, Facchini, A, Pacilli, A, Fabbri, M, Hall, I, Britton, J, Johnston, I Di Giovine, F (2000) Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms. *Am J Respir Crit Care Med* 162:755-758.

Willis, B.C., Liebler, J.M, Luby-Phelps, K, Nicholson, A.G, Crandall, E.D, du Bois, R.M Borok, Z (2005) Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 166:1321-1332.

Wills-Karp, M. (2004) Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep* 4:123-131.

Wilson, M.S., Madala, S.K, Ramalingam, T.R, Gochuico, B.R, Rosas, I.O, Cheever, A.W Wynn, T.A (2010) Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J Exp Med* 207:535-552.

Wilson, M.S., Ramalingam, T.R, Rivollier, A, Shenderov, K, Mentink-Kane, M.M, Madala, S.K, Cheever, A.W, Artis, D, Kelsall, B.L Wynn, T.A (2011) Colitis and intestinal inflammation in IL10^{-/-} mice results from IL-13Rα2-mediated attenuation of IL-13 activity. *Gastroenterology* 140:254-264.

Wilson, N.J., Boniface, K, Chan, J.R, McKenzie, B.S, Blumenschein, W.M, Mattson, J.D, Basham, B, Smith, K, Chen, T, Morel, F, Lecron, J, Kastelein, R.A, Cua, D.J, McClanahan, T.K, Bowman, E.P de Waal Malefyt, R (2007) Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8:950-957.

Wipff, P., Rifkin, D.B, Meister, J Hinz, B (2007) Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 179:1311-1323.

Wood, N., Whitters, M.J, Jacobson, B.A, Witek, J, Sypek, J.P, Kasaian, M, Eppihimer, M.J, Unger, M, Tanaka, T, Goldman, S.J, Collins, M, Donaldson, D.D Grusby, M.J (2003) Enhanced interleukin (IL)-13 responses in mice lacking IL-13 receptor alpha 2. *J Exp Med* 197:703-709.

Wrana, J.L., Attisano, L, Wieser, R, Ventura, F Massagué, J (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370:341-347.

Wynn, T.A. (2004) Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 4:583-594.

Wynn, T.A., Cheever, A.W, Jankovic, D, Poindexter, R.W, Caspar, P, Lewis, F.A Sher, A (1995) An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature* 376:594-596.

Wynn, T.A., Cheever, A.W, Williams, M.E, Hiemy, S, Caspar, P, Kühn, R, Müller, W Sher, A (1998) IL-10 regulates

liver pathology in acute murine *Schistosomiasis mansoni* but is not required for immune down-modulation of chronic disease. *J Immunol* 160:4473-4480.

Xaubet, A. (2003) [Clinical comments on the new classification of diffuse interstitial lung diseases]. *Med Clin (Barc)* 121:389-395.

Xu, J., Mora, A.L, LaVoy, J, Brigham, K.L Rojas, M (2006) Increased bleomycin-induced lung injury in mice deficient in the transcription factor T-bet. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291:L658-67.

Xu, M.Y., Porte, J, Knox, A.J, Weinreb, P.H, Maher, T.M, Violette, S.M, McAnulty, R.J, Sheppard, D Jenkins, G (2009) Lysophosphatidic acid induces alphavbeta6 integrin-mediated TGF-beta activation via the LPA2 receptor and the small G protein G alpha(q). *Am J Pathol* 174:1264-1279.

Yang, G., Volk, A, Petley, T, Emmell, E, Giles-Komar, J, Shang, X, Li, J, Das, A.M, Shealy, D, Griswold, D.E Li, L (2004) Anti-IL-13 monoclonal antibody inhibits airway hyperresponsiveness, inflammation and airway remodeling. *Cytokine* 28:224-232.

Yang, X.O., Panopoulos, A.D, Nurieva, R, Chang, S.H, Wang, D, Watowich, S.S Dong, C (2007) STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 282:9358-9363.

Yang, X.O., Pappu, B.P, Nurieva, R, Akimzhanov, A, Kang, H.S, Chung, Y, Ma, L, Shah, B, Panopoulos, A.D, Schluns, K.S, Watowich, S.S, Tian, Q, Jetten, A.M Dong, C (2008) T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 28:29-39.

Yang, Y., Fujita, J, Bandoh, S, Ohtsuki, Y, Yamadori, I, Yoshinouchi, T Ishida, T (2002) Detection of antivimentin antibody in sera of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and non-specific interstitial pneumonia. *Clin Exp Immunol* 128:169-174.

Yasuoka, S., Nakayama, T, Kawano, T, Ogushi, F, Doi, H, Hayashi, H Tsubura, E (1985) Comparison of cell profiles of bronchial and bronchoalveolar lavage fluids between normal subjects and patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Tohoku J Exp Med* 146:33-45.

Ye, P., Rodriguez, F.H, Kanaly, S, Stocking, K.L, Schurr, J, Schwarzenberger, P, Oliver, P, Huang, W, Zhang, P, Zhang, J, Shellito, J.E, Bagby, G.J, Nelson, S, Charrier, K, Peschon, J.J Kolls, J.K (2001) Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194:519-527.

Yoshizaki, A., Iwata, Y, Komura, K, Ogawa, F, Hara, T, Muroi, E, Takenaka, M, Shimizu, K, Hasegawa, M, Fujimoto, M, Tedder, T.F Sato, S (2008) CD19 regulates skin and lung fibrosis via Toll-like receptor signaling in a model of bleomycin-induced scleroderma. *Am J Pathol* 172:1650-1663.

Yu, D. Vinuesa, C.G (2010) The elusive identity of T follicular helper cells. *Trends Immunol* 31:377-383.

Yu, D., Batten, M, Mackay, C.R King, C (2009) Lineage specification and heterogeneity of T follicular helper cells. *Curr Opin Immunol* 21:619-625.

Zavadil, J. Böttinger, E.P (2005) TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24:5764-5774.

Zhang, G., Gran, B, Yu, S, Li, J, Siglienti, I, Chen, X, Kamoun, M Rostami, A (2003) Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J Immunol* 170:2153-2160.

Zhang, Y., Lee, T.C, Guillemin, B, Yu, M.C Rom, W.N (1993) Enhanced IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. *J Immunol* 150:4188-4196.

Zhang, Y.E. (2009) Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 19:128-139.

Zheng, W. Flavell, R.A (1997) The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89:587-596.

Zhou, L., Chong, M.M.W Littman, D.R (2009a) Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30:646-655.

Zhou, L., Ivanov, I.I, Spolski, R, Min, R, Shenderov, K, Egawa, T, Levy, D.E, Leonard, W.J Littman, D.R (2007) IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways.

Nat Immunol 8:967-974.

Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S, Jeker, L.T Bluestone, J.A (2009b) Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Curr Opin Immunol* 21:281-285.

Zhu, F., Wang, Q, Guo, C, Wang, X, Cao, X, Shi, Y, Gao, F, Ma, C Zhang, L (2011) IL-17 induces apoptosis of vascular endothelial cells: a potential mechanism for human acute coronary syndrome. *Clin Immunol* 141:152-160.

Zhu, J. Paul, W.E (2008) CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112:1557-1569.

Zhu, Z., Homer, R.J, Wang, Z, Chen, Q, Geba, G.P, Wang, J, Zhang, Y Elias, J.A (1999) Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 103:779-788.

Ziegenhagen, M.W., Schrum, S, Zissel, G, Zipfel, P.F, Schlaak, M Müller-Quernheim, J (1998) Increased expression of proinflammatory chemokines in bronchoalveolar lavage cells of patients with progressing idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *J Investig Med* 46:223-231.

Zisman, D.A., Lynch, J.P.3, Toews, G.B, Kazerooni, E.A, Flint, A Martinez, F.J (2000) Cyclophosphamide in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective study in patients who failed to respond to corticosteroids. *Chest* 117:1619-1626.

Zurawski, S.M., Vega, F.J, Huyghe, B Zurawski, G (1993) Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *EMBO J* 12:2663-2670.

(2000) 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* 161:646-664.

(2002) 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* 165:277-304.

**ANEXOS:
PUBLICACIONES**

Tamayo, E., Postigo, J., González, J., Fernández-Rey, M., Iglesias¹, M., Santiuste, I., Riccardi, C., Rappuoli, R., Del Giudice, G., Merino, R., and Merino, J. (2010). GITR contributes to the systemic adjuvanticity of the Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Eur. J. Immunol.* 40: 754–763

Postigo, J., Genre, F., Iglesias, M., Fernández-Rey, M., Buelta, L., Rodríguez-Rey, J.C., Merino, J., and Merino, R. (2011). Exacerbation of Type II Collagen–Induced Arthritis in Apolipoprotein E–Deficient Mice in Association With the Expansion of Th1 and Th17 Cells. *Arthritis rheum.* vol.63,n.4:971-980

