



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA

**ESTUDIO FARMACOLÓGICO EX VIVO/IN VITRO DE
VASOS PULMONARES HUMANOS DE PACIENTES
CON FIBROSIS PULMONAR E HIPERTENSIÓN
PULMONAR**



Juan Escrivá Peiró

Febrero 2018

VNIVERSITAT E VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA



**ESTUDIO FARMACOLÓGICO EX VIVO/IN VITRO DE VASOS
PULMONARES HUMANOS DE PACIENTES CON FIBROSIS
PULMONAR E HIPERTENSIÓN PULMONAR**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

JUAN ESCRIVÁ PEIRÓ

DIRIGIDA POR:

DR. D. JOSE LUIS ORTIZ BELDA

DR. D. JAVIER MILARA PAYÁ

DR. D. GUSTAVO JUAN SAMPER

VALENCIA, 2018



Dr. D. Jose Luis Ortiz Belda Doctor por la Universidad de Valencia , PDI-Titular de Universidad Farmacología, Facultad de Medicina i Odontología. Director de Sección Departamental: Farmacología

Dr. D. Javier Milara Payá Doctor por la Universidad de Valencia, Farmacéutico Adjunto en el Hospital General Universitario de Valencia.

Dr. D. Gustavo Juan Samper Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid PDI-Titular de Universidad Medicina, Facultad de Medicina i Odontología. Jefe clínico neumología Hospital General de Valencia.

Certifican:

Que la Tesis Doctoral presentada por D Juan Escrivá Peiró, con el título:

“ESTUDIO FARMACOLÓGICO EX VIVO/IN VITRO DE VASOS PULMONARES HUMANOS DE PACIENTES CON FIBROSIS PULMONAR E HIPERTENSIÓN PULMONAR”

Ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se firma el presente certificado en Valencia a 10 de Febrero 2018.

Fdo. Dr. Jose Luis Ortiz Belda

Fdo. Dr. Javier Milara Payá

Fdo. Dr. Gustavo Juan Samper

En Valencia, Febrero de 2018.

La presente Tesis Doctoral, realizada en la Universidad de Valencia y La Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia, ha sido posible gracias a las siguientes ayudas:

- Nacionales:
 - SAF2014-55322-P,
 - FIS PI14/01733,
 - FIS PI17/02158,
 - SAF2015-65368-R,
 - CIBERES (CB06/06/0027),
 - TRACE (TRA2009-0311; Gobierno de España)
- Generalitat Valenciana:
 - APrometeo II/2013/014, from “Generalitat Valenciana”.

Dichas entidades no han contribuido al diseño del estudio o la recogida de datos, análisis, interpretación ni a la redacción final.

Agradecimientos

Esta tesis fundamentalmente va dirigida a aquellas personas que sufren la Fibrosis Pulmonar Idiopática. Es una obligación buscar alternativas terapéuticas ante una enfermedad con tan mal pronóstico que deteriora la calidad de vida de los enfermos de forma progresiva e irremediable. Son ellos los que han permitido con su colaboración realizar esta tesis. A pesar de la situación en que se encontraban, todos, absolutamente todos, tenían como primer pensamiento, más allá del complejo destino que les esperara al entrar en lista de espera de trasplante pulmonar, que querían aportar lo que fuera necesario para ayudar a otros enfermos. Todos, sabedores del riesgo de mortalidad que tenían pre y post trasplante, se ofrecían a donar en caso de un fatal desenlace todo lo que se pudiera obtener de su cuerpo para ayudar a otros pacientes. Como sabemos, cuando un paciente trasplantado es éxito suele estar contraindicada la donación y por ello este estudio les ha permitido hacer posible, de algún modo, ese deseo de devolver la solidaridad que iban a tener hacia ellos. Las familias, que también sufren el deterioro de sus familiares enfermos, se ofrecían igualmente durante las visitas en consulta a colaborar siendo donantes.

Habiendo dado ya las gracias a los pacientes por habernos facilitado la opción de investigar con sus pulmones extirpados, aprovecho este punto para mencionar que la donación no solo se puede realizar cuando uno fallece. No sólo se trasplantan órganos sólidos. Hay muchos pacientes que necesitan una donación de médula ósea. Dicha donación se realiza en vida y no repercute negativamente en el donante. Es algo tan sencillo como aprovechar cuando se realiza una donación de sangre para solicitar que se nos incluya en el banco de donantes de médula. Si todos colaboramos se aumenta el Pool de médulas disponibles y mejoramos de forma exponencial la supervivencia de los pacientes que la precisan, pues a mayor número de posibles donantes se puede seleccionar mejor una médula HLA compatible.

Esta tesis se ha podido realizar gracias a las piezas obtenidas de donantes de órganos en muerte cerebral (controles) y de los pacientes a los que se les realizaba el trasplante pulmonar (pulmones con fibrosis y/o hipertensión). Como cirujano que trabaja en un proceso de trasplante de órgano sólido, que admira la solidaridad de aquellos que donan los órganos del ser querido en una situación tan difícil. Me siento en la obligación de dar las gracias a la sociedad por la solidaridad que demuestran día a día, pero también

de insistir en que no debemos relajarnos, pues aún hay margen de mejora posible, fundamentalmente en la donación de médula ósea. La sociedad está claramente concienciada en la donación de órgano sólido y siendo un profesional que trabaja en dicho proceso estoy entregado a intentar sacar el máximo partido a esa solidaridad. Pero debo reconocer que esa gran concienciación social no siento que exista para el trasplante de médula ósea, pese a los grandes avances obtenidos a partir de la publicación en redes sociales de casos específicos que aumentan “puntualmente” el número de donantes de médula.

Siendo conocedor de este déficit, siento la obligación moral de dejar reflejado en este punto de agradecimientos la reivindicación de que queda mucha labor de concienciación desde los medios de comunicación, desde los políticos y desde los profesionales para que todos seamos donantes de médula. Vemos muchas noticias de una España puntera en donación de órganos y me gustaría para estar realmente satisfecho que se acompañara siempre de información sobre la donación de progenitores hematológicos que se puede realizar en vida.

Dicho esto no podría dejar de agradecer a mis tres directores de tesis el haberme estimulado a realizarla y no haber dejado de creer que la terminaría. También a los equipos de investigación del Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia y de la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia por la paciencia que han tenido al trabajar con un cirujano torácico en el laboratorio. Son ellos, como equipo multidisciplinar, los que hacen posible una tesis como esta.

Por último también debo dar las gracias al equipo de trasplantes pulmonares del Hospital la Fe porque en un proceso largo y complejo, que siempre se realiza a horas intempestivas, sacaban tiempo de forma altruista para ayudarme en la obtención y conservación de muestras para el estudio.

ÍNDICE

• INTRODUCCIÓN	
○ Introducción al problema objeto de estudio.....	3
○ Fibrosis pulmonar idiopática como enfermedad intersticial pulmonar que puede condicionar hipertensión pulmonar.....	6
▪ Características fisiopatológicas de la circulación pulmonar.....	7
▪ Clasificación de la hipertensión pulmonar	9
○ Fisiopatología de la Hipertensión pulmonar	13
○ Hipertensión pulmonar en la patología intersticial difusa	16
▪ Biopatología de la hipertensión pulmonar en la patología intersticial difusa	19
▪ Papel del TGF- β en la hipertensión pulmonar asociada a patología intersticial	20
▪ Papel de la PDE5 en la hipertensión pulmonar asociada a patología intersticial	21
▪ Descubrimiento del papel del NO	21
▪ Descripción del NO	24
▪ Mecanismo acción NO.....	26
▪ Efectos cardiovasculares del ON endotelial	26
▪ Inhibidores de la fosfodiesterasa 5	27
▪ Mecanismo de acción y efectos farmacológicos inhibidores PDE5	28
○ Fibrosis pulmonar idiopática	28
▪ Papel del TGF- β en la Fibrosis Pulmonar Idiopática	30
▪ TGF- β en la lesión epitelial	32
▪ La transición epitelio-mesenquimal y endotelio-mesenquimal inducidas por TGF β como fuentes de miofibroblastos activados ..	34
▪ TGF- β en la regulación de matriz extracelular	37
▪ Papel de la señalización vía TGF- β y Smad3	40
▪ Hipertensión en FPI opciones terapéuticas.....	41
○ HIPOTESIS	44
○ OBJETIVOS	45
• MATERIALES Y MÉTODOS	49
▪ Obtención de los anillos vasculares para los estudios funcionales ex vivo	50
• Descripción del sistema de baño de órganos.....	51
• Montaje del preparado	53
• Fármacos utilizados	54

•	Protocolos experimentales.....	55
▪	RT-PCR en tiempo real.....	57
•	Retrotranscripción inversa (RT).....	59
•	RT-PCR a tiempo real.....	60
▪	Inmunofluorescencia y Western blotting.....	63
•	Inmunofluorescencia.....	64
•	Western blot.....	64
▪	Experimentos de arteria pulmonar “ex vivo”.....	66
▪	Aislamiento y cultivo de células endoteliales de arteria pulmonar humana y células musculares lisas. Experimentación in vitro.....	67
▪	Ensayo de proliferación celular.....	68
▪	Modelo animal.....	69
•	Instilación bleomicina.....	70
•	Estudio ventilación-perfusión.....	71
○	Adquisición y reconstrucción de imágenes.....	73
○	Análisis de imágenes.....	74
•	Tratamiento con sildenafilo.....	75
•	ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y RESULTADOS	
○	Análisis estadístico.....	79
○	Resultados:	
▪	Efectos del sildenafilo relajantes y anti-contráctiles sobre arterias pulmonares de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática.....	80
▪	Caracterización de los marcadores de remodelación en arterias pulmonares del grupo control y de pacientes con FPI con o sin HP.....	87
▪	Efectos anti-remodelación del sildenafilo en las arterias pulmonares humanas de pacientes con FPI.....	94
▪	El sildenafilo en arteria pulmonar inhibió las transiciones de Endotelio a mesénquima y de células del músculo liso a miofibroblastos inducidas por TGF- β 1.....	98
▪	Efectos del sildenafilo en modelo animal con fibrosis e hipertensión pulmonar inducidas con bleomicina.....	107
○	Resultados respecto a hipótesis inicial.....	109
•	DISCUSIÓN.....	115
•	CONCLUSIONES.....	123
•	ÍNDICE ABREVIATURAS.....	125
•	BIBLIOGRAFIA.....	129

INTRODUCCIÓN

Introducción al problema objeto de estudio

Durante los últimos años hemos asistido al desarrollo y aprobación de dos fármacos, pirfenidona y nintedanib, para el tratamiento de la Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)(1-3). Ambos han mostrado capacidad para ralentizar la pérdida de función pulmonar o lo que sería lo mismo evitar la progresión de la fibrosis. Si bien, la disponibilidad de estos agentes ha sido un gran avance, sabemos que ambos tienen un efecto limitado, pues sigue habiendo muchos problemas sin solucionar en estos pacientes (4) y sigue siendo necesario el uso de otras terapias en situación de excepción (4, 5).

Más allá del componente fibrótico de la enfermedad, en la FPI con frecuencia se producen cambios fisiopatológicos que dan lugar a hipertensión pulmonar (HP) (6). Dicha patología, que complica la evolución de los pacientes con FPI, se relaciona claramente con el deterioro funcional y con una mala evolución. La probabilidad de desarrollar HP aumenta con el tiempo y, en las fases terminales de la enfermedad, la mayoría de los pacientes han desarrollado en algún grado HP(7). Por lo tanto, en los pacientes con enfermedades más avanzadas con HP establecida o que estén en alto riesgo de desarrollarla, los agentes vaso activos pulmonares pueden representar una posible vía terapéutica. La orientación del tratamiento de la HP en la FPI tiene sentido intuitivo, pero los retos consisten en no sólo elegir la población de pacientes más apropiada, sino también la medicación o clase de medicamentos correcta.

Existen datos que sugieren que la vía del óxido nítrico (NO) pudiera ser una diana terapéutica para estos pacientes (8, 9). El estudio Step-IPF de sildenafil dio un resultado negativo si nos fijamos en su objetivo primario (proporción de pacientes con un aumento en la distancia de 6 minutos marcha de 20% o más), pero sí demostró de forma significativa efectos beneficiosos en otros puntos como: la calidad de vida, el grado de disnea, la capacidad de difusión del monóxido de carbono y la oxigenación arterial(8, 10). Basándose en un análisis de subgrupos, parece que los pacientes que presentan disfunción ventricular derecha son el fenotipo que más probablemente pueda

beneficiarse de esta terapia(11). Sin embargo, siempre hay que ver los análisis de subgrupos con cierta circunspección, especialmente cuando se trata de números pequeños.

No está claro en este momento si las terapias específicas frente a la hipertensión pulmonar primaria (HPP) tiene algún valor clínico en la enfermedad pulmonar intersticial complicada por HP. Ensayos clínicos en FPI utilizando vasodilatadores como los antagonistas de los receptores de la endotelina no han dado resultados positivos(12, 13). Parece, sin embargo, que el sildenafil tiene propiedades pleiotrópicas más allá de sus efectos vasodilatadores tradicionales que pueden hacer que sea especialmente atractivo como un tratamiento complementario para la FPI. Aunque existen estudios, observaciones anecdóticas y análisis de subgrupos que han sugerido un beneficio con el uso del sildenafil en FPI, también hay estudios negativos que hacen decaer el entusiasmo en su empleo (14, 15). Curiosamente, un reciente meta análisis de 19 ensayos clínicos aleatorizados que compararon 10 intervenciones diferentes (incluidas las terapias específicas utilizadas para HP) con placebo y un período de seguimiento medio de un año, sin comparaciones directas entre las intervenciones de tratamiento, sugirió que el tratamiento con nintedanib , pirfenidona y sildenafil ofrecían una posible mejora de la supervivencia en pacientes con FPI (16).

En última instancia, el sildenafil puede resultar beneficioso para los pacientes con FPI con HP desproporcionada (17) y podría ser el siguiente "paso" hacia adelante en la búsqueda de una terapia multimodal eficaz para la FPI.

En esta tesis, estudiaremos “ex vivo” e “in vitro” las propiedades vasodilatadoras y anti-remodelado de sildenafil sobre arterias pulmonares humanas con hipertensión pulmonar asociada o no a FPI. Valorando el efecto primario vasodilatador sobre anillos vasculares pulmonares en un sistema de baño de órganos. Posteriormente estudiaremos in vitro su influencia en el remodelado, lo que podría implicar opciones terapéuticas más allá de los pacientes con FPI que asocien hipertensión pulmonar. Por último evaluaremos el efecto del sildenafil sobre el cociente V/Q en un modelo animal con fibrosis inducida con bleomicina. De este modo podremos valorar el posible efecto deletéreo que pudiera tener el fármaco sobre el cociente V/Q, provocando hipoxemia, como hacen otros fármacos vasodilatadores.

Con todo ello exploramos en el laboratorio el comportamiento global que tendrá el sildenafilo ex vivo e in vitro. Pudiendo así disponer de una base fisiopatológica que nos permita establecer nuevas hipótesis sobre las que diseñar futuros ensayos clínicos en pacientes con FPI.

Fibrosis pulmonar idiopática como enfermedad intersticial pulmonar que puede condicionar hipertensión pulmonar

Las enfermedades pulmonares intersticiales (EPIs) son un grupo variado de patologías condicionadas por la inflamación y la fibrosis del parénquima pulmonar(18). La hipertensión pulmonar (HP) se ha descrito en la mayoría de estas condiciones.

- Neumonías intersticiales idiopáticas
 - Fibrosis pulmonar idiopática
 - Neumonía intersticial aguda
 - Neumonía intersticial no específica
 - Bronquilitis respiratoria con enfermedad pulmonar intersticial (bronquiolitis respiratoria/EPID)
 - Neumonía intersticial descamativa
 - Neumonía organizada criptogenética
 - Neumonía intersticial linfocítica
- De causa conocida o asociadas
 - Asociadas a enfermedades del colágeno
 - Causadas por polvos inorgánicos (neumoconiosis)
 - Inducidas por fármacos y radioterapia
 - Causadas por polvos orgánicos (alveolitis alérgicas extrínsecas)
 - Asociadas a enfermedades hereditarias (enfermedad de Hermansky-Pudlak, etc.)
- Primarias o asociadas a otros procesos no bien definidos
 - Sarcoidosis
 - Proteinosis alveolar
 - Microlitiasis alveolar
 - Linfangioleiomiomatosis
 - Eosinofiliias pulmonares
 - Histiocitosis X (granulomatosis de células de Langerhans)
 - Amiloidosis
 - Otras EPID

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) (18)

La hipertensión pulmonar se define como un aumento en la presión arterial pulmonar media (PAPm) ≥ 25 mmHg en reposo, evaluada mediante cateterismo cardíaco derecho(19). Los datos disponibles han demostrado que la PAPm normal en reposo es de 14 ± 3 mmHg con un límite superior de la normalidad de aproximadamente 20 mmHg(20). La importancia clínica de una PAPm entre 21 y 24 mmHg no está suficientemente aclarada. Es obligado seguir cuidadosamente a los pacientes que presentan una presión arterial pulmonar (PAP) en este rango cuando están en riesgo de desarrollar HP, por ejemplo, pacientes con la enfermedad del tejido conectivo (CTD) o miembros de la familia de los pacientes con HP heredable (HPH).

Características fisiopatológicas de la circulación pulmonar

La vascularización pulmonar sigue un trayecto aproximadamente paralelo al de la vía aérea, con un patrón análogo de ramificación. Esta ramificación progresiva se acompaña de una disminución exponencial del diámetro de los vasos sanguíneos, según el cual (entre otras características) pueden diferenciarse 3 tipos de vasos arteriales: arterias, arteriolas precapilares y capilares (que muestran continuidad con vénulas postcapilares y venas pulmonares). Esta ramificación y reducción exponencial del diámetro luminal del vaso se correlaciona con un aumento exponencial del número de ramificaciones arteriales (Fig. 1 A y B).

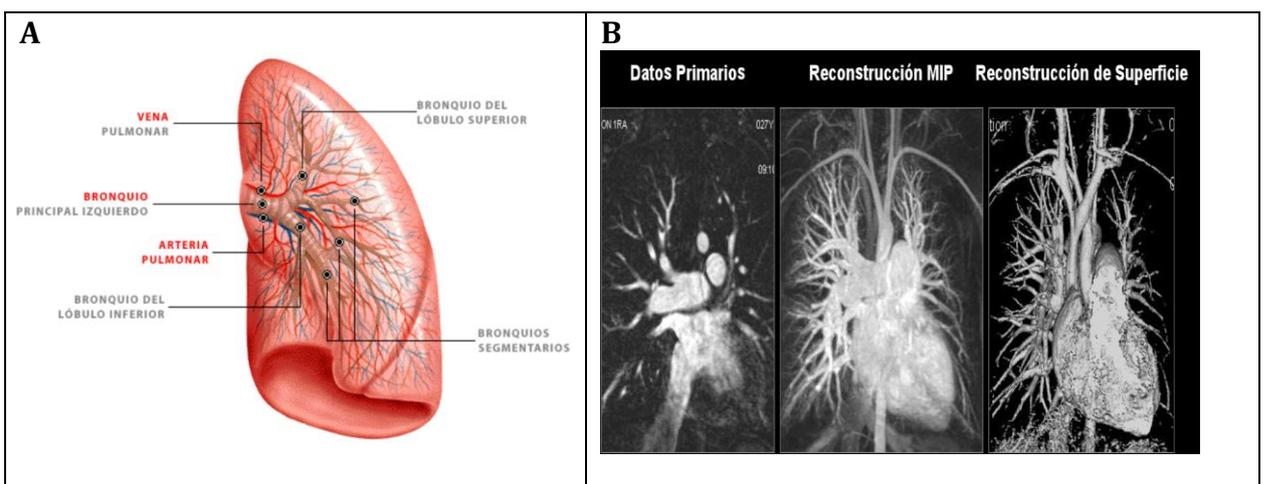
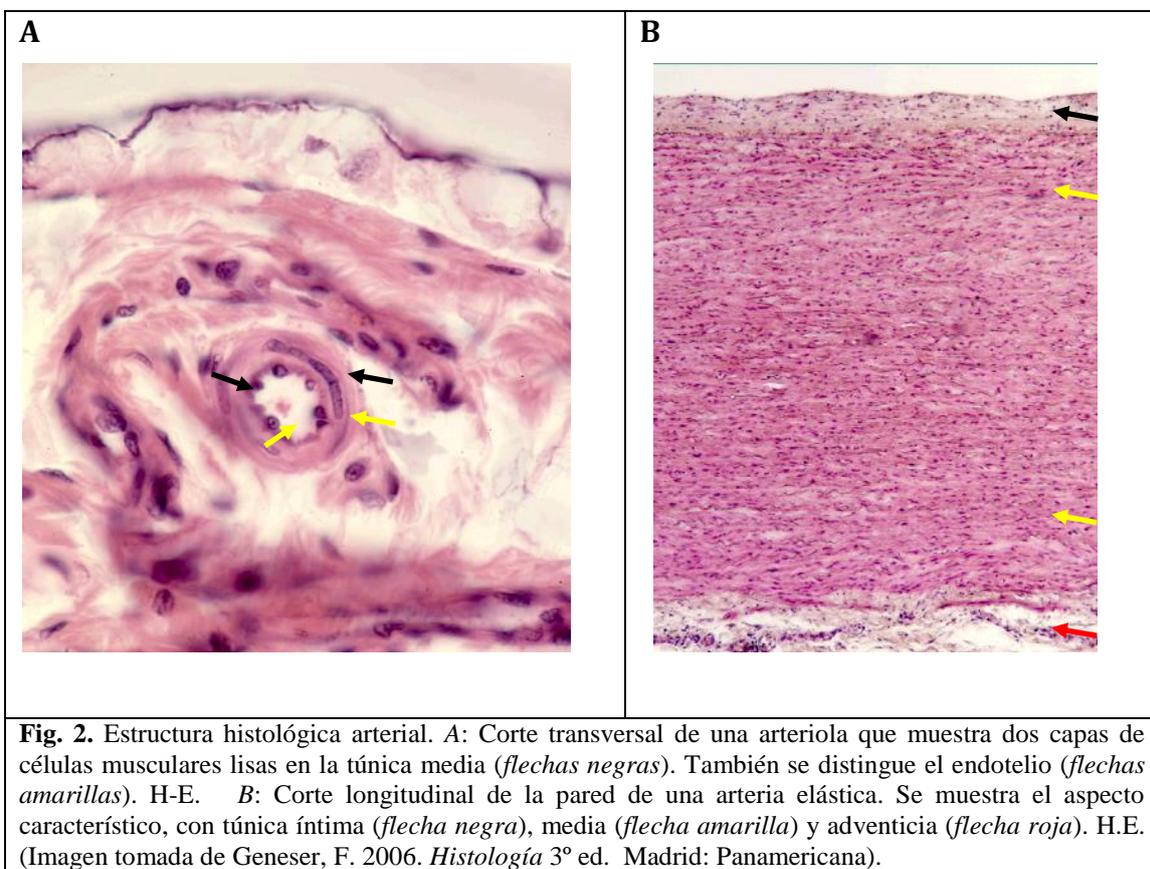


Fig. 1. Patrón de ramificación bronquial y vascular. *A*: anatomía de las vía aérea y vascular que muestra de forma esquemática la ramificación respiratoria y vascular, con un trayecto vascular prácticamente paralelo al bronquial. *B*: Angio-TC y correspondiente reconstrucción en 3D que ilustra el patrón respiratorio y vascular pulmonar. Puede observarse la reducción exponencial del diámetro vascular y aéreo, así como el aumento exponencial del número de ramificaciones que la acompaña.

Con respecto a su constitución, las arterias pulmonares son arterias elásticas, en las que pueden distinguirse tres capas histológicas en su estructura: íntima (más interna), constituida por células endoteliales; media (formada por células musculares lisas); adventicia (más externa), formada por tejido conjuntivo y fibroblastos (Fig.2 A). Esta estructura histológica muestra continuidad en las arteriolas, cuya media tiene menos capas de células musculares lisas (Fig. 2 B). Además, las arteriolas muestran en su porción terminal la denominada metaarteriola o esfínter precapilar, que regula el flujo sanguíneo que alcanza el lecho capilar.



Los pulmones se caracterizan por ser el único órgano que recibe la totalidad del gasto cardíaco, por lo que la circulación pulmonar supone un sistema de alto flujo, baja presión y baja resistencia, en condiciones fisiológicas. Por otro lado, en esas mismas condiciones, el tono muscular de las arterias pulmonares es significativamente inferior al tono que se observa en los vasos arteriales sistémicos. Estas dos premisas justifican que el aparato respiratorio constituya un sistema de alto flujo y de baja presión y resistencia (21).

La presión arterial pulmonar (PAP) se correlaciona inversamente con la cuarta potencia del radio luminal de las arterias pulmonares ($PAP = 1/r^4$). Esta relación condiciona que mínimos cambios en el radio arterial van a condicionar grandes cambios (inversos) en la PAP.

Todos los vasos pulmonares contribuyen a la determinación de la PAP; no obstante, son las arterias pulmonares de mediano y pequeño calibre (arteriolas y capilares) las que ostentan una mayor relevancia a la hora de condicionar la PAP. En relación con ello, el aumento del gasto cardíaco o flujo sanguíneo pulmonar se sigue de una vasodilatación y reclutamiento de vasos colapsados con la finalidad de mantener una PAP dentro de valores más o menos constantes. Con ello, en condiciones fisiológicas, el valor de PAP media (mPAP) en un adulto sano es de 10 a 20 mmHg.

En aquellas situaciones patológicas en las que estos mecanismos reguladores no funcionan adecuadamente o sean insuficientes (alteraciones contráctiles o aumento del espesor parietal arterial) pueden establecerse valores de PAP anormalmente altos, dando lugar a la Hipertensión Pulmonar.

Clasificación de la Hipertensión Pulmonar

La hipertensión pulmonar se clasificó desde un inicio en 2 categorías:

- 1) la hipertensión pulmonar primaria
- 2) Hipertensión pulmonar secundaria de acuerdo con la presencia de causas o factores de riesgo identificados.

Desde el segundo Simposio Mundial sobre hipertensión pulmonar realizado en Evian, en 1998, se estableció una clasificación clínica con el fin de individualizar las diferentes categorías de hipertensión pulmonar que compartían hallazgos patológicos, características hemodinámicas y manejo similares. Cinco grupos de trastornos que causan PH fueron identificados:

- 1) la hipertensión arterial pulmonar.
- 2) hipertensión pulmonar debida a enfermedad del corazón izquierdo.
- 3) Hipertensión pulmonar debida a enfermedad crónica pulmonar y/o hipoxia.
- 4) Hipertensión por enfermedad pulmonar tromboembólica crónica.

5) Hipertensión por mecanismos multifactoriales inespecíficos.

Dicha clasificación sufrió cambios posteriores pero su arquitectura general y filosofía no ha variado. Siendo una clasificación utilizada en múltiples guías clínicas de diferentes sociedades científicas. Finalmente en el 5º Simposio Mundial llevado a cabo en Niza en 2013 se consensuó mantener dicha clasificación pero planteando alguna posible modificación en el grupo 1 y en relación a la hipertensión pulmonar en edad pediátrica:

1. Hipertensión arterial pulmonar

1.1 HAP idiopática

1.2 HAP Hereditaria

1.2.1 Mutación BMPR2 (Receptor tipo II de proteína morfogenética de hueso)

1.2.2 ALK-1, Endoglin, SMAD9, Caveolin-1, KCNK3

1.2.3 Desconocida

1.3 Inducida por fármacos y tóxicos

1.4 Asociada a:

1.4.1 Enfermedad del tejido conectivo

1.4.2 Infección VIH

1.4.3 Hipertensión portal

1.4.4 Enfermedades cardíacas congénitas

1.4.5 Esquistosomiasis

1´ Enfermedad pulmonar veno-oclusiva y/o hemangiomatosis capilar pulmonar

1'' Hipertensión pulmonar persistente del recién nacido

2. Hipertensión pulmonar debida a cardiopatía izquierda

2.1 Disfunción sistólica ventricular izquierda

2.2 Disfunción diastólica ventricular izquierda

2.3 Enfermedad valvular

2.4 Obstrucciones adquiridas o congénitas del tracto de entrada/salida del ventrículo izquierdo y miocardiopatías congénitas

3. Hipertensión pulmonar debido a patología pulmonar y/o hipoxemia

3.1 Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

3.2 Patología pulmonar intersticial

3.3 Otras enfermedades pulmonares con patrón mixto restrictivo-obstructivo

3.4 Trastornos respiratorios del sueño

3.5 Hipoventilación alveolar

3.6 Exposición crónica a la altura

3.7 Anormalidades del desarrollo pulmonar

4. Hipertensión pulmonar por tromboembolismo

5. Hipertensión pulmonar por mecanismos multifactoriales o no establecidos

5.1 Enfermedades hematológicas: anemia hemolítica, trastornos mieloproliferativos, esplenectomía

5.2 Enfermedades sistémicas: sarcoidosis, histiocitosis pulmonar, linfangioleiomiomatosis, neurofibromatosis

5.3 Trastornos metabólicos: enfermedad de almacenamiento del glucógeno, enfermedad de Gaucher, trastornos tiroideos

5.4 Otros: obstrucción tumoral, mediastinitis fibrosante, insuficiencia renal crónica, hipertensión pulmonar segmentaria

Simoneau publicó en 2013 una actualización recogiendo las últimas modificaciones del grupo 1 y la edad pediátrica(22) que quedarán reflejadas en la última Guía Europea (ver Figura3)(17) :

TABLE 4 Comprehensive clinical classification of pulmonary hypertension (updated from Simonneau *et al.* [5])

1. Pulmonary arterial hypertension
1.1 Idiopathic 1.2 Heritable 1.2.1 BMPR2 mutation 1.2.2 Other mutations 1.3 Drugs and toxins induced 1.4 Associated with: 1.4.1 Connective tissue disease 1.4.2 Human immunodeficiency virus (HIV) infection 1.4.3 Portal hypertension 1.4.4 Congenital heart disease (Table 6) 1.4.5 Schistosomiasis
1'. Pulmonary veno-occlusive disease and/or pulmonary capillary haemangiomas
1'.1 Idiopathic 1'.2 Heritable 1'.2.1 EIF2AK4 mutation 1'.2.2 Other mutations 1'.3 Drugs, toxins and radiation induced 1'.4 Associated with: 1'.4.1 Connective tissue disease 1'.4.2 HIV infection
1". Persistent pulmonary hypertension of the newborn
2. Pulmonary hypertension due to left heart disease
2.1 Left ventricular systolic dysfunction 2.2 Left ventricular diastolic dysfunction 2.3 Valvular disease 2.4 Congenital/acquired left heart inflow/outflow tract obstruction and congenital cardiomyopathies 2.5 Congenital/acquired pulmonary veins stenosis
3. Pulmonary hypertension due to lung diseases and/or hypoxia
3.1 Chronic obstructive pulmonary disease 3.2 Interstitial lung disease 3.3 Other pulmonary diseases with mixed restrictive and obstructive pattern 3.4 Sleep-disordered breathing 3.5 Alveolar hypoventilation disorders 3.6 Chronic exposure to high altitude 3.7 Developmental lung diseases (Web Table III)
4. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension and other pulmonary artery obstructions
4.1 Chronic thromboembolic pulmonary hypertension 4.2 Other pulmonary artery obstructions 4.2.1 Angiosarcoma 4.2.2 Other intravascular tumors 4.2.3 Arteritis 4.2.4 Congenital pulmonary arteries stenoses 4.2.5 Parasites (hydatidosis)
5. Pulmonary hypertension with unclear and/or multifactorial mechanisms
5.1 Haematological disorders: chronic haemolytic anaemia, myeloproliferative disorders, splenectomy 5.2 Systemic disorders: sarcoidosis, pulmonary histiocytosis, lymphangioleiomyomatosis, neurofibromatosis 5.3 Metabolic disorders: glycogen storage disease, Gaucher disease, thyroid disorders 5.4 Others: pulmonary tumoral thrombotic microangiopathy, fibrosing mediastinitis, chronic renal failure (with/without dialysis), segmental pulmonary hypertension

BMPR2: bone morphogenetic protein receptor, type 2; EIF2AK4: eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4; HIV: human immunodeficiency virus.

Fig. 3 Clasificación guía Europea(17)

En el grupo 3 de la HP que incluye enfermedades pulmonares crónicas y/o hipoxia están implicados otros mecanismos fisiopatológicos mas allá de la vasoconstricción producida por la hipoxia, como: el estrés mecánico en pulmones hiperinflados, la pérdida de capilares, la inflamación, los efectos tóxicos del humo de cigarrillos, y también se ha descrito un desequilibrio entre factores constrictores o relajadores derivados del endotelio.

En el examen histológico de estas enfermedades pulmonares crónicas se encuentran hallazgos patológicos que incluyen la hipertrofia de la capa muscular y la proliferación de la capa íntima de arterias pulmonares distales; así como, distintos grados de destrucción del lecho vascular tanto en el enfisema como en la fibrosis pulmonar(23-25)

Fisiopatología de la Hipertensión Pulmonar

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) tiene una fisiopatología multifactorial. La vasoconstricción, la remodelación de la pared vascular pulmonar y la trombosis contribuyen a un aumento de la resistencia vascular pulmonar en la HAP. El proceso de remodelado vascular pulmonar implica todas las capas de la pared del vaso y se complica por la heterogeneidad celular dentro de cada compartimento de la pared arterial pulmonar. En efecto, cada tipo de célula (endotelial, músculo liso y fibroblastos), así como las células y plaquetas inflamatorias, pueden jugar un papel significativo en la HAP.

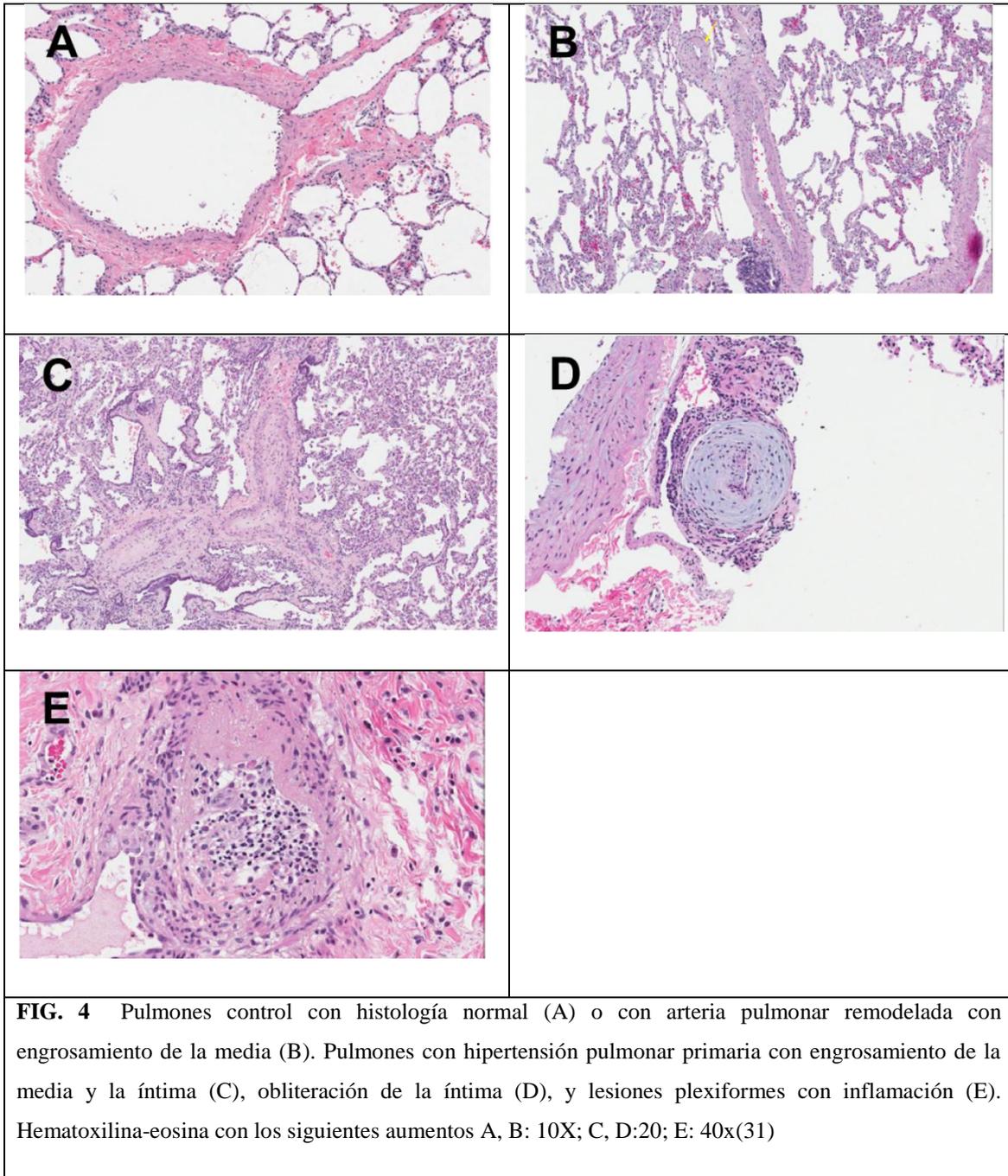
La vasoconstricción pulmonar se cree que es un componente temprano del proceso de hipertensión pulmonar. La vasoconstricción excesiva se ha relacionado con la disfunción o expresión anormales de los canales de potasio y a la disfunción endotelial. Dicha disfunción endotelial crónica conduce a la alteración en la producción de vasodilatadores como el óxido nítrico y la prostaciclina. Por el contrario lleva a la sobreexpresión de vasoconstrictores como la endotelina 1 (ET-1).

Muchas de estas anomalías no sólo elevan el tono vascular y promueven la remodelación vascular sino que se convierten en posibles dianas para el tratamiento con fármacos. Los estudios genéticos y fisiopatológicos recientes han enfatizado la relevancia de varios mediadores sobre los que se puede actuar: la prostaciclina, óxido nítrico, ET-1, angiopoyetina-1, serotonina, citocinas, quimiocinas, y miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformador-beta (TGF β). También es evidente, en la hipertensión pulmonar, una proteólisis desordenada de la matriz extracelular (26).

A nivel anatomopatológico la hipertensión pulmonar se caracteriza por cambios celulares y estructurales en las paredes de las arterias pulmonares. Es frecuente observar engrosamiento y fibrosis de la íntima, hipertrofia de la media y proliferación de fibroblastos en la adventicia. Del mismo modo, es frecuente detectar la extensión del músculo liso a vasos que previamente no tenían capa muscular. La mayoría de estos cambios se asocian con la mayor presencia de células α -actina de músculo liso (α -SMA) y de células inflamatorias (26-29)

También se describe la abundancia, atípica, de células endoteliales con funcionalidad distinta, en particular en la capa íntima (lesiones plexiforme) así como en las regiones peri vasculares(30, 31)(figura 4). Ni el origen de estas células ni los mecanismos moleculares responsables de su acumulación en cualquiera de los tres compartimentos está completamente estudiado (32)

Los cambios estructurales y funcionales de los vasos pulmonares provocan un aumento de la resistencia vascular pulmonar. Se trata de un proceso multifactorial y complejo que implica diferentes vías patológicas y múltiples mediadores. El proceso de remodelado se acompaña de disfunción endotelial, activación de fibroblastos y células musculares lisas e interacciones entre diferentes tipos celulares en la pared vascular (24, 33-36).



Entre los mecanismos moleculares que intervienen en dicha patología, tanto el factor de crecimiento tumoral beta 1 (TGF- β 1), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), la endotelina 1 (ET-1) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) contribuyen en el proceso fibrótico mediante la transformación y activación de fibroblastos a miofibroblastos, así como la transformación de células epiteliales que se asocian al desarrollo de hipertensión pulmonar en la fibrosis pulmonar.

Por el contrario, otros mediadores celulares como el óxido nítrico (NO), BMPR2, y la prostaciclina median efectos protectores antiproliferativos y anti remodelado vascular y pulmonar (36, 37). El incremento del estrés oxidativo contribuye al remodelado pulmonar característico de la fibrosis pulmonar (38, 39). En este sentido, se sabe que la generación de radicales libres del oxígeno da lugar al desacoplamiento de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) reduciendo la liberación de NO, al paso de células alveolares tipo II o células epiteliales bronquiales a miofibroblastos, a la transformación de músculo liso bronquial y vascular a miofibroblastos así como a la transformación de células endoteliales de arteria pulmonar a miofibroblastos, lo cual contribuye a la progresión de la fibrosis pulmonar y a la hipertrofia de la capa íntima de la arteria pulmonar. Todo este proceso se denomina remodelado pulmonar y está directamente relacionado con el endotelial. Esta reducción de la liberación endotelial de óxido nítrico generalmente cursa con un aumento en la liberación de ET-1, Tromboxano A2 (TXA2) y TGF- β 1 dando lugar a la disfunción endotelial, transformación de fibroblastos, células endoteliales o musculares a miofibroblastos y contribuyendo así al remodelado vascular pulmonar y a la producción de hipertensión pulmonar en el contexto de fibrosis pulmonar.

Hipertensión pulmonar en la patología intersticial difusa

La hipertensión pulmonar como complicación de las enfermedades intersticiales se incluye en la Organización Mundial de la Salud (OMS) como Clase 3 (hipoxia asociada a HP) (17, 23)

La detección de hipertensión pulmonar en estas enfermedades es marcador de mal pronóstico. En un estudio de 99 pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la mediana de supervivencia de los pacientes en los que se calculó, con ecocardiografía transtorácica (ETT), una presión sistólica de la arteria pulmonar estimada (SPAP) mayor de 50mmHg fue menor de un año(Figura 5) (25).

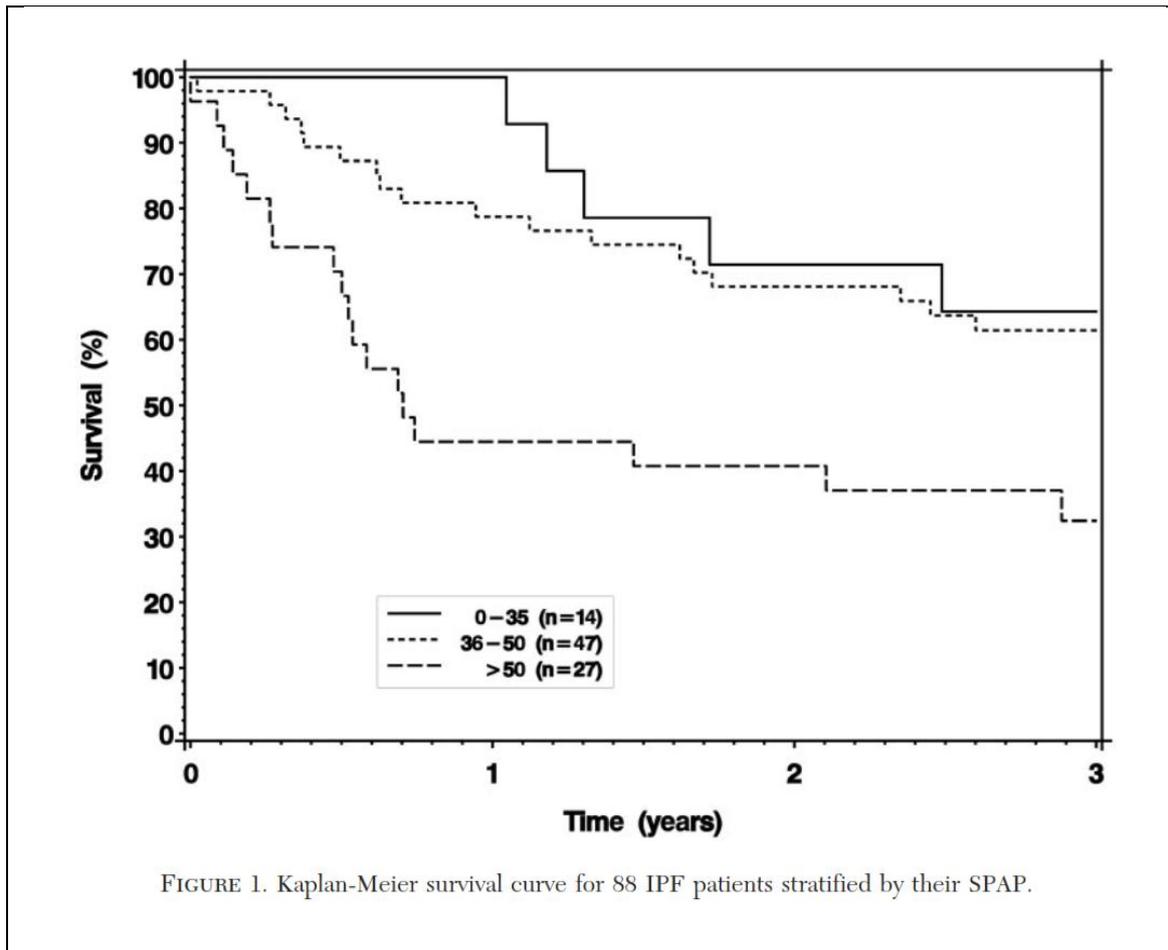


FIGURE 1. Kaplan-Meier survival curve for 88 IPF patients stratified by their SPAP.

FIG. 5 Curva de supervivencia Kaplan-Meier de 88 pacientes con FPI estratificados conforme a la presión arterial pulmonar sistólica.(25)

En otro estudio, pacientes con FPI remitidos a trasplante pulmonar, a los que se les hace en el estudio pre trasplante un cateterismo cardíaco derecho y por tanto era conocida la presión arterial pulmonar real, se vio que: cuando la presión media de la arteria pulmonar fue mayor de 25 mmHg se asoció con una supervivencia media de dos años(40) . Por ello los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática que desarrollan hipertensión pulmonar consideraban que debían ser remitidos a Unidades de Trasplante Pulmonar. En el estudio de Shorr, publicado en 2007 se estudian los pacientes ya incluidos en lista de trasplante pulmonar afectados de FPI y se comprueba que con los mismos parámetros de función respiratoria, unos pacientes desarrollan hipertensión y otros no, siendo esta una variable independiente de mortalidad (Figura 6).

TABLE 1 Correlates of pulmonary hypertension					
Variable	$\bar{P}_{pa} < 25$ mmHg	$\bar{P}_{pa} \geq 25$ mmHg	$\bar{P}_{pa} > 40$ mmHg	p-value [#]	p-value [*]
Subjects n	1362	932	231		
Demographics					
Age yrs	54.0 ± 8.7	53.4 ± 8.5	49.9 ± 9.2	0.040	<0.0001
Male	60.9	62.8	58.7	0.360	0.560
African-American	9.0	11.8	19.1	0.030	<0.0001
BMI kg·m ⁻²	27.7 ± 4.8	28.7 ± 5.1	27.7 ± 5.2	<0.0001	0.870
Pulmonary function					
FVC % pred	49.6 ± 15.7	48.4 ± 16.7	51.4 ± 20.8	0.020	0.610
FEV1 % pred	52.7 ± 16.5	50.0 ± 16.5	51.5 ± 19.0	<0.0001	0.30
P _a CO ₂ mmHg	40.5 ± 5.7	41.2 ± 6.9	38.7 ± 7.8	0.150	<0.001
6-min walk distance <45 m	10.3	13.9	21.1	0.010	<0.0001
Any need for O ₂	75.9	86.0	92.8	<0.0001	<0.0001
Any need for ≥3 L·min ⁻¹ O ₂	37.3	51.4	65.4	<0.0001	<0.0001
O ₂ used L·min ⁻¹	2.3 ± 1.9	2.9 ± 2.1	3.5 ± 2.4	<0.0001	<0.0001
Functional status					
Some or total ADL assistance	56.7	63.3	74.4	0.001	<0.0001
Hospitalised	3.9	5.1	9.7	0.170	<0.0001
In intensive care unit	1.4	2.3	4.0	0.140	0.010
Comorbid illnesses					
COPD	12.4	15.7	16.2	0.030	0.0130
Hypertension	18.1	21.6	22.8	0.040	0.011
Diabetes	10.4	13.0	7.5	0.060	0.150
Corticosteroids	60.5	63.4	58.4	0.170	0.560
Haemodynamic monitoring					
Cardiac index L·min ⁻¹ ·m ⁻²	2.8 ± 0.7	2.8 ± 0.8	2.5 ± 0.9	0.82	<0.0001
\bar{P}_{pcw} mmHg	8.3 ± 4.2	12.1 ± 5.5	14.0 ± 8.2	<0.0001	<0.0001

Data are presented as mean ± SD or %, unless otherwise stated. \bar{P}_{pa} : mean pulmonary artery pressure; BMI: body mass index; FVC: forced vital capacity; % pred: % predicted; FEV1: forced expiratory volume in one second; P_aCO₂: carbon dioxide arterial tension; ADL: activities of daily living; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; \bar{P}_{pcw} : pulmonary capillary wedge pressure. [#]: $\bar{P}_{pa} > 25$ versus ≤ 25 mmHg; ^{*}: $\bar{P}_{pa} > 40$ versus ≤ 25 mmHg. n=2,525. 1 kPa=0.133 mmHg.

Fig. 6 Tabla obtenida del estudio de Shorr de 2007 la comparación de diversas variables entre los grupos de pacientes con diferentes grados de presión arterial pulmonar. (41)

La prevalencia de la hipertensión pulmonar en las patologías intersticiales difusas varía entre el 8% y el 80%, dependiendo del método de detección empleado y del estadio de la enfermedad (7, 40, 42, 43). Debido al mal pronóstico y la gravedad de la hipertensión pulmonar en la patología intersticial pulmonar, la investigación farmacológica en este campo puede ser de interés potencial para mejorar su progresión.

La etiología de la HP en la patología intersticial pulmonar (ILD) no está del todo aclarada, pudiendo ser el resultado del proceso fibrótico en sí, de las anomalías vasculares intrínsecas, del proceso subyacente, o de la presencia de comorbilidad añadida.

Biopatología de la hipertensión pulmonar en la patología intersticial difusa

La biopatología de la HP en ILD refleja un proceso multifactorial y complejo que implica varias rutas diferentes y mediadores. Como los capilares pulmonares atraviesan el intersticio del pulmón, la inflamación y fibrosis del intersticio puede afectar al lecho vascular. Al iniciarse el patrón en panal pulmonar, se observa enfermedad vascular consistente, en gran parte, en la muscularización. Conforme se desarrolla el pulmón en panal, llega una etapa de atrofia vascular fibrosa y ablación. Ésta se caracteriza por la fibrosis pronunciada de la íntima y la recanalización de trombos. Se genera así una atrofia fibrosa de la media y finalmente la ablación fibrosa de los vasos afectados(44). La ablación vascular reduce el calibre global del lecho vascular, aumenta la resistencia vascular pulmonar, y genera hipertensión pulmonar. Además, la fibrosis perivascular puede influir en la distensibilidad de los vasos pulmonares, posiblemente aumentando la resistencia vascular y con ello también la presión arterial pulmonar. La ubicación del proceso fibrótico también puede jugar un papel en la génesis de la hipertensión pulmonar; por ejemplo, en la FPI, el proceso fibrótico se produce principalmente en una distribución subpleural con una predilección por las bases pulmonares.

Los vasos sanguíneos en sí mismos pueden participar en la génesis de la HP a través de un mecanismo independiente del proceso fibrótico. Por ejemplo, la neovascularización aberrante en la FPI puede alterar la distensibilidad vascular o aumentar la resistencia vascular de los vasos pulmonares que conducen a HP. Investigaciones en humanos y en animales de lesión pulmonar y fibrosis demuestran la regulación positiva de los inhibidores de la proteasa(45), que conduce a la hipercoagulabilidad, la supresión de la fibrinólisis, y, posiblemente, eventos trombóticos; por lo tanto, los pacientes con fibrosis pulmonar tienen una tendencia protrombótica con una propensión a formar microtrombos que a su vez puede contribuir a la génesis de HP (45, 46).

Se han descrito trastornos en las citocinas similares en la fibrosis pulmonar y la hipertensión pulmonar primaria (por ejemplo, factor de crecimiento tumoral β (TGF- β), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), endotelina-1 (ET-1)), lo que sugiere que estos trastornos comparten características patogénicas y que uno puede influir, generar o perpetuar la otra. La disfunción de la célula endotelial pulmonar en ILD puede manifestarse como una mayor síntesis de ET-1, TGF- β y el factor de crecimiento

derivado de plaquetas (PDGF) (34), o disminuyendo la síntesis de vasodilatadores y moléculas anti-proliferación de las células musculares lisas (SMC), tales como el óxido nítrico (NO) o prostaciclina(36). Análisis con microarray realizados en 13 pacientes con FPI e HP revelaron que los genes infra expresados incluyen factores angiogénicos tales como factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y moléculas de adhesión endotelial de plaquetas, así como factores que afectan el tono de los vasos tales como la enzima convertidora de angiotensina y ET-1 . Entre los genes sobreexpresados se encontraron fosfolipasa A2 y otros factores que median la remodelación. La disminución de los factores angiogénicos y el aumento de los genes inflamatorios y de remodelación pueden reflejar una alteración fundamental en el fenotipo de células vasculares en la FPI que puede contribuir al desarrollo de HP (37). Entre los diferentes procesos celulares característicos del remodelado que se produce en la hipertensión pulmonar asociada a las enfermedades intersticiales podemos encontrar la disfunción endotelial, la transición de endotelio a mesénquima, la proliferación de células musculares lisas y fibroblastos en la arteria pulmonar y la transición de fibroblastos a miofibroblastos.

Papel del TGF- β en la Hipertensión pulmonar asociada a patología intersticial

Los estudios que demuestran la relación de la superfamilia TGF- β y el daño vascular sugieren la posible conexión entre la superfamilia TGF- β y la Hipertensión pulmonar asociada a patología intersticial.

La reestenosis vascular tras colocación de stents ha demostrado que TGF- β estimula la hiperplasia de la nueva íntima y la acumulación de matriz extracelular por interacción directa o indirecta con las células endoteliales, células inmunes, fibroblastos y SMCs (33). El desbalance por el aumento de señal de TGF- β (considerado el acelerador del remodelado vascular) comparado con el descenso de activación de señal del Bone morphogenetic protein receptor type 2 (BMPR2) (considerado el inhibidor del remodelado vascular) finalmente produce Hipertensión Pulmonar.

Papel de la PDE5 en la Hipertensión Pulmonar asociada a patología intersticial

Los pacientes con FPI severa presentan anomalías del circuito vascular pulmonar marcados por la presencia de niveles bajos tanto en reposo como la inducida por ejercicio de la producción de Óxido Nítrico. Puesto que el óxido nítrico es un potente vasodilatador pulmonar, los niveles reducidos se asocian con la vasoconstricción pulmonar y la alteración del intercambio gaseoso.

El Sildenafil es un inhibidor de la fofodiesterasa-5 (PDE5) que estabiliza el segundo mensajero del óxido nítrico, guanosin monofosfato cíclico (GMPc), que conduce a la vasodilatación pulmonar. Dicha vasodilatación podría mejorar el cociente ventilación-perfusión y por lo tanto el intercambio gaseoso en pacientes con FPI. Sildenafil parece reducir la disfunción endotelial y la apoptosis (47), y también se ha descubierto que sildenafil reduce la fibrosis inducida por bleomicina en estudios con ratas (48). Más recientemente, sildenafil se ha ensayado en humanos con FPI mostrando una mejoría del grado de disnea y calidad de vida. Por todo ello sildenafil podría ser un potencial tratamiento de la Hipertensión Pulmonar asociada a patología intersticial.

Descubrimiento del papel del NO

La investigación sobre un nuevo mecanismo de señalización que involucra NO se inició a finales de 1970, cuando Robert Furchgott, Presidente del Departamento de Farmacología de la Universidad Estatal de Nueva York Health Science Center en Brooklyn, NY, describió por primera vez el papel de las células endoteliales en la regulación del tono vascular. Furchgott observó un hallazgo paradójico. Consciente de que la acetilcolina (ACh) era un potente dilatador in vivo y en órganos ex vivo, observó sorprendentemente que la ACh provocaba una respuesta contráctil de la tira aórtica (Furchgott y Bhadrakom, 1953). Este efecto anómalo de ACh siguió siendo un enigma hasta 1978, cuando debido a un error involuntario hecho por su técnico, Furchgott encontró que los agonistas muscarínicos provocaban la relajación si la preparación era pretratada con un agente contráctil tal como norepinephrine. Furchgott pareció resolver la aparente paradoja cuando observó que eliminando el endotelio de los vasos abolió la respuesta de relajación inducida por ACh tras el pretratamiento con norepinefrina. Determinó además por análisis microscópico que el raspado de la superficie intimal

causaba la anulación de la respuesta de relajación por la pérdida de células endoteliales de la tira aórtica. Utilizando el denominado "procedimiento en sándwich", Furchgott reforzó sus conclusiones demostrando que una tira transversal de aorta desprovista de células endoteliales se relajaba después de la exposición a ACh si estaba montada con su superficie libre de endotelio colocada contra una superficie íntima de una segunda tira con células endoteliales

Sobre la base de estos experimentos, Furchgott propuso en 1982 que ACh interactuaba con los receptores muscarínicos en la superficie de las células endoteliales para provocar la liberación de una sustancia desconocida del endotelio. Esta sustancia se difundiría entonces a las células musculares lisas cercanas para inducir la relajación. Él nombró a este relajante del músculo liso Factor relajante endotelial (EDRF). Furchgott amplió estos hallazgos determinando que la histamina, la serotonina y la bradiquinina también podrían servir como agentes relajantes dependientes del endotelio en el músculo liso vascular.

Basándose en el conocimiento de que en ciertas preparaciones de músculo liso había una relación positiva entre los niveles de GMPc y la relajación, Furchgott propuso eventualmente una vía en la que la liberación de EDRF inducida por ACh estimulaba la guanilil ciclasa del músculo liso vascular, causando un aumento de GMPc. Esta secuencia de eventos de alguna manera proporcionaba la señal para provocar la relajación del músculo liso. Esta teoría iba a ganar en importancia a medida que pasaba el tiempo, y la evidencia en su favor fue creciendo gradualmente. El vínculo entre GMPc y la relajación del músculo liso también derivó del apoyo de estudios realizados por varios grupos, incluyendo los de Ferid Murad y Louis Ignarro. Utilizaron arteria coronaria y pulmonar bovina, así como aorta de conejo, para proporcionar la evidencia que daba un papel causal para el GMPc en la relajación de la musculatura lisa vascular. Sin embargo, la identidad de EDRF seguía sin ser conocida.

En 1976, Louis Ignarro y sus asociados en la Universidad de California en los Ángeles proporcionaron una importante contribución al papel que el NO juega en la relajación del músculo liso. Demostraron que la nitroglicerina liberaba el NO como parte de su acción y que la relajación inducida por NO de una preparación de arteria coronaria bovina estaba asociada con un aumento en los niveles de GMPc. Cuando en 1979

Ignarro y su equipo confirmaron la hipótesis de trabajo hecha por Murad y compañeros de que los compuestos del nitrógeno provocaban una relajación de la célula muscular lisa en relación al GMPc mediante la liberación de NO, llegaron a la conclusión de que el efecto relajante de la ACh fue farmacológicamente similar a la del NO(49). Se llevó a cabo otra serie de experimentos para probar la hipótesis aún no publicada de que el factor relajante derivado del endotelio podría ser el NO. Utilizando una preparación en cascada de bioensayo similar a los utilizados por Gaddum, Burn y Vane, Ignarro y sus colegas compararon las propiedades químicas y farmacológicas del factor relajante derivado del endotelio y el NO. Estos experimentos revelaron sorprendentes similitudes entre las dos sustancias, lo que indujo a Ignarro en julio de 1986 a proponer independientemente de Furchgott que el Factor Relajante Endotelial era el NO.

Un experimento adicional realizado por el grupo de Ignarro proporcionó la prueba final de la identidad del factor relajante derivado del endotelio. Encontraron que producía un cambio espectral en la hemoglobina reducida que era idéntico al cambio producido por el NO auténtico (50). A pesar de su indeleble influencia en los descubrimientos asociados al NO como mediador celular, Ignarro admitió que él y su grupo iniciaron su investigación de la relajación dependiente del endotelio en 1983, no porque creyeran que el EDRF podría ser NO, sino debido a la suposición de que GMPc desempeñaba un papel en el proceso de relajación muscular. Por lo tanto, una vez más, la serendipia jugó un papel clave en un descubrimiento de gran importancia.

El trabajo de Furchgott, Murad e Ignarro tuvo ramificaciones de gran alcance tanto desde una perspectiva heurística como terapéutica. El descubrimiento del NO como vasodilatador representó la aparición de un nuevo proceso biológico. Este proceso implicaba un gas producido endógenamente que servía como una molécula de señalización. La generación de NO conduce a la activación o inhibición de múltiples efectores, incluyendo relajación muscular, neurotransmisión, función renal, reacciones de defensa del huésped y función cerebral. Además, la utilización del NO como agente terapéutico ha dado a los médicos la oportunidad de realizar avances significativos en el diagnóstico, tratamiento y prevención de los trastornos cardiopulmonares en los pacientes neonatos y pediátricos. En los adultos, la producción alterada de NO está asociada con una variedad de trastornos cardiovasculares crónicos, así como con enfermedades metabólicas, inflamatorias y neuronales. Como resultado, la investigación dedicada a dirigir la entrega de fármacos al endotelio está disfrutando actualmente de

una ola de interés. A este respecto, el comentario profético de Furchgott a principios de los años ochenta merece el siguiente relato: "... una vez que se ha dilucidado la fuente, la identidad química y el mecanismo de acción de la sustancia (o sustancias) relajante derivada del endotelio, deberemos tener, por fortuna, una nueva base para el desarrollo de fármacos que son útiles en el tratamiento de ciertos trastornos circulatorios "(Furchgott, 1981).(51)

Además, los estudios de Ignarro y sus colegas arrojaron luz sobre una vía de transducción de señal que es modulada por fármacos para controlar la impotencia. Un enfoque muy exitoso para tratar este trastorno con Sildenafil basada en la mejora de los efectos del NO mediante la inhibición selectiva de la fosfodiesterasa-5 en el cuerpo cavernoso (músculo liso) del pene. Como resultado, GMPc se deja acumular, causando la vasodilatación del cuerpo cavernoso. Por ello, Robert Furchgott, Ferid Murad y Louis Ignarro recibieron conjuntamente el Premio Nobel de Medicina en reconocimiento a sus inestimables logros científicos, que proporcionaron grandes avances conceptuales en nuestra comprensión de los mecanismos cardiovasculares básicos y al mismo tiempo aumentaron las oportunidades para el desarrollo de fármacos.(51)

Descripción del NO

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa resultante de la combinación de un átomo de oxígeno y otro de nitrógeno. Se sintetiza en la mayoría de células del organismo a partir del aminoácido L-arginina y participa en la regulación del tono vascular, actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico, y media la citotoxicidad del macrófago en la defensa inmunitaria inespecífica. También se ha relacionado con la regulación bioenergética celular por su actuación sobre la mitocondria. Esta diversidad de funciones biológicas reguladas por el NO resulta difícil de relacionar con la simplicidad de su molécula; sin embargo, está en proporción tanto con su elevada reactividad, por presentar un electrón desemparejado, como por la complejidad de la óxido nítrico sintasa (NOS), enzima responsable de su síntesis.

Óxido nítrico sintasa: es una flavoproteína con estructura dimérica. El dominio oxigenasa tiene lugares de unión para la L-arginina, el grupo hemo y la tetrahidrobiopterina (BH₄), y está conectado a través de un lugar de reconocimiento

para la calmodulina al dominio reductasa, que contiene lugares de unión para el flavín adenín dinucleótido (FAD), Flavín mononucleótido (FMN) y Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Se han descrito tres isoenzimas de la NOS que proceden de genes distintos. La NOS endotelial (NOSe), la NOS neuronal (NOSn) y la NOS inducible (NOSi).

Las NOSe se expresa preferentemente de forma constitutiva y sintetiza pequeñas cantidades de NO de forma continua. Se localiza en las células endoteliales, plaquetas y células mesangiales renales. Está implicada en la regulación de la homeostasia vascular. La actividad de la NOS se regula mediante modificaciones postranscripcionales, y se considera que la más importante es su unión a la calmodulina. Dicha unión en el caso de la NOSe depende de la concentración de Ca^{2+} , siendo este ión el principal regulador de su actividad. Otro mecanismo de regulación lo constituye la fosforilación de la NOS por una proteincinasa en respuesta al flujo pulsátil y que conduce a un incremento de la actividad enzimática. Por último se ha sugerido que el propio NO, a través de un mecanismo de retroalimentación negativa, regula su propia síntesis inhibiendo la actividad de la NOS

La NOS cataliza la producción de NO a partir de la oxidación de un nitrógeno guanidino terminal de la L-arginina, en una compleja reacción en la que el O_2 y el NADPH actúan como cosustratos; el FAD, El FMN, el BH_4 y el grupo hemo actúan como cofactores redox. Inicialmente y tras oxidación del NADPH, los electrones son transferidos hacia las flavinas en el dominio reductasa, donde la unión de la calmodulina permite la transferencia de electrones al dominio oxigenasa. La interacción de los electrones con el ión hierro del grupo hemo en el lugar catalítico de la enzima permite la reacción de la L-arginina con el O_2 dando lugar a NO y citrulina.

La vida media del NO es muy corta (segundos) en sistemas biológicos. En condiciones fisiológicas reacciona con el oxígeno, dando lugar a la formación de nitritos, principal vía de eliminación de este mediador. A su vez, la rápida reacción del NO con grupos tiol actúa como mecanismo de transporte y de inactivación. En algunas circunstancias también es capaz de interactuar con diversos radicales libres de O_2 formando especies reactivas de nitrógeno.

Mecanismo acción NO

A diferencia de la mayoría de las moléculas que transmiten información entre células, el NO no es almacenado ni transportado de forma especializada. Se sintetiza en respuesta a un estímulo y, gracias a sus propiedades fisicoquímicas, se difunde a través de las membranas biológicas, tras lo cual reacciona con diversas dianas intracelulares, como son metales de transición, grupos tiol y amina, oxígeno, superóxido y otros radicales libres. En condiciones fisiológicas las células sintetizan bajas cantidades de NO en un ambiente pobre en radicales libres, por lo que la acción directa del NO determina la respuesta celular funcional. En particular debemos destacar la activación de la guanilil ciclasa soluble por unión con el ión hierro en forma de hemo de la enzima, con el consiguiente incremento en los niveles de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y la activación de proteincinasas, fosfodiesterasas y canales iónicos.

Efectos cardiovasculares ONe

El ON de origen endotelial desempeña un papel fundamental como relajante vascular, participando en la vasodilatación inducida por estímulos mecánicos, como el estrés por cizallamiento, o estímulos químicos, como la acetilcolina o la bradicinina. Una vez sintetizado, difunde al músculo liso vascular activando la guanilil ciclasa soluble e incrementando los niveles de GMPc. Además, el NO inhibe la proliferación de células de músculo liso vascular y previene la adhesión de los leucocitos y monocitos al endotelio vascular. En las plaquetas el NO inhibe su adhesión y agregación, y modula la función del plasminógeno. Estas acciones, unidas al hecho de que la disfunción endotelial y el desarrollo de enfermedades presenta como factor común concentraciones bajas de NO, sugieren un papel crítico de este mediador en el mantenimiento de la homeostasis vascular.

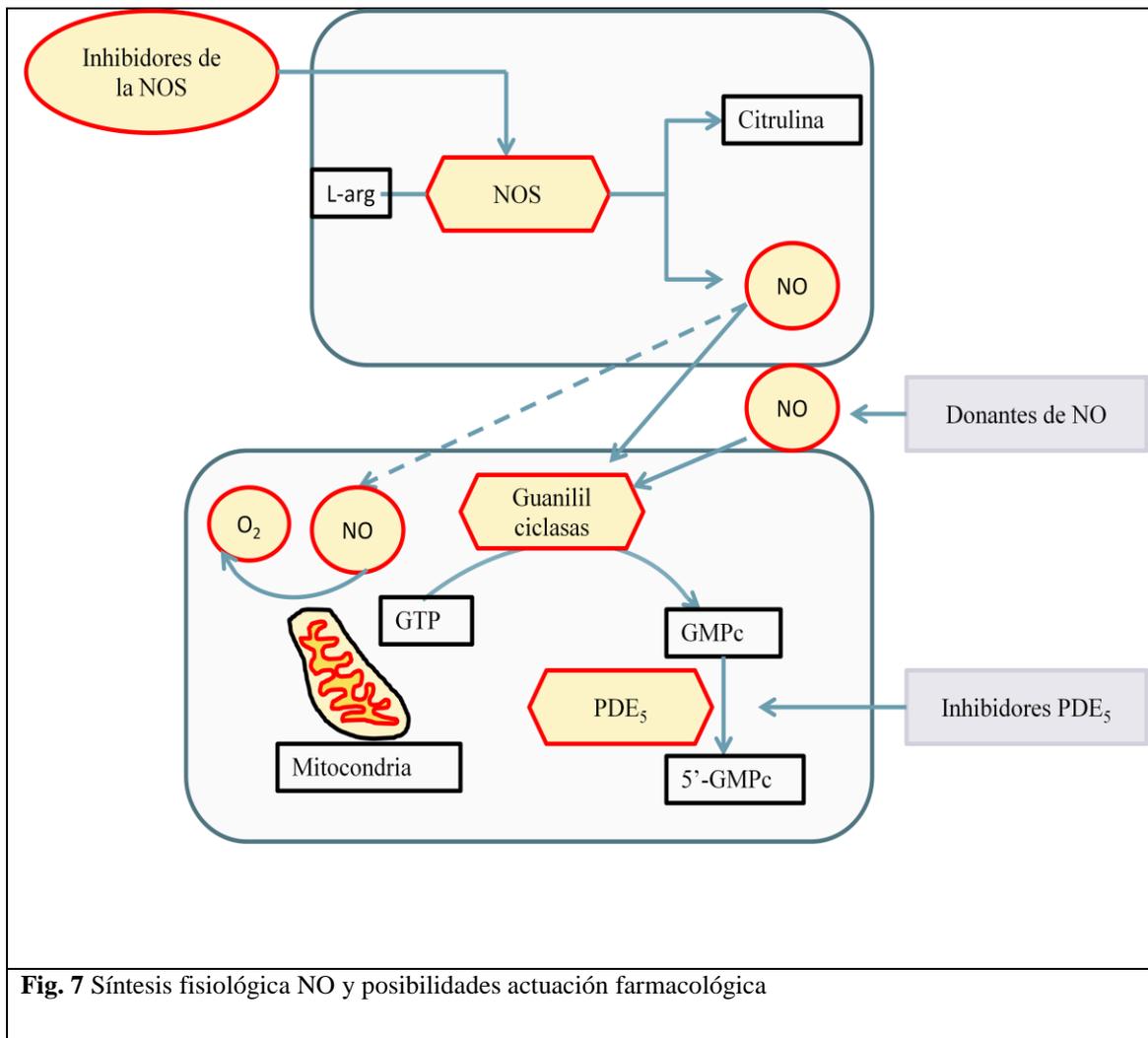


Fig. 7 Síntesis fisiológica NO y posibilidades actuación farmacológica

Inhibidores de la fosfodiesterasa 5

Las concentraciones intracelulares de GMPC vienen determinadas por el balance entre la actividad guanilil ciclasa y de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos que catalizan su degradación. Se han identificado 11 encimas fosfodiesterasas de entre las cuales, la fosfodiesterasa 5 es la principal responsable de la degradación del GMPC generado por la actuación del NO. Aunque esta enzima se expresa en diferentes órganos, desempeña un papel fundamental en las células del cuerpo cavernoso del pene, así como en células del músculo liso vascular, especialmente en el lecho pulmonar. Este grupo incluye tres principios activos cuya estructura química deriva del GMPC: el citrato de sildenafilo, vardenafilto y tadalafilto. Todos ellos comparten un mismo mecanismo de acción y difieren en algunas propiedades farmacocinéticas.

Mecanismo de acción y efectos farmacológicos inhibidores PDE5:

Inhiben la enzima PDE5 de forma reversible y competitiva con el GMPc. Como consecuencia inducen relajación de la musculatura cavernosa y vascular con la consiguiente vasodilatación y erección penénea. De forma paralela se produce una ligera vasodilatación sistémica. Además, reducen la resistencia vascular pulmonar, de ahí el uso del sildenafil como tratamiento de la hipertensión pulmonar.

Fibrosis Pulmonar Idiopática

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI), es la enfermedad intersticial pulmonar de peor pronóstico, ya que no existe ningún tratamiento suficientemente eficaz que mejore el pronóstico de forma significativa. La terapia habitual mediante corticoides e inmunosupresores no resulta eficaz para frenar la progresión de la enfermedad(52). El enfoque terapéutico en la FPI empezó a cambiar a partir de la nueva hipótesis fisiopatológica de la enfermedad en la que se planteó el desarrollo del proceso como una alteración reparativa epitelio-mesenquimal que podía iniciarse sin una inflamación previa y donde el tratamiento anti-inflamatorio e inmunomodulador no habían demostrado modificar el curso evolutivo de la enfermedad.(53, 54) Actualmente Nintedanib y Pirfenidona abren un futuro prometedor en el tratamiento de la FPI.

La hipertensión pulmonar, como hemos visto, es una complicación frecuente en pacientes con FPI y supone un grave empeoramiento del pronóstico. Aunque incluida en el grupo 3 (HP inducida por hipoxia) en la clasificación de la OMS, se postula, como hemos descrito anteriormente, que en ella también participan mecanismos de remodelado de las arterias pulmonares, similares a los de la HP idiopática.

La fibrosis pulmonar idiopática se caracteriza por la inflamación y cicatrización de los alvéolos y del intersticio, produciéndose una pérdida de las unidades funcionales alveolares y una reducción en la transferencia de oxígeno a la sangre.

La clínica y el diagnóstico de la FPI está bien consensuada y establecida(55, 56). Por el contrario, se desconocen las causas precisas que la provocan, pero se sabe que la lesión pulmonar y el exceso de tejido fibrótico tienen un papel clave en la patogénesis de la enfermedad.

La FPI afecta a 5 millones de personas en todo el mundo de edades comprendidas entre 40 y 75 años, siendo más frecuente en hombres que en mujeres, con una incidencia de 10,7/100.000 y 7,4/100.000 y una prevalencia de 20,2/100.000 y 13,2/100.000 respectivamente, considerándose una enfermedad rara (57). Todavía no existe ningún tratamiento que consiga un aumento significativo de la supervivencia, siendo pirfenidona y nintedanib los dos únicos fármacos aprobados que han logrado mejorar el pronóstico de la enfermedad, siendo la supervivencia media de 2,8 años (58, 59), peor que la mayoría de los cánceres (35). La evolución y gravedad de la fibrosis pulmonar idiopática está condicionada por diferentes causas. Entre estas, la hipertensión pulmonar asociada a la fibrosis pulmonar es un factor de mal pronóstico y de rápida evolución de la enfermedad. La prevalencia de hipertensión pulmonar en la fibrosis pulmonar varía entre el 8% y el 80% según el método utilizado (40). Debido al mal pronóstico y severidad de la hipertensión pulmonar asociada a la fibrosis pulmonar, la investigación farmacológica en este campo se considera de especial interés.

La etiología de la hipertensión pulmonar asociada a la fibrosis pulmonar puede sobrevenir por el mismo proceso fibrótico, por anomalías vasculares intrínsecas o por la presencia de comorbilidades (44).

Entre los mecanismos moleculares que intervienen en dicha patología, tanto el factor de crecimiento tumoral beta 1 (TGF- β 1), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), la endotelina 1 (ET-1) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) contribuyen en el proceso fibrótico mediante la transformación y activación de fibroblastos a miofibroblastos, la transformación de células epiteliales alveolares tipo II o células epiteliales bronquiales a miofibroblastos, la transformación de músculo liso bronquial y vascular a miofibroblastos así como a la transformación de células endoteliales de arteria pulmonar a miofibroblastos, lo cual contribuye a la progresión de la fibrosis pulmonar y a la hipertrofia de la capa íntima de la arteria pulmonar (34). Todo este proceso se denomina remodelado pulmonar y está directamente relacionado con el desarrollo de la hipertensión pulmonar asociada a la fibrosis pulmonar. Por el

contrario, otros mediadores celulares como el óxido nítrico (NO), BMPR2, y la prostaciclina median efectos protectores antiproliferativos y antiremodelado vascular y pulmonar (36, 37). El incremento del estrés oxidativo contribuye al remodelado pulmonar característico de la fibrosis pulmonar (38, 39). En este sentido, se sabe que la generación de radicales libres del oxígeno da lugar al desacoplamiento de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) reduciendo la liberación de óxido nítrico endotelial. Esta reducción de la liberación endotelial de óxido nítrico generalmente cursa con un aumento en la liberación de ET-1, Tromboxano A2 (TXA2) y TGF- β 1 dando lugar a la disfunción endotelial, transformación de fibroblastos, células endoteliales o musculares a miofibroblastos y contribuyendo así al remodelado vascular pulmonar y a la producción de hipertensión pulmonar en el contexto de fibrosis pulmonar. Por tanto, el hecho de inhibir el desacoplamiento de eNOS en las células endoteliales de las arterias pulmonares de pacientes con fibrosis pulmonar, podría mejorar el pronóstico y la evolución de dicha enfermedad.

Papel del TGF β en la Fibrosis Pulmonar Idiopática

La hipótesis prevalente de la génesis de la FPI sugiere que los eventos iniciales implicados en la patogénesis serían lesiones microscópicas del epitelio alveolar que provocarían daño celular y una reepitelización y reparación posterior anormales (60) así como un incremento de la producción de mediadores fibrogénicos en particular el TGF- β por células inflamatorias y epiteliales.(61)

Como consecuencia las células epiteliales y endoteliales adquieren fenotipos de mesénquima(53), se reclutan fibrocitos circulantes y células madre procedentes de médula ósea, los fibroblastos del mismo tejido pulmonar se activan, migran y proliferan diferenciándose en miofibroblastos activados, lo que promueve el excesivo aumento de matriz extracelular y el anormal acumulo de colágeno.

TGF β es una de las citocinas profibróticas más estudiadas. En los pulmones, TGF β es producido por una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo macrófagos alveolares, neutrófilos, células epiteliales alveolares activadas, células endoteliales, fibroblastos y miofibroblastos. Cuando se activa, TGF β es un factor de crecimiento pleiotrópico con propiedades quimiotácticas y proliferativas. El TGF β induce el reclutamiento de macrófagos y fibroblastos, así como la proliferación de fibroblastos a través de la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). En estas células, el TGF β también estimula la expresión de varias citocinas proinflamatorias y

fibrogénicas, tales como TNF- α , PDGF, IL-1b o IL-13, incrementando y perpetuando de ese modo la respuesta fibrótica.

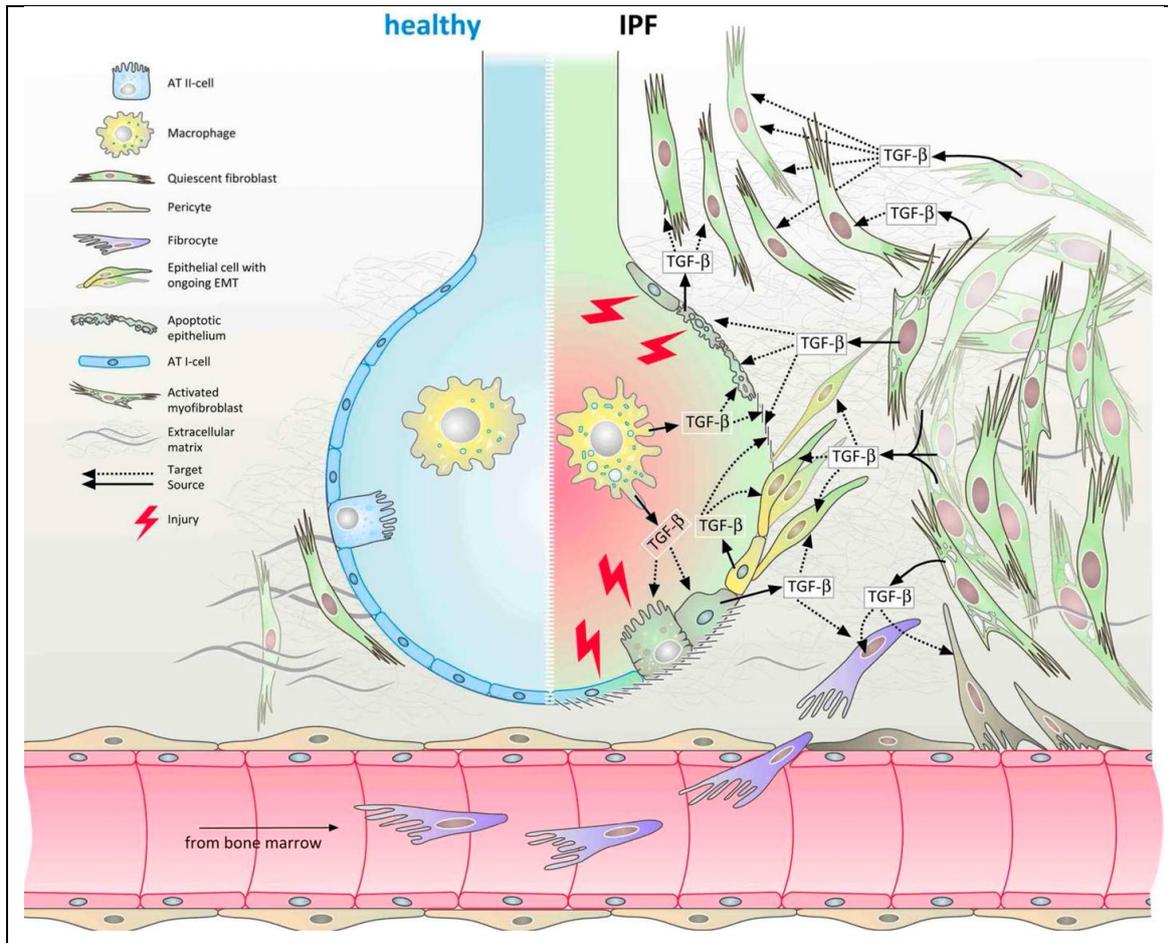


Fig. 8 Esquema hipotético sobre el papel del TGF- β en la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y las fuentes potenciales de miofibroblastos activados. Las múltiples microlesiones presuntas del epitelio alveolar inducen apoptosis de células de tipo alveolar (AT) I y ATII, disrupción de la membrana basal y producción de TGF- β en macrófagos, células epiteliales o miofibroblastos activados. Esto perpetúa el proceso aberrante de curación de heridas al inducir la producción de matriz extracelular, promoviendo el reclutamiento y activación de miofibroblastos por parte de fibroblastos pulmonares residentes, células epiteliales y endoteliales sometidas a cambios de tipo mesenquimal (EMT y EndoMT), fibrocitos derivados de médula ósea o pericitos de los vasos circundantes e intersticio.(62)

TGF- β 1 es un miembro de la superfamilia TGF β , un grupo altamente conservado de citocinas, de las cuales hay tres isoformas en mamíferos (TGF- β 1, β 2 y β 3). TGF- β 1 es una citocina pleiotrópica que se expresa de forma ubicua en todas las células y tejidos del cuerpo. La isoforma que se ha relacionado de forma más estrecha con el desarrollo de la FPI es la TGF β 1 (63)

El TGF- β 1 tiene profundos efectos sobre las células epiteliales, promoviendo la apoptosis epitelial(64), la transición epitelio-mesénquima (65) y la migración de células epiteliales (66) e inhibiendo la proliferación epitelial. El papel de TGF- β 1 se ha descrito

ampliamente en FPI. TGF- β 1 está aumentado en muestras de tejido tanto de modelos animales de FPI (67) como en pacientes con FPI (68). La sobreexpresión de TGF- β 1 activo conduce a la fibrosis pulmonar persistente(69), incluso en animales que son resistentes a la fibrosis(70), mientras que el bloqueo de la señalización de TGF- β mejora la fibrosis pulmonar en modelos de roedores (71, 72).

TGF- β 1 se sintetiza como un pequeño complejo latente que consiste en TGF- β 1 activo asociado no covalentemente con el péptido asociado a latencia (LAP), y éste se secreta a su vez en asociación con las proteínas de unión a TGF- β latentes como un gran complejo latente. La síntesis de TGF β latente puede aumentarse mediante mediadores inflamatorios tales como TNF- α (73) (74) sin embargo, queda secuestrado como una molécula inactiva, que se almacena en la matriz extracelular y necesita activarse antes de que ejerza un efecto biológico. La activación (escisión y liberación del complejo peptídico asociado a latencia y la proteína de unión a TGF- β latente) puede ocurrir a través de procesos físicos como la acidificación, los cambios extremos de temperatura y la oxidación, que pueden explicar el mecanismo por el cual el asbesto puede promover la fibrosis pulmonar (75). El TGF β también puede ser activado por proteasas como plasmina, triptasa, trombina, elastasa, metaloproteinasa de matriz 2 y 9 (76) y por interacciones con trombospondina-1(77) o integrinas α V β 3, α V β 5, α V β 8 y α V β 6(78). La mayoría de los mecanismos de activación de TGF- β descritos son omnipresentes; sin embargo, las integrinas han mostrado un papel importante sobre el que pivota la activación del TGF- β en los procesos fibróticos(79).

TGF β en la lesión epitelial

Se cree que la lesión repetitiva del epitelio alveolar es un evento importante desencadenante del proceso aberrante de cicatrización de las lesiones que se ven en la FPI(80). La alteración de las células epiteliales inicia la activación plaquetaria con formación de coágulos ricos en fibrina y una cascada fuerte antifibrinolítica, caracterizada por el aumento en epitelio del inhibidor del plasminógeno 1 (PAI-1), un proceso que es impulsado por TGF- β 1/Smad3(81). La inactivación de PAI-1 usando ARN pequeño de interferencia (siARN) limita el desarrollo de la fibrosis en un modelo de ratón con bleomicina(82), lo que sugiere que limitar la coagulación alveolar vía PAI-1-siRNA puede tener efectos antifibróticos directos. Los experimentos in vitro mostraron que PAI-1-siRNA inhibía la transición epitelio-mesenquimal mediada por

TGF β en líneas de células epiteliales de pulmón, lo que apoya PAI-1 como un posible objetivo terapéutico en FPI. Otra línea de evidencia apoya la asociación entre la apoptosis de células epiteliales alveolares y la fibrosis pulmonar. Aunque los mecanismos que causan la muerte celular epitelial alveolar no se conocen por completo, se sabe que el TGF β juega un papel fundamental como potente inductor de la apoptosis en las células epiteliales alveolares (83), modula la apoptosis mediada por Fas a través de la activación de caspasa-8 y regulación a la baja de p21. La proteína quinasa asociada a la muerte es esencial para la apoptosis inducida por TGF β de las células epiteliales del pulmón. La señalización vía Smad3 mediada por TGF β es necesaria para la regulación positiva de la proteína quinasa asociada a la muerte y la inducción de TIEG y Daxx, que es una proteína asociada al receptor Fas que interactúa con TGF β RII, activa la señalización vía JNK/MAPK y media la apoptosis a través de Fas. Durante la lesión, las células epiteliales están expuestas a una variedad de factores de estrés que promueven desequilibrios oxidantes-antioxidantes. Las especies de oxígeno reactivo promueven un microambiente profibrogénico al alterar el equilibrio entre las metaloproteasas y sus inhibidores (inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP)) y al activar directa o indirectamente TGF β .

TGF β produce especies reactivas de oxígeno como parte de su ruta de señalización(84). Está demostrado que la NADPH oxidasa 4 está expresada en gran cantidad en focos de fibroblastos de pacientes con FPI(85). Además, se han aislado células de pacientes con FPI que mostraban como TGF β inducía la expresión de NADPH oxidasa 4, necesaria para la inducción por TGF β de la diferenciación a miofibroblastos, la producción de matriz extracelular excesiva y la contractilidad.

En condiciones normales, se cree que las células del epitelio alveolar tipo II se diferencian en tipo I. En situaciones de estrés y lesión como las descritas anteriormente, ambos tipos de células responden con una muerte celular aumentada, con hiperplasia posterior para re-epitelizar áreas dañadas y denudadas o con matriz extracelular aumentada, sirviendo así como una posible fuente de miofibroblastos activados en el subepitelio pulmonar. El papel fundamental de las células alveolares tipo II en el desarrollo de la fibrosis se propuso al revelar que una pérdida de señalización del receptor TGF β en Las células alveolares tipo II proporciona una protección espectacular contra la fibrosis inducida por bleomicina induciendo apoptosis epitelial, disminuyendo la activación de los miofibroblastos y previniendo un desequilibrio de proteasas. Este

enfoque respalda la idea de que la señalización de TGF β en el epitelio pulmonar es un iniciador clave del proceso fibrótico(86).

La transición epitelio-mesenquimal y endotelio-mesenquimal inducidas por TGF β como fuentes de miofibroblastos activados

Los focos fibroblásticos son el sello anatomopatológico de la FPI y se caracterizan por miofibroblastos muy activos en las regiones subepiteliales, principalmente en las proximidades de las células alveolares tipo II lesionadas o hiperplásicas. El origen de estos miofibroblastos contráctiles positivos para α -actina de músculo liso (α -SMA) sigue siendo controvertido. Sin embargo, estos miofibroblastos activados se consideran los protagonistas clave en el aumento de la matriz extracelular en FPI(87). Cuatro teorías buscan explicar el origen de estas células: que los miofibroblastos activados dentro de los focos de fibroblastos derivan de los mismos fibroblastos del tejido pulmonar que proliferan y se activan, de las células alveolares tipo I o II mediante el proceso de transición de endotelio a mesénquima o fibroblastos procedentes de la médula ósea o pericitos del intersticio pulmonar (88). Otra teoría propone que una fuente de estas células pueden ser las células endoteliales que, después de ciertos estímulos, pierden sus marcadores endoteliales característicos para adquirir un fenotipo de tipo mesenquimal al expresar α -SMA y/o la proteína específica de fibroblastos-1.

La mejor explicación para el aumento de miofibroblastos en el área subepitelial lesionada y en los focos fibroblásticos se deriva del hecho de que los fibroblastos residentes quiescentes se activan, proliferan y se diferencian en un miofibroblasto altamente contráctil en respuesta a factores de crecimiento profibróticos, como TGF- β y PDGFs(89). El objetivo de la activación de fibroblastos se ha considerado una opción terapéutica importante en FPI.

Otra fuente del miofibroblasto activado son las células ATI o ATII, que, para escapar del lugar de la lesión, pierden marcadores de células epiteliales y polaridad y simultáneamente regulan al alza los marcadores mesenquimales y aumentan su motilidad, un proceso llamado transición epitelio-mesenquimal. Willis et al.(90) inicialmente demostraron que el TGF- β 1 indujo transición epitelio-mesenquimal en

células del epitelio alveolar tipo II *in vitro*, lo que ha sido confirmado por varios grupos que usan enfoques *in vitro* e *in vivo*. Además, los modelos *in vivo* han demostrado un papel central de TGF- β en la transición epitelio-mesenquimal de la fibrosis pulmonar. Kim y sus colegas demostraron, mediante la sobreexpresión de TGF- β 1 activo en el pulmón utilizando un vector adenoviral (ad-TGF- β), la presencia de transición epitelio-mesenquimal al mostrar que las células intersticiales α -SMA-positivas conservan, en un cierto porcentaje, un marcador celular de epitelio en los pulmones lesionados, demostrando transición epitelio-mesenquimal *in vivo*(65). Las vías de activación mediadas o no por Smad se ha visto que están implicadas en la transición epitelio-mesenquimal inducida por TGF- β . La activación de la señalización de Smad da como resultado la inducción de los genes diana α -SMA, colágeno, proteína específica fibroblastos 1 (PAI-1) o Factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), mientras que la inhibición de los genes epiteliales durante la transición epitelio-mesenquimal está mediada por los factores de transcripción Snail1, Snail2, Notch o Twist. La activación de la señalización de Smad también puede conducir a la activación de Akt y posterior translocación nuclear de la β -catenina, lo que conduce a un aumento de la expresión de α -SMA. Kim et al. (91)demostraron en 2009, mediante delección específica de la expresión α 3 β 1 de epitelio pulmonar en ratones, que se requería la asociación de Smad y β -catenina dependiente de α 3 β 1 para la regulación positiva de α -SMA, la diferenciación de miofibroblastos y la inducción de transición epitelio-mesenquimal. Aquí, los ratones que carecían de epitelio pulmonar α 3 β 1 estaban protegidos contra la fibrosis inducida por bleomicina. Por otro lado, las rutas de señalización no Smad inducidas por TGF- β conducen a la activación de las rutas PAR6, RhoA y PI3 / Akt, que se traducen en un desarmado de los sistemas de unión, el reordenamiento citoesquelético, la motilidad celular incrementada y la translocación nuclear de β -catenina (92).

Los fibrocitos son una fuente adicional de miofibroblastos durante el desarrollo de la FPI; estas células se definen como un grupo de células precursoras de fibroblastos derivadas de médula ósea que expresan simultáneamente marcadores estromáticos y hematológicos (CD45, CD34, colágeno 1, colágeno 3 y fibronectina)(93). De forma similar a las células epiteliales residentes y los fibroblastos, los fibrocitos responden a la diferenciación guiada por TGF- β en miofibroblastos a través de la activación de las rutas Smad2/3 y SAPK / JNK y MAPK, que estimula la expresión de α -SMA(94).

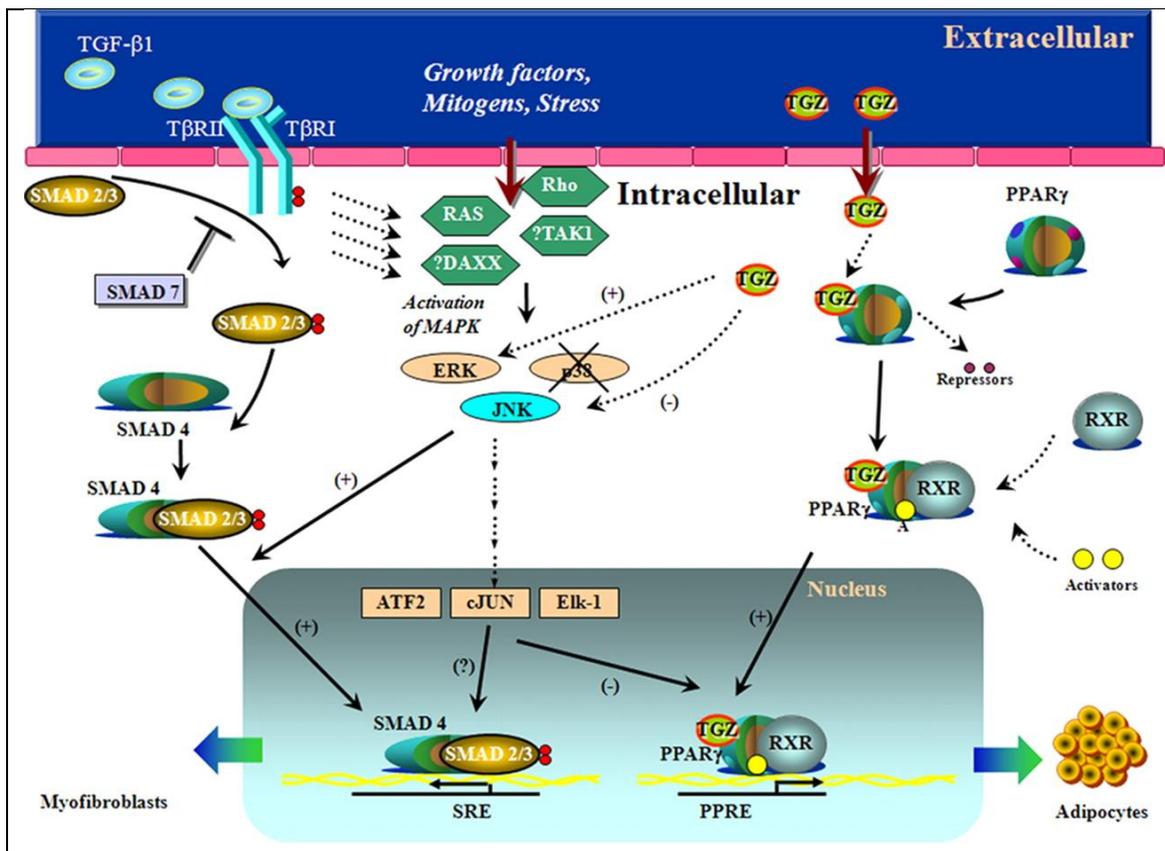


Fig. 9 Diagrama esquemático resumido que demuestra las diferentes vías de señalización que participan en la diferenciación de fibrocitos ya sea en miofibroblastos que expresan α SMA o diferenciación en adipocitos que expresan aP2. Las rutas de señalización activadas por TGF β 1, que incluyen Smad2/3 y SAPK / JNK MAPK, colaboran para inducir la transcripción de α SMA, mientras que la activación de PPAR γ mediada por TGZ conduce a la inducción de la expresión de aP2. La intercomunicación y el equilibrio complejo de TGF β con señalización de PPAR γ , en el contexto del nicho microambiental local, impulsa la selección de vías de diferenciación definidas.(94)

Hashimoto y su equipo(95) describieron un potencial y novedoso contribuyente para el pool de miofibroblastos activados al demostrar que las células endoteliales tenían la capacidad de regular negativamente los marcadores endoteliales específicos (CD31) y adquirir marcadores similares a los fibroblastos, como α -SMA o Col I, mediante la activación cooperativa de las rutas de señalización TGF- β y Ras/ERK/MAPK. Este concepto de transición endotelial-mesenquimal (EndoMT), similar a la transición epitelio-mesenquimal, se ha propuesto como una fuente adicional de miofibroblastos activados. Aunque EndoMT se ha descrito en procesos fibróticos experimentales del corazón y el riñón, se requieren investigaciones detalladas para validar estos hallazgos en el pulmón en general y en un contexto humano en particular.

La teoría más reciente del origen de los miofibroblastos en las enfermedades fibróticas se deriva de la observación de que los pericitos, células estromales que se encuentran generalmente en el entorno de las arterias precapilares, en el exterior de la membrana basal pueden ser una fuente de miofibroblastos activados según lo informado por Rock y *cía.*(96). Mediante el seguimiento específico del destino celular de las células ATII y pericitos, mostraron que los derivados de pericitos, y no las células ATII, se localizaban en focos fibroblásticos de ratones lesionados. Aquí, las células ATII pudieron transdiferenciarse en células ATI después del tratamiento con bleomicina, pero la expresión de α -SMA no se detectó en estas células, argumentando que las células epiteliales pueden no constituir una fuente de miofibroblastos. Humphreys y *cía.*(97) describieron hallazgos similares en un modelo de fibrosis renal, destacando el pericito como una célula hasta ahora infravalorada en la fibrogénesis.

A pesar del creciente número de publicaciones en los últimos años acerca de la transición de epitelio a mesénquima en la patogénesis de los trastornos fibróticos, la traducción de dicha transición a FPI humana es un desafío. Yamada y *cía.*(98) buscaron detectar coexpresión de marcadores epiteliales y mesenquimales (E-cadherina, ICAM1, LEA, CD44v9, proteína surfactante (SP)-A, α -SMA y vimentina) en secciones de pulmón de pacientes con FPI y en un modelo de ratones con bleomicina, y no pudieron detectar la tinción doble de ambos marcadores en ninguno de los dos. Se requieren más estudios para dilucidar si la transición epitelio a mesénquima o la transición de endotelio a mesénquima es un fenómeno robusto en las enfermedades fibróticas humanas.

TGF- β en la regulación de matriz extracelular

Después de las presuntas lesiones del epitelio alveolar, se acepta que las células alveolares tipo II lesionadas secretan una variedad de mediadores fibrogénicos (por ejemplo TGF- β , PDGF, Wnt o proteína de señalización 1 Wnt-1-inducible) que, en concierto, promueven la diferenciación de fibroblastos quiescentes residentes a miofibroblastos. Estos miofibroblastos secretan TGF- β , que induce la apoptosis de las células alveolares tipo II, perpetuando así el proceso aberrante de curación de heridas. Los miofibroblastos también expresan altos niveles de inhibidores de tejido de las metaloproteasas de la matriz (TIMP) y proteínas MEC, principalmente colágenos y fibronectina, promoviendo la deposición de colágeno y contribuyendo a la fibrosis.

TGF- β , a través de las vías de señalización de Smad, aumenta directamente la activación transcripcional de los genes de colágeno, en particular colágeno 1A1, -A2 y -A3; colágeno 5; y colágeno 6 (36).

Otra característica importante de TGF- β en el aumento de la deposición de la matriz extracelular es la creación de un microambiente que favorece la deposición de dicha matriz (por ejemplo, induciendo un desequilibrio entre las enzimas que degradan la matriz y sus inhibidores). Aunque su papel en la fibrosis no se ha dilucidado debido a su actividad pleiotrópica en los componentes de la matriz extracelular y receptores de superficie celular o factores de crecimiento inactivos, se ha demostrado que las metaloproteasas de la matriz contribuyen de forma importante en el desarrollo de FPI en estudios preclínicos y en animales (99). El efecto de las metaloproteasas de matriz extracelular está controlado por una familia de inhibidores (TIMPs inhibidores de las metaloproteasas de la matriz). Algunos grupos han sugerido que la MMP-7 puede tener efectos reguladores sobre la reparación epitelial al liberar TGF- β preformado de la MEC (100). Zuo y compañía (101) mostraron que la expresión de MMP-7 aumenta en pacientes con FPI y que los ratones MMP-7^{-2/2} están protegidos contra la fibrosis inducida por bleomicina. Además, Rosas y compañía (102) encontraron niveles elevados de MMP-1 y MMP-7 en el suero de pacientes con FPI, que se han confirmado en una cohorte de validación independiente.

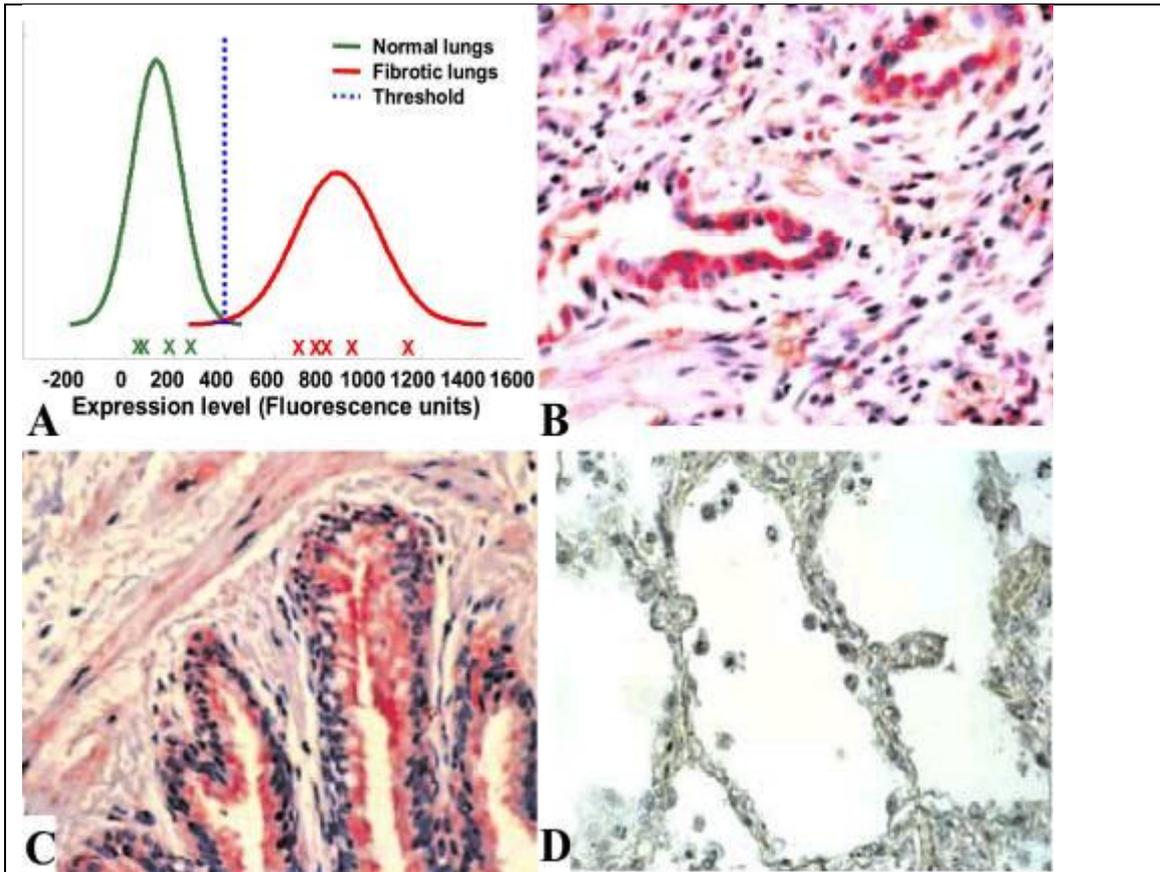


Fig. 10 Los niveles de expresión del gen y la proteína MMP-7 aumentan significativamente en los pulmones fibróticos. La distribución de Gauss para MMP-7 revela una superposición mínima (puntuación de 0,00625) entre los pulmones normales (línea verde, A) y los pulmones fibróticos (línea roja, A). Todos los niveles de expresión real de MMP-7 en pulmones fibróticos (marcas X rojas, A) fueron más altos que en pulmones normales (marcas verdes X, A) y ninguna muestra se clasificó erróneamente (TNoM e información = 0). El eje y en la figura de Gauss (A) es la densidad estimada del nivel de expresión. Esta densidad se calcula en función de la suposición de normalidad del nivel de expresión (para cada clase). La tinción con MMP-7 verificó las predicciones de expresión génica y demostró tanto la MMP-7 asociada a células como la matriz en espacios aéreos distales (B) y en la vía aérea proximal (C) de los pulmones fibróticos. No se observó inmunoreactividad a MMP-7 en pulmones normales (D). (Ampliación: B-D, $\times 40$). (101)

Recientemente, Wilson y compañía (103) descubrieron un nuevo papel sinérgico de IL-17A y TGF- β en el desarrollo de fibrosis inducida por bleomicina e IL-17A. Los autores demostraron que el contenido de hidroxiprolina y colágeno disminuía en la fibrosis mediada por IL-17A cuando se administró anti-TGF- β . Además, la producción de IL-17A disminuyó cuando se bloqueó el TGF- β , lo que indica un nuevo jugador, IL-17A, en la respuesta al factor de crecimiento profibrótico.

Papel de la señalización vía TGF- β y Smad3

Como hemos visto los efectos profibróticos del TGF- β son numerosos, incluyendo la inducción de miofibroblastos, incremento de la síntesis de matriz extracelular y la inhibición de la descomposición del colágeno. La mayoría de dichos efectos se ha visto que está mediada a través de la vía de señalización Smad3. Pues los modelos animales con ratones sin Smad3 se vio que estaban protegidos frente al desarrollo de fibrosis mediada por la sobreexpresión de TGF- β (71, 104), no desarrollan fibrosis pulmonar inducida por bleomicina(105) e incluso están protegidos contra la fibrosis cutánea inducida por radiación(106).

Smads son una familia de proteínas citoplasmáticas transmisoras de señal. Smad2 y Smad3 median de forma predominante la señalización procedente de la activación de los receptores TGF- β (107) e interactúan con numerosos promotores de respuesta a TGF- β (108).

La transmisión de la señal de TGF- β se inicia mediante la unión del ligando de TGF- β a T β RII. T β RI se recluta luego en el complejo receptor, seguido por la estabilización de los complejos heterotetraméricos TLR I / TLR II y la fosforilación de los dominios quinasa de T β RI por la T β R II quinasa constitutivamente autofosforilada. El T β RI fosforilado recluta después y fosforila las moléculas Smad2/3, las cuales, después de la disociación de T β RI, forman dímeros con Smad4. Los heterodímeros Smad2/3-Smad4 se trasladan al núcleo donde reclutan cofactores para activar o reprimir la transcripción génica. La regulación de la actividad de TGF- β puede ocurrir en múltiples niveles, como se muestran enumerados en la figura 11 que representa la transmisión de señal de TGF- β :

- 1) Disponibilidad de ligando activo a través de proteínas de unión a TGF- β o receptores solubles.
- 2) Formación de complejos receptores activos a través de la interacción con betaglicano, endoglina o el pseudoreceptor BAMBI .
- 3) Fosforilación de Smad2/3 a través de la competencia por T β RI mediante la inhibición de Smads 7 y 8.
- 4) Formación de dímeros Smad2/3-Smad4 a través de mutaciones en Smad4.
- 5) La actividad y reclutamiento de activadores o represores transcripcionales.(108)

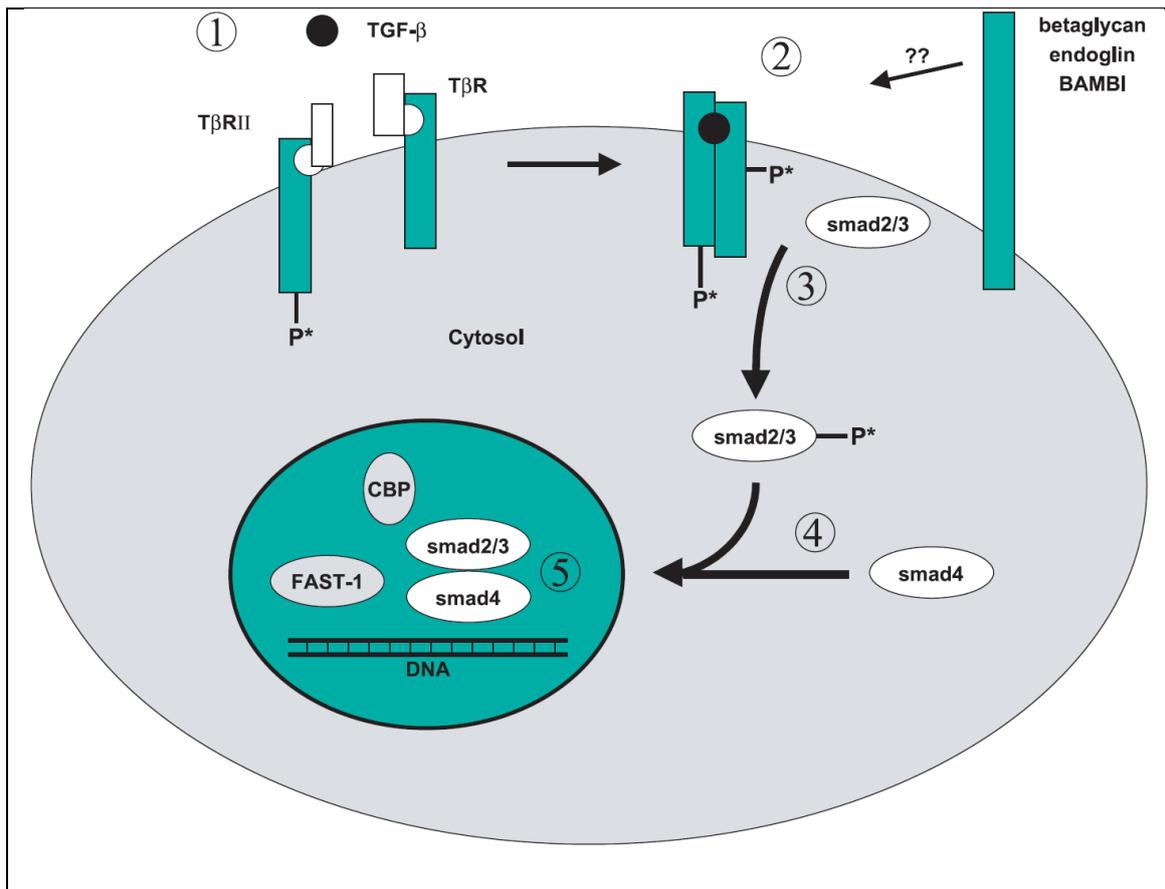


Fig. 11 Vía de señalización TGFβ- Smad3 con los niveles de posible regulación. 1) Disponibilidad de ligando activo a través de proteínas de unión a TGF-β o receptores solubles; 2) Formación de complejos receptores activos a través de la interacción con betaglicano, endoglina o el pseudoreceptor BAMBI ; 3) Fosforilación de Smad2/3 a través de la competencia por TβRI mediante la inhibición de Smads 7 y 8; 4) Formación de dímeros Smad2/3-Smad4 a través de mutaciones en Smad4; 5) La actividad y reclutamiento de activadores o represores transcripcionales(108).

Hipertensión en FPI: opciones terapéuticas

La patogénesis de la HP en pacientes con FPI se caracteriza por el aumento de la capa muscular vascular en las primeras etapas, seguido por la atrofia vascular fibrosa y pronunciada fibrosis intimal (44). Los vasos sanguíneos por si mismos pueden participar en la génesis de la FPI, encontrando alteraciones similares en las citocinas de pacientes con FPI y HP. Nos sugiere que estos trastornos comparten características patogénicas y que uno puede influir, generar o perpetuar la otra. Diferentes procesos celulares se han descrito durante la remodelación de la arteria pulmonar de la hipertensión pulmonar asociada a FPI, incluyendo la disfunción endotelial (109), la

transición endotelial a mesénquima como fuente de miofibroblastos (95), así como la proliferación de las células musculares lisas y su transición a miofibroblastos (110).

Aunque la Hipertensión Pulmonar está claramente asociada con un peor pronóstico cuando se asocia a la FPI, no se ha probado que el tratamiento con terapias vasodilatadoras lo mejore. Aunque el uso de los antagonistas del receptor de endotelina-1 (ET1) son eficaces en el tratamiento de la Hipertensión primaria han fracasado en los ensayos clínicos con FPI. Los efectos nocivos de los vasodilatadores en la HP hipóxica, como la asociada a FPI, podría atribuirse a la mayor desaturación de oxígeno mediada por la tendencia a empeorar el cociente ventilación / perfusión (V/Q) por la dilatación de los vasos que perfunden áreas pulmonares mal ventiladas (111). En este sentido, el Sildenafil, inhibidor de la fosfodiesterasa 5 (PDE5) mostró mejoría de la hemodinámica pulmonar manteniendo el índice V/Q en una cohorte corta de pacientes con HP secundaria a fibrosis pulmonar. Sugiriendo el perfil beneficioso del sildenafil en el tratamiento de la IPF (112).

En el ensayo STEP-IPF, trataron pacientes con IPF severa (DLCO < 35%) con sildenafil. Pero no se logró una mejora en el test 6 minutos marcha del global de los pacientes en comparación con placebo que era el objetivo principal; Sí se observó beneficio estadísticamente significativo en otros parámetros secundarios, incluyendo la mejora de DLCO, la oxigenación arterial, la disnea y la calidad de vida en comparación con el placebo(8). Sin embargo, Sildenafil mejoró significativamente el test de marcha (99,3 m) en un subgrupo de pacientes con FPI y la disfunción sistólica del ventrículo derecho que se asoció con un incremento en la calidad de vida. El sildenafil pudo haber actuado en este grupo a través de una mejora de su Hipertensión Pulmonar (11).

En modelos animales en los que se induce fibrosis asociada a Hipertensión Pulmonar con Bleomicina, sildenafil mejoró la hipertrofia del ventrículo derecho y la fibrosis, así como la remodelación vascular pulmonar, mediante la mejora del acoplamiento de la óxido nítrico sintetasa y la reducción de la señalización reactiva al oxígeno (113, 114). Por otro lado, en modelos celulares, Sildenafil redujo la disfunción endotelial e inhibió la proliferación de las células musculares lisas de la arteria pulmonar humana (HPASMC) (115, 116).

Desafortunadamente, como ya hemos visto, no existen terapias específicas aprobadas para la HP en pacientes con FPI, a pesar de la creciente evidencia que sugiere efectos beneficiosos del sildenafil en la HP asociada a la FPI. Es necesario mejorar el conocimiento sobre los efectos directos del Sildenafil en las arterias pulmonares de pacientes con hipertensión pulmonar asociada a fibrosis pulmonar idiopática.

Hipótesis

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

- Los pacientes con FPI avanzada suelen tener hipertensión pulmonar que condiciona en gran medida el pronóstico de la enfermedad.
- Dicha HP no va siempre ligada de forma directamente proporcional a un mayor deterioro de la función pulmonar.
- Este último punto apoya las teorías que atribuyen el desarrollo de hipertensión pulmonar a mecanismos diferentes a las ya conocidas alteraciones estructurales de la circulación pulmonar debidas al patrón de fibrosis.
- La disminución de los niveles de óxido nítrico puede jugar un papel importante vista la respuesta obtenida con los fármacos que actúan en esta vía(9, 10).
- Sildenafil es un inhibidor de la fosfodiesterasa-5 (PDE5) que estabiliza el segundo mensajero del NO, el GMPc, que conduce a la vasodilatación pulmonar. Dicha vasodilatación podría mejorar el cociente ventilación-perfusión y, por lo tanto, el intercambio de gases en pacientes con FPI.
- En los pacientes con fibrosis pulmonar con hipertensión pulmonar asociada se produce un remodelado endotelio-mesenquimal y de célula muscular lisa a miofibroblasto similar al que presentan los pacientes con hipertensión pulmonar idiopática.
- Sildenafil parece reducir la disfunción endotelial(115) y en modelos con ratas reduce la fibrosis inducida por bleomicina(48).

Con todo, postulamos que: en las arterias pulmonares de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática e hipertensión pulmonar se producen cambios de reactividad vascular, celulares y moleculares dependientes de una disminución de NO y que por tanto se atenúan con el inhibidor de la PDE5 sildenafil.

Objetivos

- 1.- Analizar “in vitro” la reactividad vascular de arterias pulmonares humanas procedentes de trasplantes pulmonares de pacientes con fibrosis pulmonar e hipertensión y compararla con la de sujetos control y la de pacientes con hipertensión pulmonar idiopática y fibrosis pulmonar sin hipertensión pulmonar.
- 2.- Estudiar el remodelado vascular de las arterias pulmonares de pacientes con FPI e HP y compararlo con controles y pacientes con FPI sin HP.
- 3.- Analizar los mecanismos moleculares del remodelado vascular.
- 4.- Analizar los cambios inducidos por sildenafil en la reactividad vascular pulmonar y en el remodelado vascular.
- 5.- Utilizando un modelo animal de fibrosis, analizar si sildenafil induce alteraciones en la relación ventilación/perfusión.

Materiales y métodos

Para la realización de este estudio se han empleado preparados de arteria pulmonar humana procedentes de piezas de resección quirúrgicas obtenidas de pacientes sometidos a trasplante pulmonar a los que del pulmón extirpado se tomaba una muestra para el estudio.

Las muestras quedaron distribuidas del siguiente modo:

-8 Pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática e Hipertensión Pulmonar.

-9 Pacientes con Fibrosis Pulmonar sin Hipertensión Pulmonar.

-4 Pacientes con Hipertensión Pulmonar Idiopática

Por otro lado se obtuvieron muestras control de donantes en muerte encefálica sin patología previa pulmonar que no se usaron para trasplante.

-18 Piezas obtenidas de donantes en muerte encefálica sin patología pulmonar conocida.

El protocolo de recogida de muestras para esta tesis fue aprobado por el Comité ético de investigación del Consorcio Hospital General de Valencia (CEIC26/2013).

Se obtuvo consentimiento informado específico de los pacientes con criterios de inclusión que firmaron el día de su inclusión en lista para trasplante pulmonar. Debo destacar la predisposición de dichos pacientes a participar en el estudio. De forma espontánea suelen ya plantear si sus órganos pueden servir a otros pacientes incluso en caso de su propio éxito.

Por otro lado, a los familiares de los donantes también se les solicita consentimiento informado para la donación de los órganos y/o tejidos del fallecido para su implante o estudio en su defecto.

De las piezas obtenidas para estudio se remitió muestras para confirmación histológica del diagnóstico.

Dichas piezas una vez extraídas se introducen en un medio de cultivo celular tipo Krebs-Henseleit (mM: NaCl, 118, NaCO₃H 24, KCl 4.7, KH₂PO₄ 12, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5 y glucosa 11.1; pH 7.35–7.45) y se mantienen en frío aproximadamente a unos 4°C y se perfunden por vena observando la correcta perfusión retrógrada del

circuito vascular. Se mantiene en frío en torno a 4-6 grados centígrados. Pudiendo quedar en fresco hasta iniciar el experimento en 8 horas si fuera necesario.

Se diagnosticó la FPI de acuerdo con los criterios del consenso publicado por la American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS)(55, 56). Después de la selección basada en los criterios diagnósticos, todas las muestras de tejido fueron revisadas histológicamente comprobando que no cumplían los criterios de exclusión siguientes: presencia de tumor y/o infección del tracto respiratorio.

Los pulmones obtenidos de donantes “sanos” mostraron arquitectura normal con edema y algunos macrófagos intralveolares.

1. Obtención de los anillos vasculares para los estudios funcionales ex vivo:

Para los estudios de reactividad vascular in vitro, los vasos pulmonares se diseccionan cuidadosamente del tejido parenquimatoso adyacente y se cortan en anillos de 2-3 mm de ancho con un diámetro también de 2-3mm. En los casos en los que se realizará la prueba sin endotelio se retira éste frotando suavemente la superficie luminal con una torunda de algodón húmeda (117).

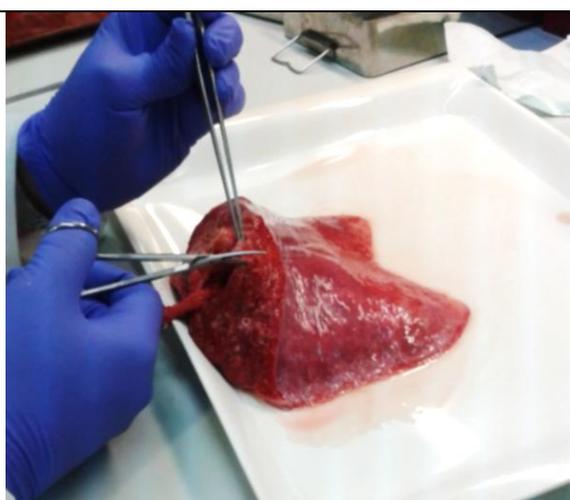


Fig. 12 Disección de lóbulo pulmonar humano para obtención de anillos de arteria pulmonar previamente bañado en solución Krebs-Henseleit para su mejor conservación mientras se realiza la disección.

Las preparaciones se sitúan en un sistema de baño de órganos en el cual se registrará la tensión isométrica mediante un transductor conectado a un ordenador con el software de adquisición de datos PowerLab ®.

Los anillos vasculares se sumergen en una copa con solución fisiológica de Krebs-Henseleit, a 37°C y burbujeados con carbógeno, sometiéndose a una tensión inicial de 1g que se mantiene durante un periodo de equilibrio de 90min. Seguidamente se obtienen curvas concentración respuesta a diferentes agonistas previa incubación o no con diferentes fármacos. Las curvas concentración respuesta pueden ser contráctiles o relajadoras en función de del protocolo a desarrollar(115, 118-121)



Fig. 13 Anillos de arteria pulmonar en solución Krebs-Henseleit preparados para su colocación en baño de órganos.

1.1. Descripción del sistema de baño de órganos

El sistema de baño de órganos empleado está formado por una doble copa de vidrio que consta de:

1. Una cámara externa, parte de un circuito cerrado, el cual mantiene constante la temperatura de la cámara interna mediante una rápida circulación de agua a una temperatura de 37°C gracias a un termocirculador (Thermocirculator Harvard).

2. Una cámara interna de 5 ml de capacidad donde se coloca la solución nutritiva de Krebs-Henseleit tamponada. Esta solución ha de estar continuamente burbujeadada con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) a través de un filtro o conexión conectado al fondo de la cámara donde, además, existe una salida para el drenaje del líquido nutritivo. En su interior se aloja una varilla de acero inoxidable acodada donde se fijará por uno de sus extremos la muestra de arteria pulmonar.

Todo el sistema se encuentra sujeto al banco de laboratorio mediante un emparrillado vertical reforzado, quedando así aislado de las vibraciones y posibles impactos en el suelo o en la misma mesa donde están colocados los aparatos de registro, habida cuenta de la extrema sensibilidad necesaria para el registro de las contracciones o relajaciones del músculo liso. Las copa de vidrio del baño, las varillas de sujeción y el transductor isométrico se hallan sujetos mediante pinzas y nueces al emparrillado. Habitualmente se trabaja en cada experiencia con 8 copas de baños.



Fig. 14 Sistema de baño de órganos en el banco del laboratorio



Fig. 15 Doble copa de vidrio del baño de órganos con el anillo vascular posicionado para estudio.

1.2. Montaje del preparado.

El preparado de arteria pulmonar empleado se introduce en la cámara interna de la copa del baño, la cual está llena de solución nutritiva de Krebs-Henseleit mantenida a 37°C a través del termocirculador antes mencionado (Thermocirculator Harvard) y burbujeada con carbógeno. A lo largo del experimento, se toman muestras del líquido nutritivo para medir el pH y comprobar si se mantiene dentro de los límites razonables (no debe exceder 7.6 al final del experimento).

Los preparados están sujetos por un extremo a un punto fijo en el interior del baño (varilla acodada) mediante un anudado con seda, y por el otro extremo se anudan a un hilo de seda, el cual está conectado a un transductor isométrico modelo Grass FT-03 (Grass Instruments, Quincy, MA) provisto de un tornillo micrométrico de precisión que permite transmitir pequeños cambios de tensión del tejido. El transductor isométrico, a su vez, se halla conectado a un amplificador PowerLab 800 (ADInstruments, Grand Junction, CO) provisto de un mecanismo de supresión cero y señal interna de calibración. Los cambios en la tensión isométrica de los anillos vasculares procesados por el amplificador quedan registrados en un ordenador que emplea el programa Chart para Windows versión 3.4 (ADInstruments) que permite obtener un registro gráfico

sobre el que podremos hacer un análisis posteriormente. Los cambios de fuerza se expresan en gramos (ver figura 16).

La tensión inicial o basal a la que se sometieron los preparados arteriales fue de 2g y el tiempo de estabilización o equilibrado fue de 40-60min, durante los cuales se realizan lavados o cambios periódicos de la solución nutritiva de Krebs-Henseleit del interior de la copa del baño cada 10-15 min. La composición de la solución de Krebs-Henseleit empleada se detalla en la tabla 2.

Componente	Concentración en solución de Krebs-Henseleit (mM)
NaCl	118'0
KCl	4'7
CaCl₂	2'5
NaHCO₃	25'0
D(+)-Glucosa	11'1
KH₂PO₄	1'2
MgSO₄ 7H₂O	0'6
Agua bidestilada c.s.p	1000 ml, pH 7-7.4

Tabla 2. Composición de la solución nutritiva de Krebs-Henseleit

1.3. Fármacos utilizados.

Las soluciones de todos los fármacos se prepararon de modo extemporáneo disolviéndolos a temperatura ambiente en agua desionizada, en solución salina fisiológica o solución de Krebs-Henseleit, excepto aquellos que requieren otro solvente como dimetilsulfóxido (DMSO) o etanol. La concentración final tanto de DMSO como de etanol en el baño fue inferior a 0.1% y no tuvo efecto sobre la respuesta del tejido. Los fármacos empleados se añaden al baño, dependiendo de los experimentos, bien concentraciones aditivas crecientes, siguiendo la técnica acumulativa de Van Rossum o bien en concentraciones únicas.

Los productos utilizados y el laboratorio de procedencia son los siguientes:

- Bicarbonato sódico (NaHCO₃): procedencia E. Merck Darmstadt.
- Bifosfato potásico (KH₂PO₄): procedencia E. Merck Darmstadt.
- Cloruro de calcio (CaCl₂): procedencia E. Merck Darmstadt.
- Cloruro de potasio (KCl): procedencia E. Merck Darmstadt.

- Cloruro de sodio (NaCl): procedencia E. Merck Darmstadt.
- D(+)-Glucosa: procedencia Panreac.
- Dietilmetilsulfato (DMSO): procedencia Sigma-Aldrich Química S.A.
- Sulfato de magnesio (MgSO₄): procedencia E. Merck Darmstadt.
- Thapsigargina (TG)
- 2-aminoetildifenil borato (2-APB)

1.4. Protocolos experimentales

Tras llevar a cabo el montaje de los preparados de arteria pulmonar humana con las condiciones experimentales antes descritas y una vez obtenida una línea basal estable de contracción espontánea durante al menos 15 minutos, se añade al baño de órganos KCl en una concentración de 80mM como estímulo de contracción. Tras alcanzar la máxima contracción producida por el KCl, se procede a lavar los preparados hasta la recuperación del tono inicial. Con la línea basal inicial restablecida y tras, al menos 15 minutos, se continúa con el protocolo correspondiente.

Este proceder tiene por objeto evidenciar la viabilidad o inviabilidad de cada uno de los preparados, de forma que si la muestra responde con una contracción adecuada se considera útil para realizar la prueba, mientras que, si no es así, se desecha y se reemplaza por otra muestra(122).

Los datos estadísticos y gráficos son procesados mediante el programa informático GraphPad Prism[®] versión 6 (GraphPad Software, Inc.).

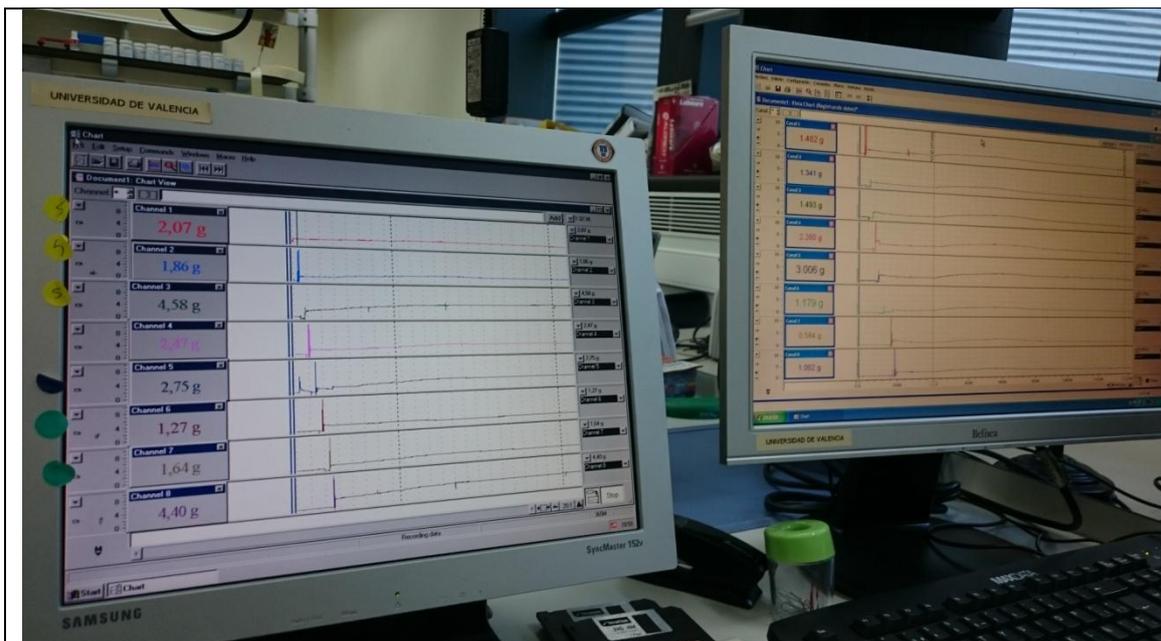


Fig. 16 Registro gráfico de la fuerza que ejercen los anillos vasculares en el baño de órganos.

Se realizaron dos tipos de protocolos:

A. Protocolo vasodilatador:

Los anillos vasculares control (no expuestos a sildenafil) se mantienen en un nivel de tono meseta del 10-15% de la contracción inducida por 5-HT $1\mu\text{M}$ durante un intervalo de tiempo de unos 90 minutos. Dicho tiempo es el necesario para realizar las curvas de respuesta a sildenafil incrementando progresivamente su concentración. Se incrementa la concentración de sildenafil sólo cuando el tejido alcanza su máxima relajación que normalmente tarda unos 5-10 minutos. Al final del experimento, se añade papaverina 0.1nM a cada muestra para establecer la referencia de máxima relajación(123). El incremento progresivo de concentración de sildenafil desde $0,1\text{nM}$ a $10\mu\text{M}$ se realizó con incrementos de 0.5 unidades logarítmicas.

Por otro lado se realizó el mismo experimento en anillos vasculares a los que se les había extraído el endotelio, para analizar la contribución de éste a la relajación obtenida con el sildenafil.

Los resultados de ambos experimentos se expresaron como porcentajes de relajación con sildenafil respecto de la máxima relajación que se alcanzaba con la papaverina 0.1mM.

B. Protocolo contráctil:

Para determinar el efecto del sildenafil en la contractilidad, se añadió éste con concentraciones basales de 0,1µM a 10µM en un baño de órganos durante 30 minutos antes de iniciar tratamiento con dosis acumulativas de 5-HT. Conforme se introducen dosis acumulativas de 5-HT que aumentan la concentración de 0,1nM a 10µM se mantiene la misma concentración basal del sildenafil y se observa la respuesta contráctil producida por 5-HT.

2. RT-PCR en tiempo real.

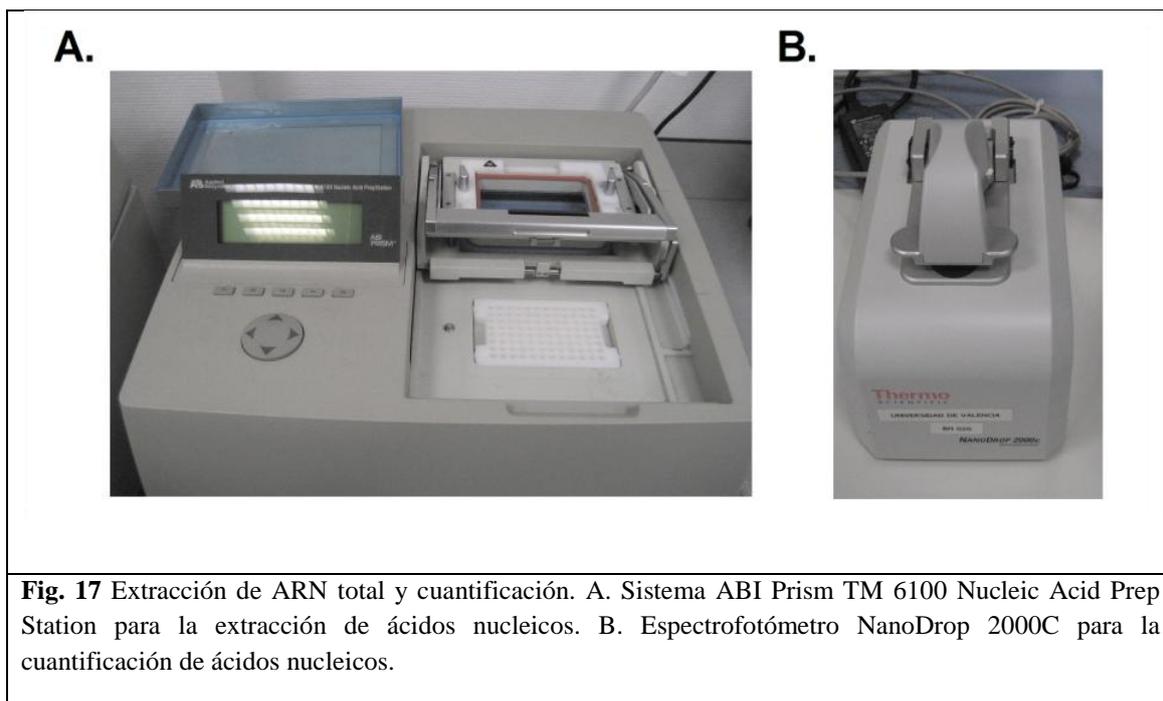
Se obtuvo RNA global de arterias pulmonares de cada grupo. Se hizo cuantificación relativa de las diferentes transcripciones mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando gliceraldehido fosfato 6-deshidrogenasa (GAPDH) como control endógeno normalizado sobre el grupo control(124).

Seleccionamos la expresión mRNA de genes que nos permitirán caracterizar las transformaciones celulares. La transición de endotelio a mesénquima se caracteriza por la pérdida de marcadores de expresión del endotelio como la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), cadherina vascular endotelial (VE-cadherina; proteína de adhesión expresada en las células endoteliales que mantiene la integridad de la barrera celular endotelial), receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR; proteína expresada en las células endoteliales que promueve la regeneración celular endotelial) y

el factor VIII (FVIII; factor de coagulación expresado en las células endoteliales cuya expresión disminuye cuando se pierde el fenotipo endotelial.) y el incremento de marcadores de miofibroblastos como el colágeno tipo I de la matriz extracelular (expresado por los miofibroblastos), vimentina y alfa actina de músculo liso (α SMA; proteína del citoesqueleto que median la contracción celular para permitir migrar a las células mesenquimales)(125).

Para aislar el ARN total de células endoteliales de arteria pulmonar y células musculares lisas de arteria pulmonar se procedió a la lisis celular utilizando el tampón de lisis para la purificación de ácidos nucleicos. El ARN total se aisló mediante el sistema de extracción ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid Prep Station (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

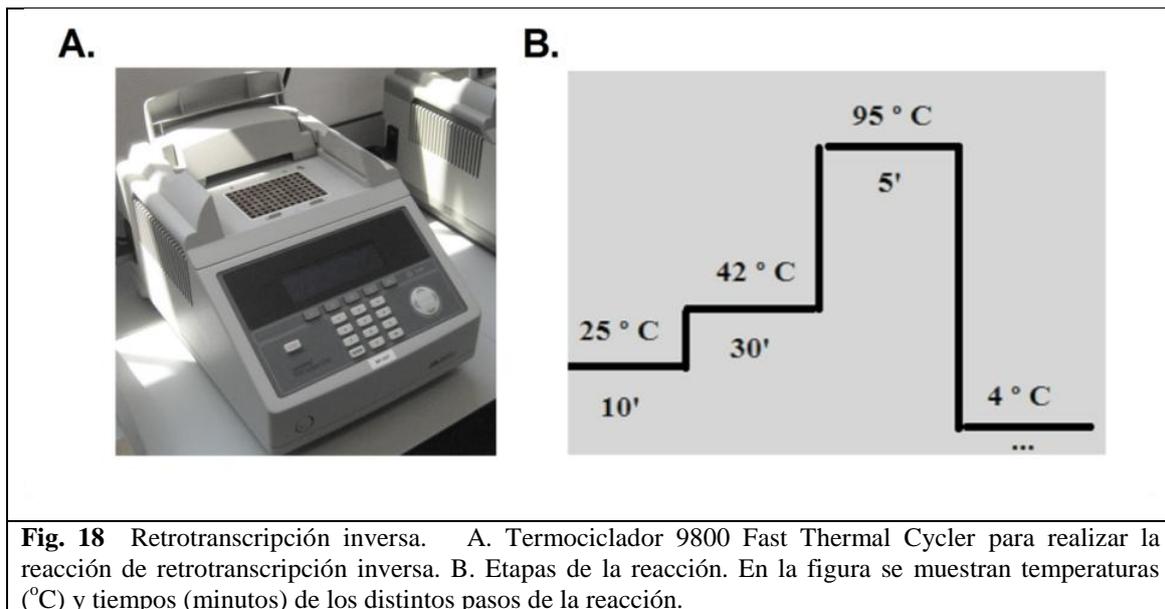
Para aislar el RNA total de las muestras obtenidas en las biopsias de vaso pulmonar se utilizó el reactivo TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics), que es una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina (Trizol), que permite separar ARN, ADN y proteínas. Se tomaron 20mg de pulmón conservado a -80°C , se añadió 1 ml de reactivo Tripure y se lisó con el sistema TissueLyser II (Qiagen). A continuación, se separaron las fases con cloroformo y se precipitó el ARN total de la muestra con isopropanol. A fin de facilitar dicha precipitación se le añadió a la fase acuosa 1 μ l de glicógeno. Tras una centrifugación de 5 minutos a 7500 rpm, se re suspendió el ARN en 20 μ l de agua DEPC. A continuación se determinó la concentración del ARN extraído mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000C (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema permitió determinar la concentración del ARN total (ng/ μ L) mediante medidas de absorbancia a 260 nm (A260) y 280 nm (A280), a partir del espectro de absorción de las muestras. También se obtuvo el valor de la pureza de las muestras, determinado por el ratio A260/A280.



La integridad del ARN extraído fue confirmada con el sistema electroforético capilar 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se almacenó a -80°C hasta su utilización.

2.1 Retrotranscripción inversa (RT)

En la reacción de retrotranscripción inversa (RT), la enzima retrotranscriptasa inversa sintetiza ácido desoxirribonucleico (ADN) complementario (ADNc) partir de un ARN molde. Tomando en consideración la cuantificación del ARN extraído, se transformó un total de 300ng de ARN en ADNc utilizando el kit “Taq Man para la retrotranscripción inversa”. Se realizó este proceso en un termociclador *9800 Fast Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, EEUU) con los siguientes pasos: incubación durante 10 minutos a 25°C , ciclo de 30 minutos a 42°C e inactivación de la enzima durante 5 minutos a 95°C . El ADNc sintetizado se almacenó a -20°C hasta su utilización.



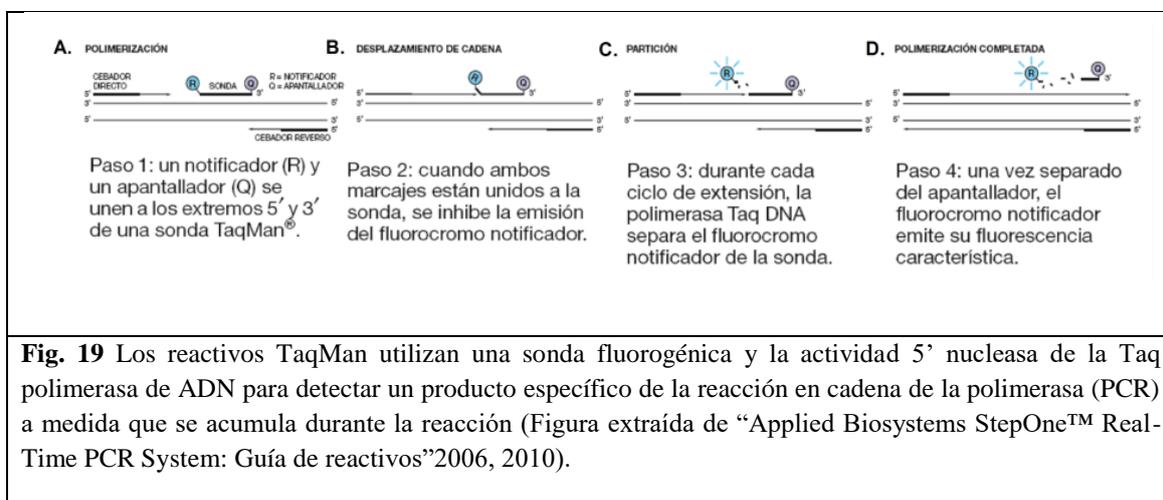
2.2 RT-PCR a tiempo real:

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación selectiva de una región de ADN de interés utilizando oligonucleótidos como cebadores de la síntesis de ADN. Los cebadores se unen específicamente a secuencias que flanquean la región que se pretende amplificar. La reacción de amplificación consiste en la repetición de un ciclo integrado por tres etapas:

- Desnaturalización del ADN molde.
- Hibridación de cebadores.
- Elongación.

La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial en la cantidad de ADN de la región de interés. La variante denominada PCR a tiempo real (RT-PCR) constituye una forma precisa de detectar y cuantificar los niveles de ARN mensajero (ARNm). Los equipos de RT-PCR permiten la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción empleando lectores de fluorescencia que permiten medir la fluorescencia emitida durante la reacción. Para ello se utilizaron ensayos de Expresión Génica TaqManR, que son mezclas pre formuladas de sondas y cebadores específicos para el gen de interés marcadas con fluorocromos. Los reactivos TaqMan utilizan una sonda fluorogénica y la

actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa de ADN para detectar un producto de PCR específico a medida que se acumula durante la reacción, tal y como se detalla en la figura 19.



La existencia de estas sondas fluorogénicas permite la detección en tiempo real únicamente de los productos de amplificación específicos. En la tabla 3 se enumeran los Ensayos de Expresión Génica TaqManR utilizados para el estudio de la expresión de los genes de interés.

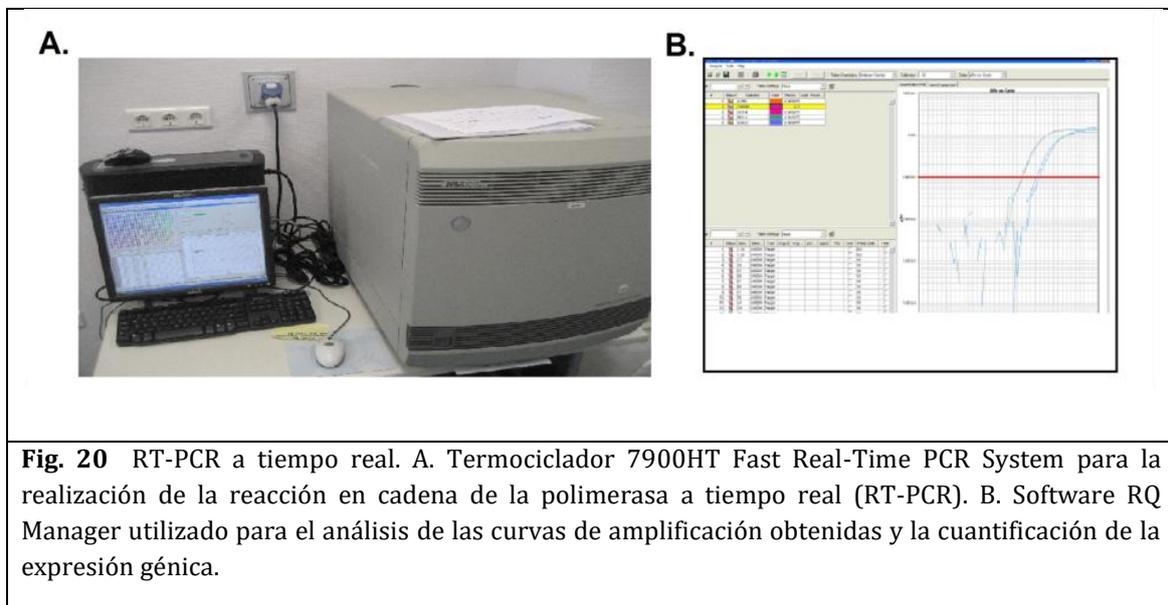
Gen	Referencia
αSMA	Hs00559403_m1
α1(I)-collagen	Hs00164004_m1
vimentin	Hs00958116_m1
TGFβ1	Hs00998133_m1
PDE5	Hs00153649_m1
eNOS	Hs01574659_m1
VE-cadherin	Hs00170986_m1
VEGFR1	Hs01052961_m1
factor (F)VIII	Hs00252034_m1
GAPDH	4310884E

Tabla 3 Ensayos de Expresión génica TaqManR utilizados en la RT-PCR a tiempo real (Applied Biosystems)

Cada reacción de PCR contenía los siguientes componentes:

- 1 μ L de ADNc sintetizado en la transcripción inversa
- 5 μ L de TaqManR Gene Expression Master Mix
- 0,5 μ L de la sonda y cebadores correspondientes
- 3,5 μ L de agua dietilpirocarbonato (DEPC).

La PCR se desarrolló en un termociclador 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: un paso inicial de 2 minutos a 0°C, un ciclo de 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguidos de 1 minuto a 60°C.



A partir de los datos de fluorescencia registrados se obtuvieron curvas de amplificación en las que se representaba el logaritmo de la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclos transcurridos. Para medir la expresión de un determinado gen se utilizó el ciclo umbral (Ct), ciclo en el que se alcanza el nivel prefijado de fluorescencia. Cuantas más copias haya de ARNm de partida del gen estudiado, más ADNc se obtendrá en la retrotranscripción inversa y antes comenzará la amplificación a ser exponencial. La cuantificación relativa de los distintos genes se realizó con el método de comparación de Ct, utilizando el gliceraldehido 6-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control endógeno y normalizando los resultados al grupo control.

En este método se utiliza la siguiente ecuación:

Siendo:

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

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

Para que la determinación a través de esta fórmula aritmética sea válida, debe cumplirse que la eficiencia de la reacción para el gen problema y para el gen de referencia sea aproximadamente igual. El proveedor de las sondas utilizadas en los experimentos garantiza que la eficiencia en las reacciones es de 1. Se estudió cada muestra por duplicado, se corrigieron los valores frente al gen referencia y se normalizaron frente al grupo control. Se calculó el valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de los distintos grupos y se representó junto al grupo control, cuyo valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ es igual a 1. El valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ equivale a la expresión relativa de ARNm de un determinado gen.

3. Inmunofluorescencia y Western blotting

Con el fin de valorar las diferencias obtenidas en los estudios de reactividad vascular se extraen proteínas y RNA de los tejidos procedentes de pacientes con y sin HP, con el fin de realizar estudios relacionados con el proceso de remodelado vascular.

De los anillos arteriales del tejido pulmonar humano de los distintos grupos, se analizó mediante inmunofluorescencia o Western blot: Colágeno tipo I (Col I), α -actina de célula muscular lisa (α -SMA), señal extracelular regulado por kinasas 1 y 2 (ERK1/2), fosfo-SMAD3, S100A4 y PDE5. Comparando vasos control y patológicos(125).

3.1 Inmunofluorescencia

Analizamos Colágeno tipo I, α SMA y PDE5 de tejido pulmonar humano o de anillos arteriales por inmunofluorescencia. Para este fin se fijó en paraformaldehído(4%) durante 48h y se incluyó en Tissue-Tek® OCT™ cryosectioning compound (Sakura Finetek Europe BV, Leiden) parénquima pulmonar periférico de todos los pacientes estudiados en esta tesis. Dichos bloques se cortaron en secciones de 10 μ m de grosor, se permeabilizaron con Triton X 100 (0,1% en PBS) durante 5min, fijados en suero de cabra 10% en PBS y se tiñeron con anticuerpo de conejo frente a colágeno tipo I humano (Col I) (cat. n°: PA1-26204; Affinity Bioreagents), anticuerpo de ratón anti α -SMA humana (cat. n°: A5228; Sigma Aldrich, Madrid, Spain) y anticuerpo de conejo anti PDE5 humana (cat. n°: P434; Cell Signalling, Boston, Massachusetts, USA). Se mantuvieron durante 24horas a 4°C. Posteriormente se utilizó FITC o anticuerpos conjugados con rodamina anti IgG de ratón y conejo y finalmente 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (2 μ g/ml) para marcar los núcleos (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). El tejido pulmonar se inspeccionó con una excitación/emisión de 485/525nm (FITC), o 570/590nm (rhodamine), o 350/470nm (DAPI) con microscopio de epifluorescencia TE-200 con magnificación 400x (Nikon Eclipse-TE-200, Tokyo, Japan).

3.2 Western blot

Se utilizó el análisis de Western blot para detectar fosfo-ERK1/2, Colágeno tipo I, proteína específica de fibroblasto 1 (S100A4) y fosfo-Smad3 en arterias pulmonares de los diferentes pacientes a estudio y en los experimentos in vitro de células primarias de endotelio y células musculares lisas de arterias pulmonares. Las células o el tejido, según el caso, se homogeneizaron y lisaron en hielo con un tampón para ello compuesto de 20mM Tris, 1mM ditiotretitol y 1 μ g/ml pepstatin A suplementado con cóctel completo de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich). El ensayo Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Ltd., Herts, UK) se utilizó para cuantificar el nivel de proteínas en cada muestra y asegurar la misma carga proteica. Se utilizó un gel de electroforesis de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio para separar las proteínas por su peso molecular. Brevemente, 20 μ g de proteína desnaturalizada mezclada con 2x del tampón de carga

(compuesto por 160mM Tris HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% glicerol, 1.4mM β -mercaptoetanol, 0.04% azul de bromofenol) junto con un marcador del peso molecular de las proteínas (Bio-Rad Kaleidoscope marker, Bio-Rad Laboratories), se cargaron en un gel de acrilamida compuesto de 5% acrilamida apilado en la parte superior de un gel de resolución de acrilamida al 12% y se pasó por el gel mediante la aplicación de 100V durante 1 hora. Las proteínas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) mediante el método wet blotting. La membrana se bloqueó con un 5% de Marvel en PBS que contenía un 0,1% de Tween 20 y posteriormente se probó con los siguientes anticuerpos como patrones internos seguidos por el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1: 10.000):

- Anticuerpo de ratón anti fosfo-ERK1/2 humano (cat. n°: M-9692; Sigma Aldrich)
- Anticuerpo de conejo anti colágeno tipo I humano (cat. n°: PA1-26204; Affinity Bioreagents)
- Anticuerpos de conejo anti S1004A humana (cat. n° Ab27957, abcam)
- Anticuerpos de conejo anti fosfo-Smad3 humana (cat. n°: PS1023; Calbiochem)
- Anticuerpo total de conejo anti ERK1/2 humano (Cell Signalling, Boston, Massachusetts, USA; catalogue no. 4695)
- Anticuerpo total de conejo anti Smad3 humana (cat n°: 566414; Calbiochem)

Se utilizó el método mejorado de quimioluminiscencia de detección de proteínas con ECL-plus (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Reino Unido) para identificar las proteínas marcadas. La cuantificación de la expresión de la proteína se realizó mediante densitometría en relación a la expresión de ERK1/2 o Smad3 usando el software GeneSnap versión 6.08.

4. Experimentos de arteria pulmonar “ex vivo”

Las arterias de pacientes control y con FPI se disecaron para obtener anillos pequeños de 2 a 3 mm de diámetro y de longitud. Se cultivaron en un medio para células endoteliales EGM-2 suplementado con Single Quotes (Clonetics, UK), 10% FCS, 1% fungizona y 2% streptomina/penicilina durante 4 horas en un incubador con 5%CO₂ a 37°C.

Posteriormente esos anillos se incubaron con y sin sildenafil 10nM a 1 μM durante una hora seguido del estímulo con TGFβ1 5ng/mL durante 72 horas. TGFβ1 es uno de los factores de remodelado de arteria pulmonar mejor conocidos que incrementa la muscularización de dichas arterias por diferentes mecanismos. Primero, TGFβ1 promueve la diferenciación de células endoteliales a fenotipo de mesénquima/miofibroblasto caracterizado por el incremento de expresión de la maquinaria del citoesqueleto (incluyendo alfa actina de musculo liso y vimentina) que permite a la célula migrar a la íntima y la adventicia, junto al incremento de los componentes de la matriz extracelular como el colágeno tipo I que favorece la migración celular y el depósito de tejido conectivo. Por otro lado, TGFβ1 aumenta la proliferación de células musculares lisas y su transformación a miofibroblastos que incrementan la capacidad migratoria de los miofibroblastos a la íntima y la adventicia. Estas alteraciones aumentan el remodelado arterial reduciendo el diámetro de la luz y aumentando la capacidad contráctil induciendo así hipertensión pulmonar. Por todo ello hemos seleccionado el TGFβ1 como estímulo para inducir cambios a mesénquima en las arterias pulmonares(110, 124, 126).

Tanto sildenafil como el TGFβ1 se reemplazaron cada 24h. Los anillos arteriales se usaron para analizar la expresión de los marcadores endoteliales y de mesénquima. El tiempo de incubación para el estímulo con TGFβ1 se seleccionó basándose en curvas tiempo dependientes (24-96h) que mostraron una producción máxima de colágeno tipo I tras 72h de exposición.

5. Aislamiento y cultivo de células endoteliales de arteria pulmonar humana y células musculares lisas. Experimentación in vitro.

A partir de los vasos disecados y del parénquima pulmonar obtenido se procede al aislamiento y cultivo primario de células endoteliales y de músculo liso de arterias pulmonares.

En estas poblaciones celulares se estudiarán la expresión de las proteínas y kinasas citadas en el apartado anterior en condiciones basales y tras la estimulación con fármacos o factores de crecimiento como TGF- β , implicados en el proceso de transición mesenquimal de células endoteliales y transformación a miofibroblastos de células musculares lisas. Todo ello estableciendo comparaciones en células procedentes de pacientes con y sin HP(33, 127, 128).

Los experimentos celulares se realizaron con células endoteliales de arteria pulmonar humana (HPAECs) y células musculares lisas de arteria pulmonar humana (HPASMCs) aisladas de arterias pulmonares de pacientes con FPI. Se disecaron segmentos de arteria pulmonar de 2-3 mm de diámetro luminal liberándolos del parénquima pulmonar que los rodea. Se cortaron longitudinalmente y se aplicó colagenasa al 1% (Gibco, UK) en medio de cultivo RPMI-1640 durante 30 minutos a 37°C. Tras la digestión con colagenasa se neutralizó añadiendo RPMI-1640 complementado con 20% de suero fetal de ternera (FCS), y el homogeneizado se separó por centrifugación a 100rpm. Se recultivaron las células en medio de cultivo endotelial EGM-2 suplementado con Single Quotes (Clonetics, UK), 10% FCS, 1% fungizona y 2% streptomicina/penicilina. La selección de las células endoteliales se realizó utilizando los kits para células endoteliales Dyanbeads CD31 (DynaL Biotech, Germany). Se les aplicó brevemente tripsina 0.25% y la mezcla celular se incubó con CD-31-coated Dynabeads durante 30min a 4°C con rotación terminal. Tras la incubación, las células endoteliales

de arteria pulmonar humana se recuperaron mediante el uso de un concentrador de partículas magnético (MCP-1; Dynal) y enjuagadas cuatro veces con salino tamponado con fosfato (PBS)/albumina sérica bovina (BSA). Los clusters de células endoteliales de arteria pulmonar humana retenidas en los CD-31coated Dynabeads fueron resuspendidas a parte en EGM-2 suplementado con 10%FCS, 1% fungizona y 2% estreptomycin/penicilina.

Las células que no quedaron retenidas en CD-31-coated Dynabeads se cultivaron en DMEM suplementado con FCS 10%, fungizona 1% y estreptomycin/penicilina 2% para poder separar selectivamente las células musculares lisas de arteria pulmonar humana. Para confirmar la identificación de las células musculares lisas de arteria pulmonar humana se subcultivaron y se examinó la expresión de α -actina usando un anticuerpo monoclonal contra α -actina de músculo liso (dilución 1: 100; Sigma); más del 95% de las células se tiñeron positivamente. Las células se incubaron durante 16 h en medio de cultivo FCS al 1% antes de cada experimento y se devolvieron al medio de cultivo FCS al 10% al comienzo de cada prueba experimental.

Para los estudios *in vitro*, ambos tipos de células se estimularon con TGF- β 1 (1-10ng/ml; Sigma Aldrich) las veces necesarias, cambiando el medio de cultivo y el estímulo cada 24h. Posteriormente se realizó pero añadiendo Sildenafil (10nM-1 μ M; Pfizer) 30 minutos antes del estímulo para ver su efecto en la respuesta al TGF- β 1. Se recuperaron células para analizar la expresión de marcadores de mesénquima y endotelio así como de las vías de señalización.

6. Ensayo de proliferación celular

La proliferación de células musculares lisas se midió con inmunoensayo de color basado en la medida de la incorporación de BrdU durante la síntesis del DNA de las células, se utilizó el kit de proliferación celular por inmunoabsorción Brdu (Roche, Mannheim, Germany) según el protocolo del vendedor. Se sembraron las células con una densidad de 3×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se incubó durante 24h. Se incubaron las células con sildenafil a las concentraciones deseadas durante 30

minutos seguido por el estímulo con TGFβ1 durante 48h. Se cuantificó la absorción de luz a 490nm usando un espectrofotómetro de microceldas (Victor 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer). Los datos de proliferación se refieren a los valores del nivel de BrdU en el DNA celular por celdilla. La respuesta a estímulo con TGFβ1 se expresó en relación al crecimiento basal de las muestras control no tratadas.

7. Modelo animal

En modelos animales de fibrosis pulmonar, asociada a Hipertensión pulmonar, inducida por bleomicina, sildenafil mejoró la hipertrofia del ventrículo derecho y la fibrosis pulmonar, así como la remodelación vascular pulmonar a través de la mejora de la óxido nítrico sintasa (NOS) y la reducción de la señalización por especies reactivas de oxígeno (ROS)(113, 114). En modelos celulares, sildenafil reduce la disfunción endotelial e inhibe la proliferación en la arteria pulmonar humana de células de músculo liso(47, 116).

La experimentación y manipulación de los animales se realizaron de acuerdo con las directrices del Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad de Valencia. Se instiló una sola dosis de bleomicina a 3,75 U/kg vía endotraqueal. Por otro lado se utilizó un grupo control instilado con solución salina. 21 días después se administró una sola dosis de sildenafil a 1mg/kg vía parenteral. Tras 2h de la administración se evaluó la relación Ventilación/Perfusión utilizando una tomografía computarizada por emisión de fotón único (Albira micro –CT-PET-SPECT Imagin System (Oncovision, España)). Obteniendo imágenes con el radio isótopo dietyleno-tiramina-pentaacetato 10mCi (DTPA-Tc99m) para la ventilación y 0.5-1 mCi del MAA-Tc99m para la perfusión(129).

7.1 Instilación bleomicina

La fibrosis pulmonar en rata se indujo mediante instilación intratraqueal. Con la ayuda de un otoscopio (Riestar®) y de un fiador, se introdujo por la tráquea una cánula de 16G a través de la cual se instiló un volumen de solución salina de sulfato de bleomicina en dosis única de 3.75UI/kg según se indica en la tabla 4. La administración de BLM se realizó mediante jeringas estériles de insulina (BD Plastipak® 1 mL). Previa a la administración, para verificar la correcta canulación intratraqueal, se insuflaron 2mL de aire y se comprobó la insuflación pulmonar. Tras la administración se insufló 1mL de aire para facilitar el arrastre del producto y asegurar la correcta administración del antibiótico. Los animales del grupo control recibieron el mismo volumen de solución salina libre de bleomicina (Tabla 4). La inducción de fibrosis en este estudio se realizó siempre el día 1 del experimento. 21 días después se administró una sola dosis de sildenafil a 1mg/kg vía parenteral.

BLEOMICINA 3,75 UI/kg BLM []i 15 UI/2mL		
PESO g	UI/peso	µL Intratraqueales
200	0.75	100
210	0.79	105
220	0.83	110
230	0.86	115
240	0.9	145
250	0.94	125
260	0.98	130
300	1.13	150
310	1.17	155
320	1.21	160
330	1.25	165
340	1.29	165

Tabla 4: Dosificación de la administración intratraqueal de bleomicina o suero.



Fig 21 Administración intratraqueal de bleomicina empleada en la inducción de fibrosis pulmonar. Rata Wistar Han® (Harlan®) administración intratraqueal de 3.75 UI/Kg de bleomicina.

7.2 Estudio Ventilación-Perfusión

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

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

Los ensayos de perfusión y ventilación pulmonar se realizaron mediante el sistema multimodal de adquisición de imágenes PET/SPECT/CT.

• Perfusión:

Previa a la instauración de la enfermedad, se realizaron pruebas de perfusión pulmonar a día 0. Para ello se anestesiaron los animales previamente mediante anestesia inhalada con Isoflurano (Arreane®). Se canuló la vena de la cola mediante una cánula de 24G y se introdujeron aproximadamente 500 μ Ci vía intravenosa de MAA-TC^{99m}. La jeringa que contiene el radiofármaco se midió en el activímetro tras la administración para calcular la dosis exacta de radiofármaco inyectado y se anotó junto con la hora de administración. El ratón se posicionó decúbito esternal en la camilla de rata estándar del Albira®, equipo multimodal de adquisición PET/SPECT/CT, y se mantuvo anestesiado

con isoflurano mediante un sistema de inhalación “nose-only” con una tasa de flujo del 2,5% durante la adquisición. Todas las ratas fueron sometidas a las pruebas de SPECT/CT a día 0, 21 y post-tratamiento.

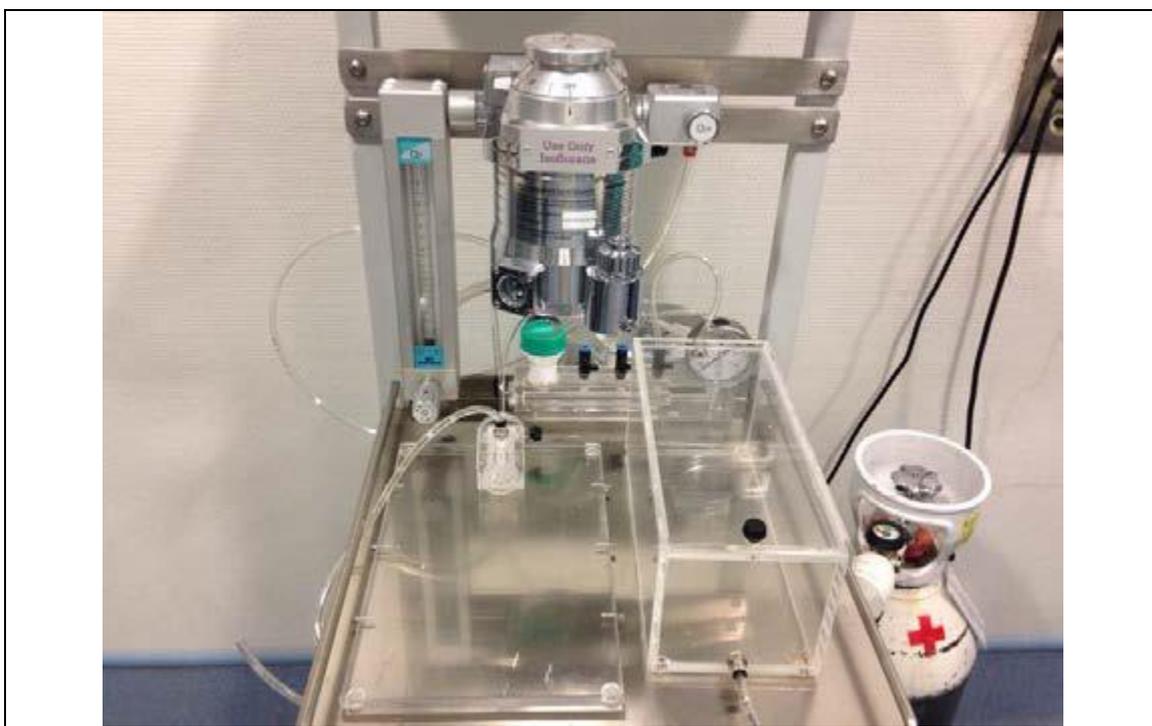


Fig 22 Cámara de inducción de anestesia.

- Ventilación:

En este caso los animales se anestesiaron con ketamina/medetomidina 75/0,5 mg/kg y se introdujeron en la cámara de inhalación, un pletismógrafo de doble compartimento con restricción cónica (emka TECHNOLOGIES SA ®).

Se midieron aproximadamente 9mCi de DTPA-Tc99m y se depositaron en la cámara de nebulización. La jeringa que contiene el radiofármaco se midió en el activímetro tras la administración para calcular la dosis exacta de radiofármaco administrado y se anotó junto con la hora de administración. El procedimiento de ventilación se realizó mediante ciclos de flujo continuo del 0.4mL/min durante 15 min, alternando la nebulización con aire ambiente en intervalos de 30-45 segundos. Una vez realizada la ventilación, se posicionó decúbito esternal en la camilla de rata estándar del Albira® para la adquisición SPECT/CT. Las pruebas de ventilación se realizaron el día previo a la perfusión.

Una vez finalizadas las adquisiciones, las ratas fueron retiradas de las camillas y depositadas en sus jaulas bajo observación. Las ratas permanecieron estabuladas en la

instalación radioactiva con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas hasta el decaimiento del radiofármaco.

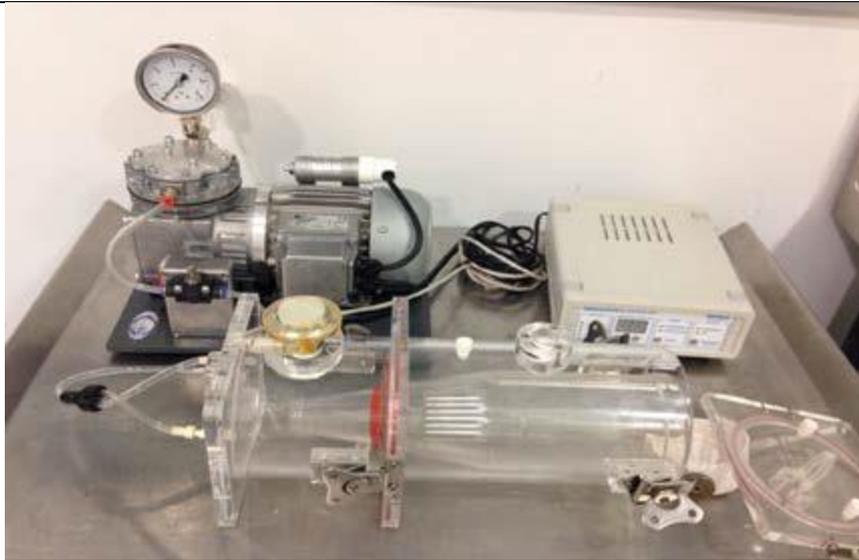


Fig 23 Ventilador animal y administración inhalatoria de fármacos

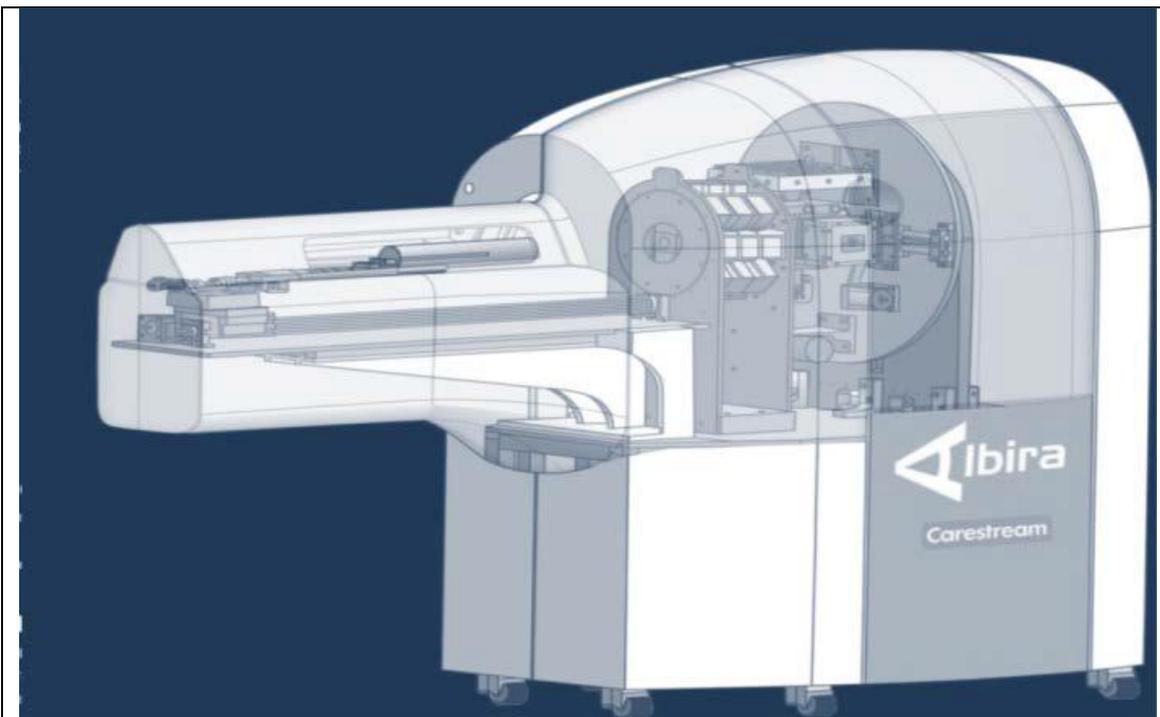


Fig 24 Albira® Equipo multimodal micro SPECT/PET/CT

7.2.1 ADQUISICIÓN Y RECONSTRUCCIÓN DE IMÁGENES

Tanto para las capturas de ventilación como perfusión, las adquisiciones se realizaron con un offset de la camilla de 115mm de longitud para capturar pulmón. La captura

mediante CT-rayos-X (Carestream Molecular Imaging, Woodbridge, CT) de alta calidad se realizó con la modalidad Step&Shoot de 600 proyecciones. Los rayos X se programaron con 400 μ A de intensidad de corriente, 45kV de voltaje y un filtro de atenuación de 0,5mm. Dicha intensidad equivale a una dosis equivalente de 220mSv y dosis efectiva de 357,4mSv. Estas dosis son 20 veces inferiores a las dosis reportadas de DL50(130)

La calibración de las unidades de medida de las imágenes CT, Unidades Hounsfield (HU) se realiza diariamente escaneando un tubo con agua y otro con aire. En la modalidad de SPECT, los estudios se programaron con un campo de visión (Field Of View (FOV)) de 80mm, un tiempo de captura de 30min, 60 proyecciones por segundo y un colimador Pinhole. Las imágenes fueron reconstruidas mediante el algoritmo FBP (Filtered Back Projection) utilizando parámetros de reconstrucción estándar del Albira Suite 5.0 Reconstructor. La combinación de la adquisición y la reconstrucción dan lugar a una imagen final de matriz de 255*255*255 y tamaño de pixel de 0.25*0.25*0.25mm. Las imágenes de alta calidad del CT se emplearon para el procesamiento y análisis de la ventilación/perfusión (V/Q) para proporcionar información estructural basada en la correlación con las imágenes SPECT, así como para ensayos densitométricos del entorno pulmonar.

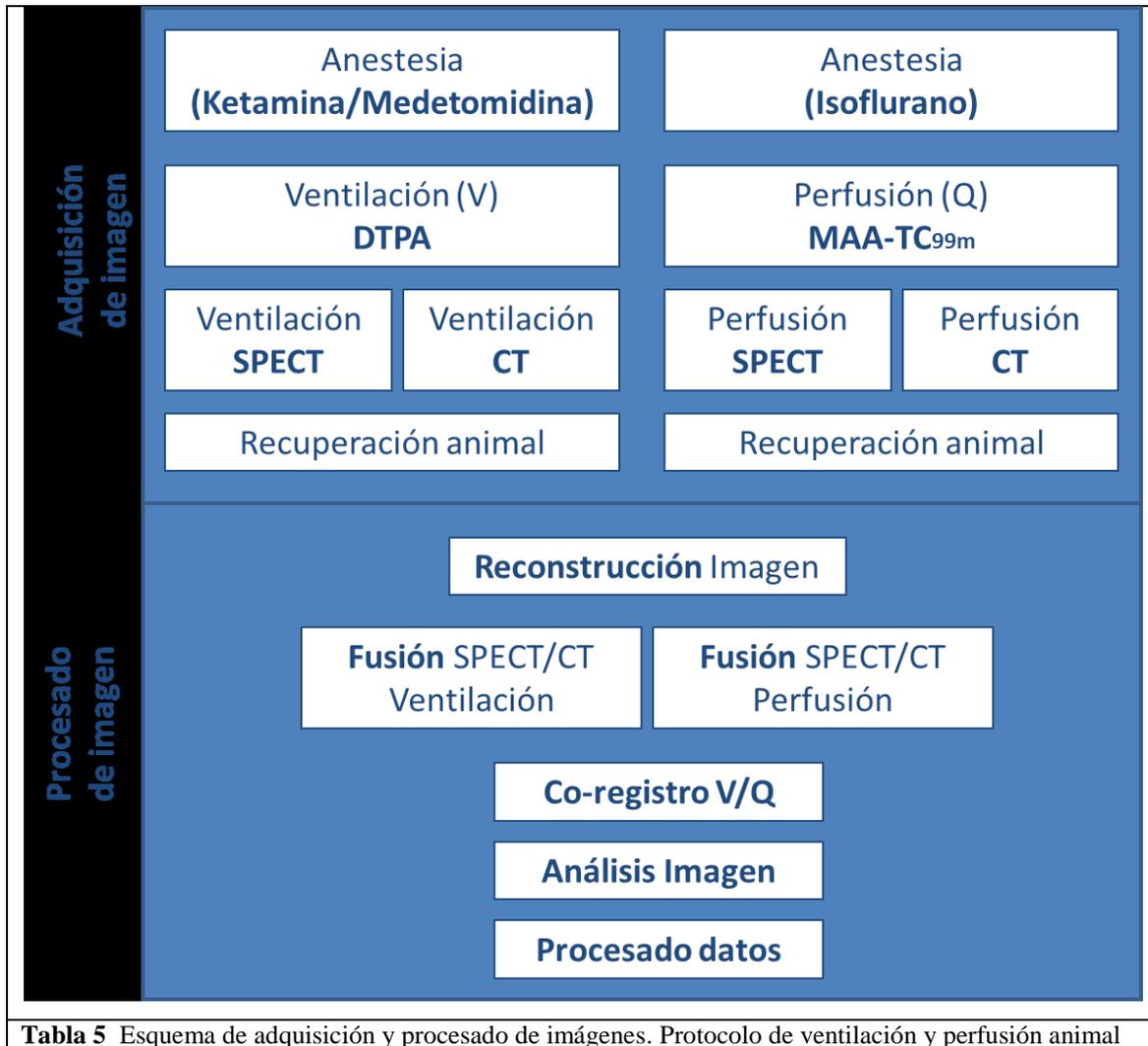
7.2.2 ANÁLISIS DE IMÁGENES

Las imágenes fueron analizadas y cuantificadas mediante el software de análisis PMOD versión 3.2 (PMOD Technologies LTD, Zurich, Switzerland). Una vez adquiridas, las imágenes de SPECT/CT fueron reconstruidas y fusionadas. Las imágenes fueron corregidas mediante el algoritmo OSEM.

Para las imágenes SPECT se seleccionaron volúmenes de interés (VOI) que comprenden la región captada en pulmón y se procedió a su cuantificación. La cuantificación de imágenes proporcionó el número de cuentas adquiridas por unidad de pixel. Dicho valor se relativizó por la dosis inyectada.

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

pixel. La adquisición y procesado de las imágenes de ventilación y perfusión se resumen en la tabla 5.



7.3 Tratamiento con sildenafil

Sobre las ratas instiladas con bleomicina o con Suero (grupo control) el primer día para inducir la fibrosis pulmonar. El estudio V/Q se inició 2 horas después de la administración del sildenafil 1mg/kg por vía intraperitoneal. Las imágenes fueron tomadas después de la ventilación de DTPA-Tc99m, y se tomaron imágenes de perfusión tras la administración parenteral de MAA-Tc99m.

Para cada grupo a estudio se analizaron 10 animales. Se obtuvo el análisis estadístico mediante el modelo de una vía de ANOVA y posteriormente el tets de Bonferroni post hoc.

Análisis estadístico y resultados

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante tests paramétricos (animales y celulares) o no paramétricos (estudios en humanos) según corresponde. $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Se utilizaron tests no paramétricos para comparar los resultados de las muestras humanas de pacientes control y de pacientes con FPI, HP e FPI + HP. En este caso, los datos se mostraron como medianas, rango intercuartílico y valores mínimos y máximos. Cuando las comparaciones se referían a más de dos grupos, se realizó primero un análisis de varianza (test de Kruskal-Wallis). En el caso de una diferencia significativa global, las comparaciones entre grupos se evaluaron mediante el test post-hoc de Dunn, que generaliza el procedimiento de ajuste de Bonferroni. Cuando las comparaciones se referían sólo a 2 grupos, las diferencias entre ellos se analizaron mediante el test de Mann Whitney. Los resultados de los experimentos animales y de los experimentos mecánicos con células ex vivo e invitro se expresaron como media \pm desviación estándar ya que la n con distribución normal para cada conjunto de datos se confirmó mediante análisis de histograma y prueba de Kolmogorov-Smirnov. En este caso, el análisis estadístico se realizó mediante análisis paramétrico. Las comparaciones de dos grupos se analizaron utilizando el test t de Student pareada de dos colas para muestras dependientes, o el test t no pareado para muestras independientes. Las comparaciones múltiples se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional o bidireccional seguido por el test post hoc de Bonferroni.

Resultados

Efectos del sildenafil relajantes y anti-contráctiles sobre arterias pulmonares de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática.

Basados en las características clínicas definimos cuatro grupos que describimos en la tabla 5:

Características clínicas				
	Pacientes control	FPI	FPI + Hipertensión pulmonar	Hipertensión pulmonar
Nº pacientes	18	9	8	4
Edad	59 (42–71)	61 (56–75)	65(52–73)	45 (42–52)
Sexo	15/3	12/5	25/11	3/1
Habito tabáquico				
No fumadores/fumadores	7/11	3/6	4/4	4/0
Años/paquete	26 (0–32)	28.3 (6–35)	31 (9–38)	0
VEMS %	No determinada	72.8 (58–101)	73 (53–98)	92 (91–95)
CVF%	No determinada	70.2 (63–79)	71 (48–76)	No determinada
CV %	No	73.5 (45–	66 (43–90)	No

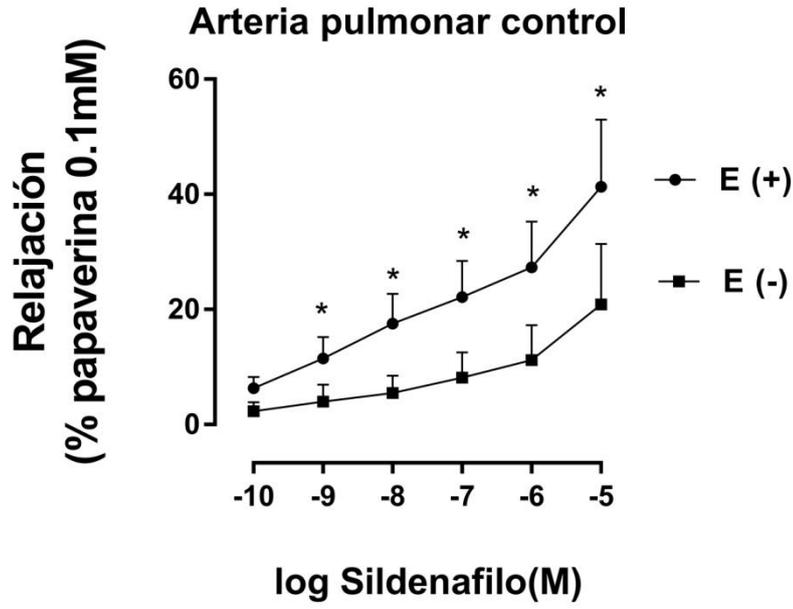
	determinada	89)		determinada
DLCO%	No determinada	50.1 (34–61)	40.8 (20–61)	No determinada
% Vidrio deslustrado	0	19 (8–39)	22 (9–35)	0
% Patrón en panal	0	28 (15–40)	26 (12–39)	0
PaO2 mmHg basal	94 (88–96)	65 (45–88)	60 (40–85)	62 (48–75)
mPAP mmHg	No determinada	20.5 (16–22)	43 (36–48)	69 (42–74)
N-acetil cisteína (si/no) ¹	0/21	4/5	5/4	0/4
Pirfenidona (si/no) ¹	0/21	2/7	1/7	0/4

Tabla 5 Características clínicas. Los datos se presentan como medianas (rango intercuartílico), salvo que se indique lo contrario. VEMs%: porcentaje del volumen espiratorio máximo respecto al predicho; CVF%: porcentaje de la capacidad vital forzada respecto al predicho; CV%: porcentaje de la capacidad vital respecto a la predicha; PaO2: presión arterial de oxígeno; mPAP: presión arteria pulmonar media; ¹: pacientes que recibían dicho tratamiento al tomar muestra.

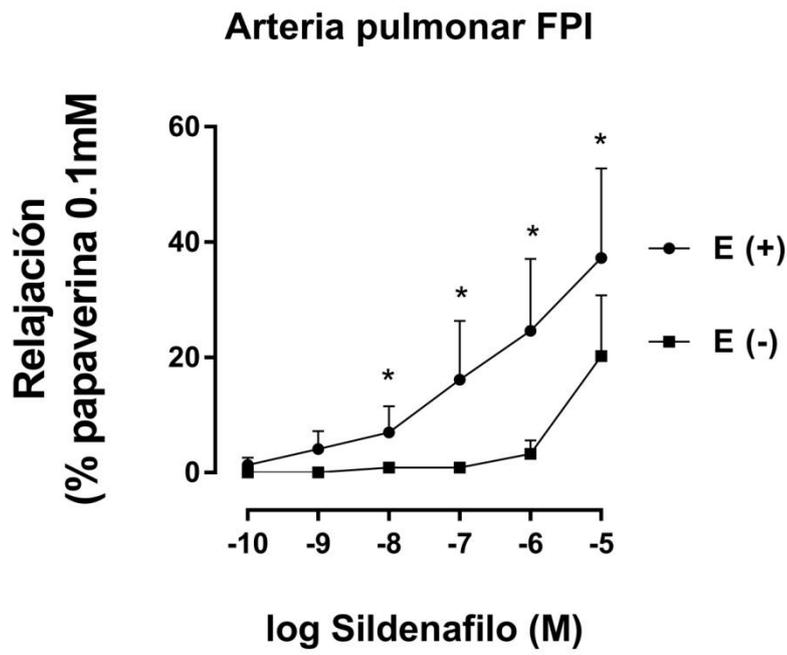
Como ya hemos visto en materiales y métodos se realizaron dos tipos de protocolo. Uno relajante y otro de vasoconstricción.

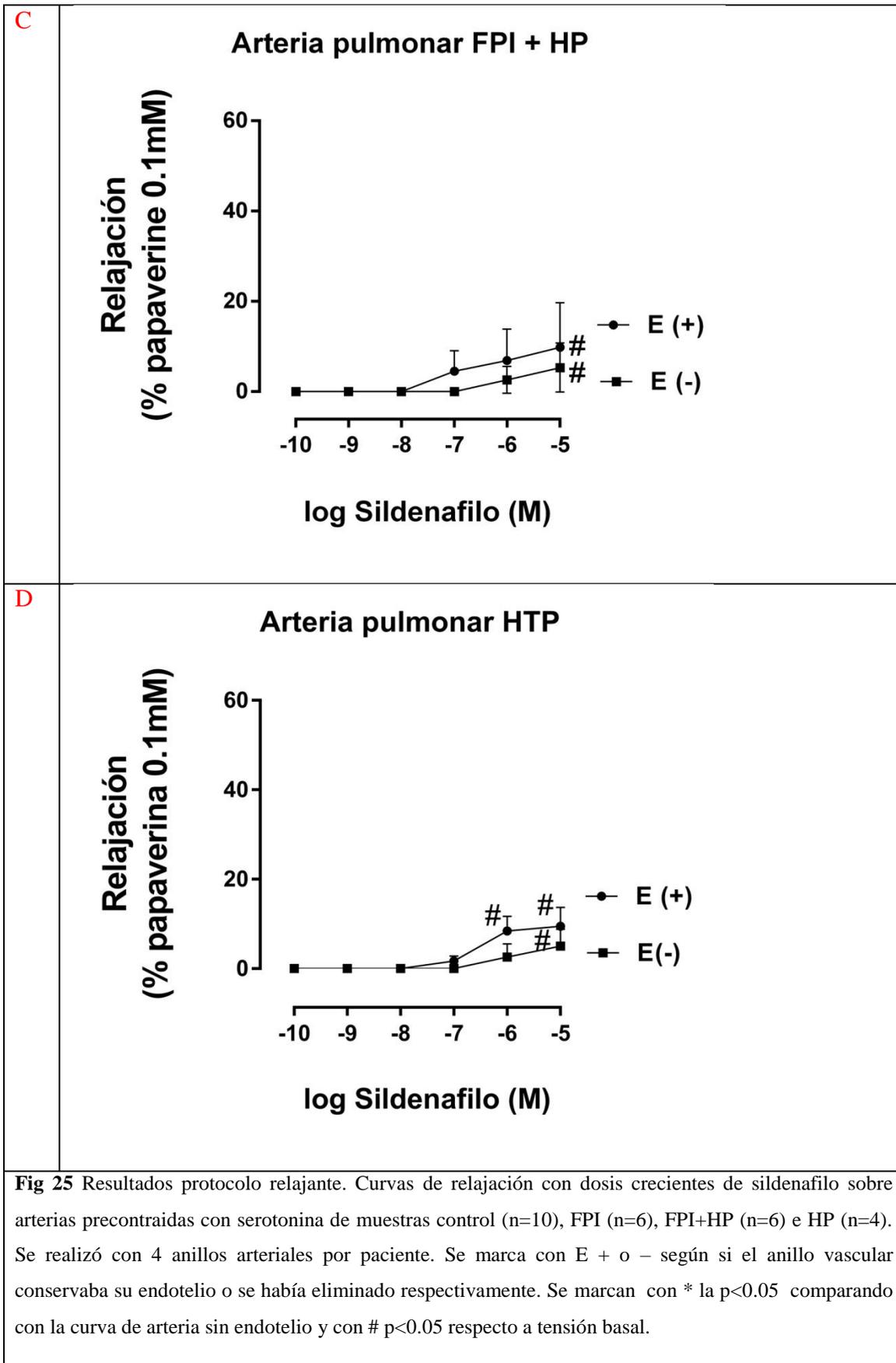
En el protocolo relajante (se añade Sildenafil sobre arterias precontractadas con 5-HT). Sildenafil tuvo un efecto relajante dependiente de su concentración sobre los anillos de la arteria pulmonar. Dicho efecto vasodilatador fue mayor en el grupo control y de FPI (máximo efecto de relajación de $41,3 \pm 11,6\%$ y $37,22 \pm 15\%$, respectivamente) que los grupos de FPI con Hipertensión e Hipertensión primaria ($9,8 \pm 5,8\%$ y $9,46 \pm 4,23\%$) diferencia estadísticamente significativa con $p < 0,05$ en comparación con los grupos control y FPI, (figura 25 A-D).

A



B





Cuando se eliminó el endotelio, el efecto de relajación máxima del sildenafil disminuyó en los anillos de la arteria pulmonar control y FPI a $20,8 \pm 10\%$ y $20,19 \pm 10,5\%$, respectivamente, mientras que el efecto relajante máximo del sildenafil permaneció similar en FPI+HP e HP (Figura 25 C y D. Con endotelio: “E(+)”, sin endotelio “E(-)”).

El segundo protocolo fue vasoconstrictor. Como vimos en materiales y métodos los anillos de la arteria pulmonar se incubaron inicialmente con sildenafil ($0,1-10 \mu\text{M}$) y 30 minutos después se administraron dosis acumulativas de 5-HT ($0,1 \text{ nM}$ a $10 \mu\text{M}$). Viendo así el efecto anticontráctil en las arterias tratadas con sildenafil. Los resultados se muestran en la tabla 6.

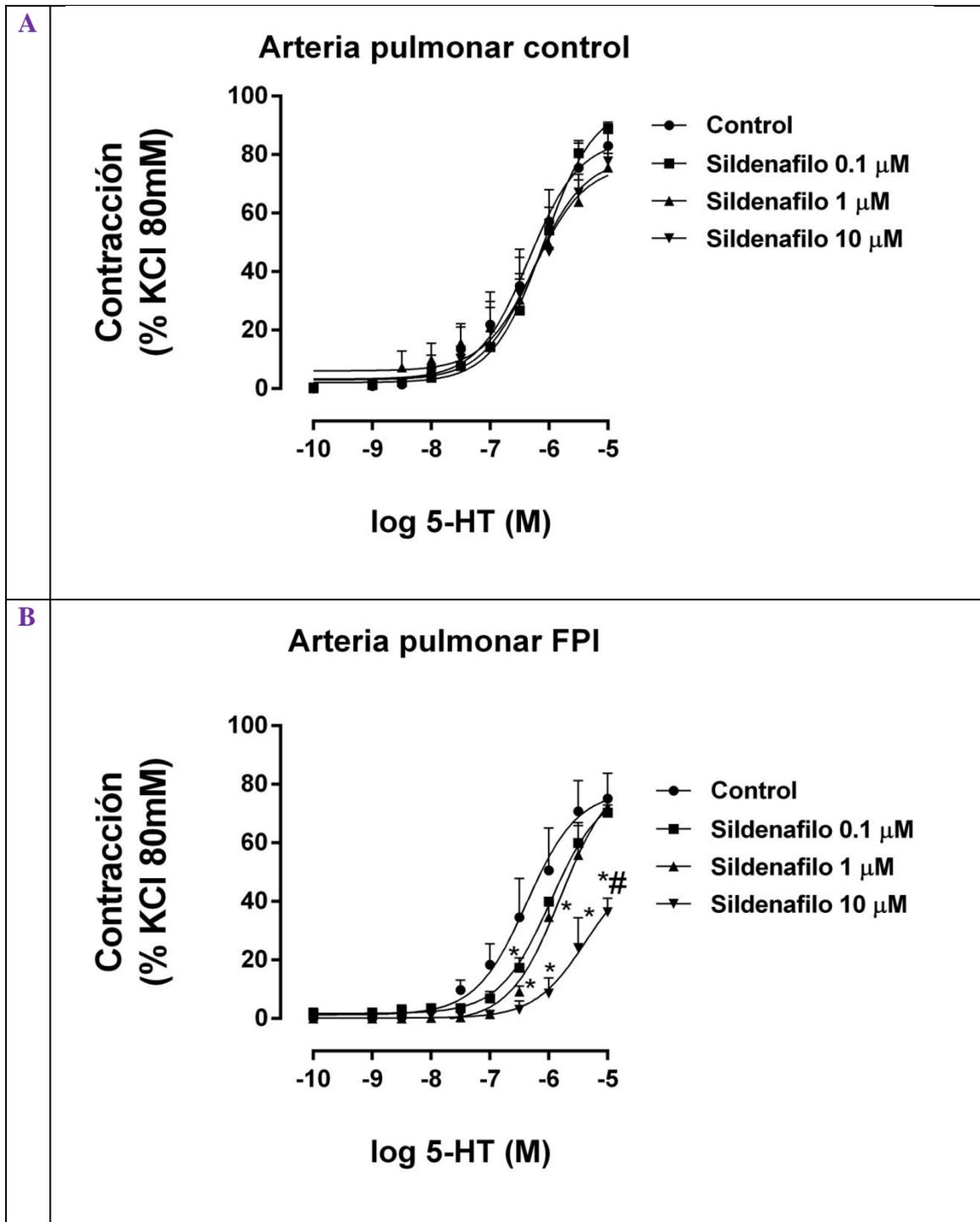
Tratamiento	Pacientes control	Fibrosis pulmonar	Fibrosis + hipertensión	Hipertensión pulmonar
Control	84.0 ± 7.6 n=7	80.1 ± 12.1 n=3	77.8 ± 6.1 n=4	80.3 ± 3.8 n=4
Sildenafil $0.1 \mu\text{M}$	88.7 ± 2.3 n=7	75.2 ± 5.1 n=3	64.6 ± 7.7 n=6	67.5 ± 10.0 n=3
Sildenafil $1 \mu\text{M}$	76.0 ± 4.8 n=7	66.5 ± 5.8 n=3	42.3 ± 3.8 n=3	50.3 ± 3.1 n=3
Sildenafil $10 \mu\text{M}$	79.3 ± 4.3 n=7	34.9 ± 3.1 n=3	24.7 ± 8.6 n=6	21.2 ± 3.9 n=4

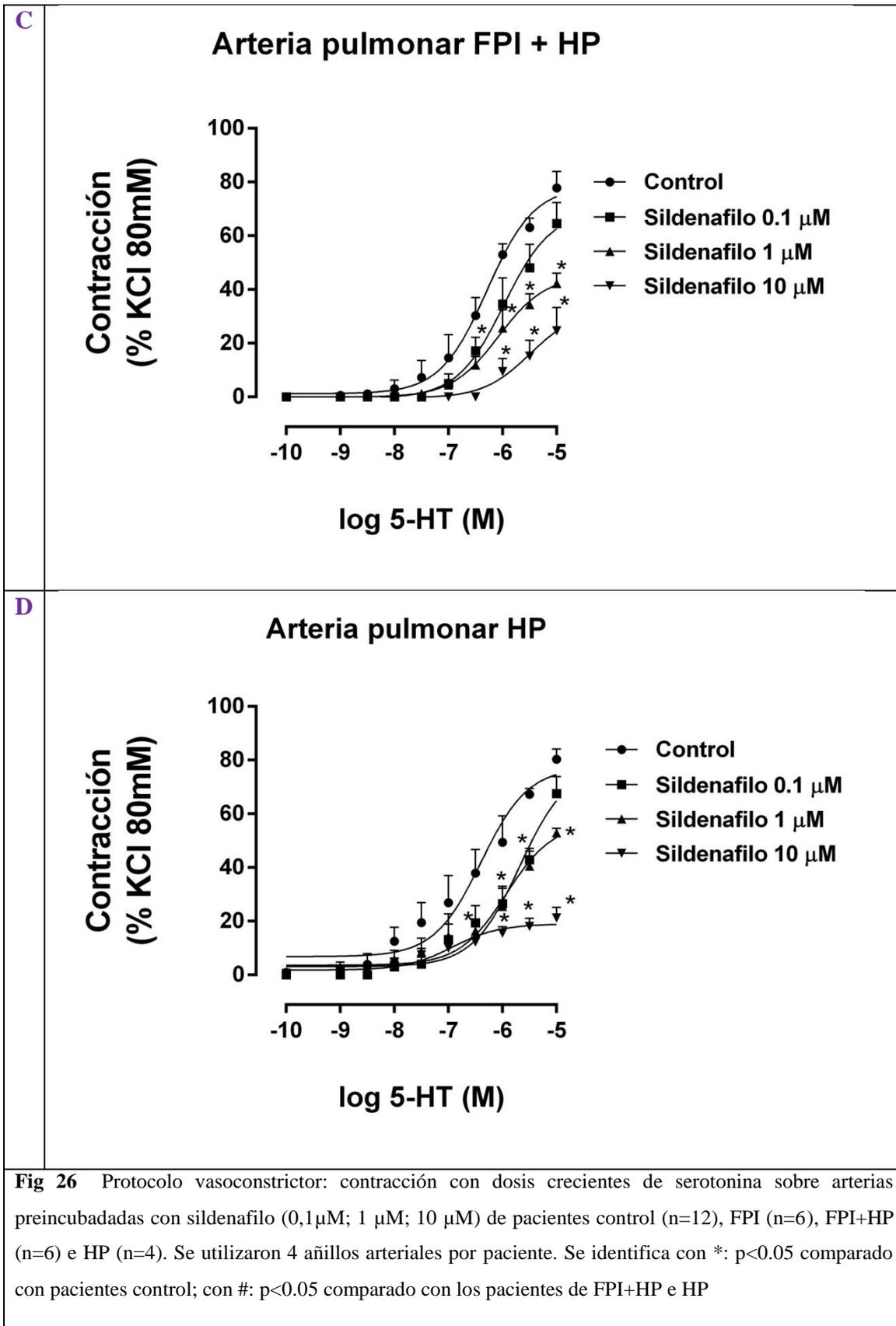
Tabla 6 Resultados del efecto vasoconstrictor de la serotonina expresado en porcentaje respecto a la contracción máxima con KCl 80mM .

El sildenafil no inhibió significativamente las contracciones inducidas por 5-HT en las muestras control (figura 26A). En contraste, la contracción inducida por 5-HT fue significativamente inhibida por el sildenafil de forma directamente relacionada a su concentración en:

- Los anillos de arteria pulmonar humana de FPI: inhibición máxima, $54,3 \pm 3\%$, $p < 0,05$ frente a control (figura 26B)

- Anillos de arteria pulmonar humana de FPI+HP. Con una inhibición máxima de 68,3% $P < 0,05$ versus control (figura 26C)
- Anillos arteriales de HP. Con una inhibición máxima de 73,6%, $p < 0,05$ frente a control, (figura 26D).





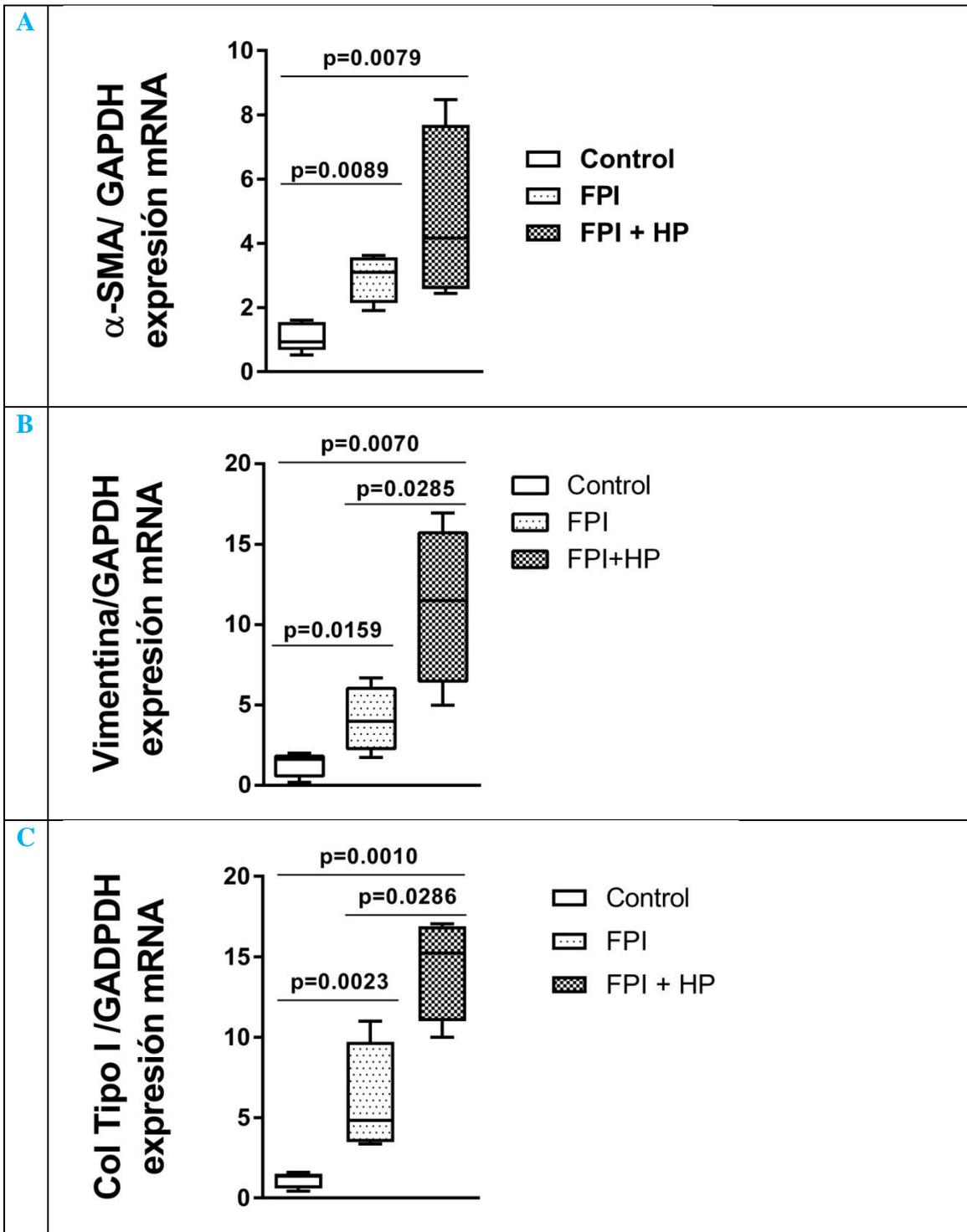
Es importante destacar que el efecto inhibitor del sildenafil sobre la contracción inducida por la 5-HT fue significativamente mayor en los anillos arteriales de FPI+HP e HP que en los pacientes con FPI ($p < 0,05$).

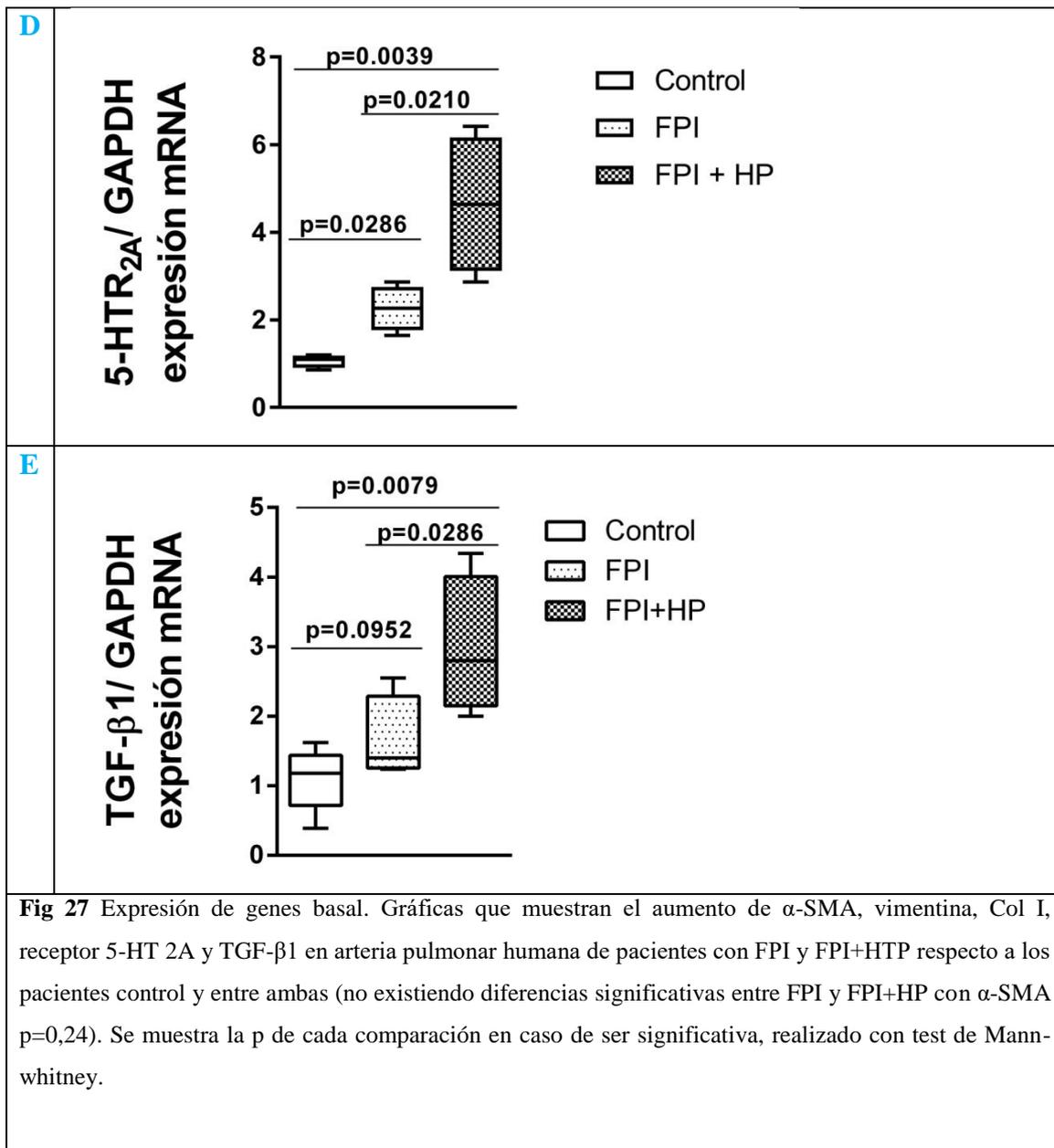
Caracterización de los marcadores de remodelación en arterias pulmonares del grupo control y de pacientes con FPI con o sin HP

Con los resultados de los experimentos funcionales realizados en el baño de órganos hemos visto cómo sildenafil tenía diferentes efectos relajantes/anti-contráctiles en la arteria pulmonar de todos los grupos estudiados: control, FPI y FPI+HP e HP. Dichas diferencias deberían tener su explicación en los procesos de remodelación de la arteria pulmonar.

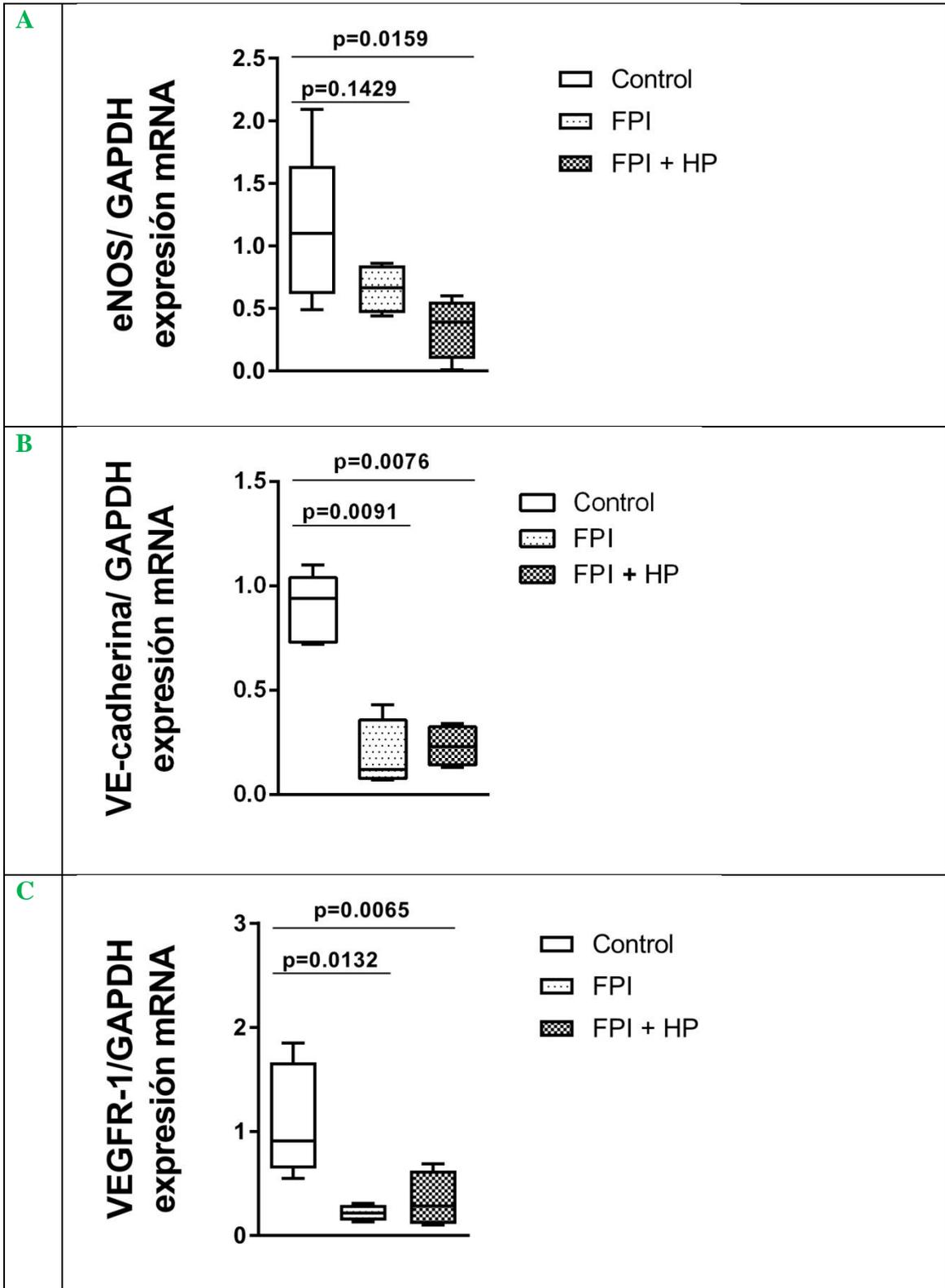
Para ello se realiza el estudio de los marcadores de mesénquima y de miofibroblastos en las arterias pulmonares conforme se describe en materiales y métodos. Seleccionando la expresión mRNA de genes que nos permitirán caracterizar las transformaciones celulares y detectándolos por RT-PCR en tiempo real. Se aislaron arterias pulmonares del grupo control (18 muestras), de 9 pacientes con FPI y de 8 pacientes con FPI más hipertensión pulmonar. Primero describiremos los resultados del análisis de la expresión del mRNA de los marcadores de remodelado endotelial. Posteriormente se muestra la expresión proteica de las quinasas reguladoras extracelulares 1 y 2 fosforiladas y la SMAD3 también fosforilada. En este segundo caso se analizan la expresión proteica con Western blot. Posteriormente se mostrará el estudio por inmunofluorescencia de la fosfodiesterasa tipo 5 y la alfa actina de musculo liso.

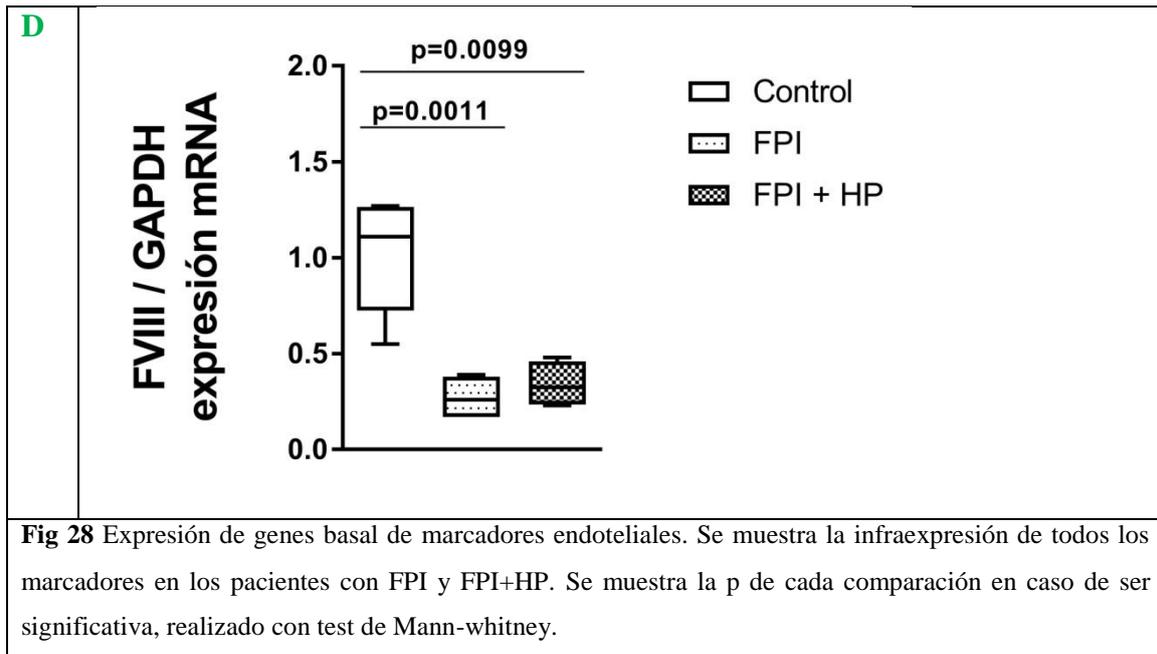
La expresión basal de: α -SMA, vimentina, Col I, receptor 5-HT 2A y factor de crecimiento transformante β 1 (TGF)- β 1 estaba incrementada significativamente en las arterias pulmonares de pacientes con FPI y FPI+HP en comparación con los controles (figura 27 A-E), lo que sugiere un aumento de la muscularización, un aumento del depósito en la matriz extracelular y fibrosis. Por otra parte la expresión de vimentina, Col I, 5-HT receptor 2A y TGF- β 1 fueron mayores en las arterias pulmonares de pacientes con FPI+HP en comparación con los de los pacientes con IPF (figura 27 B,C,D,E), lo que indica su papel en el desarrollo de hipertensión pulmonar.



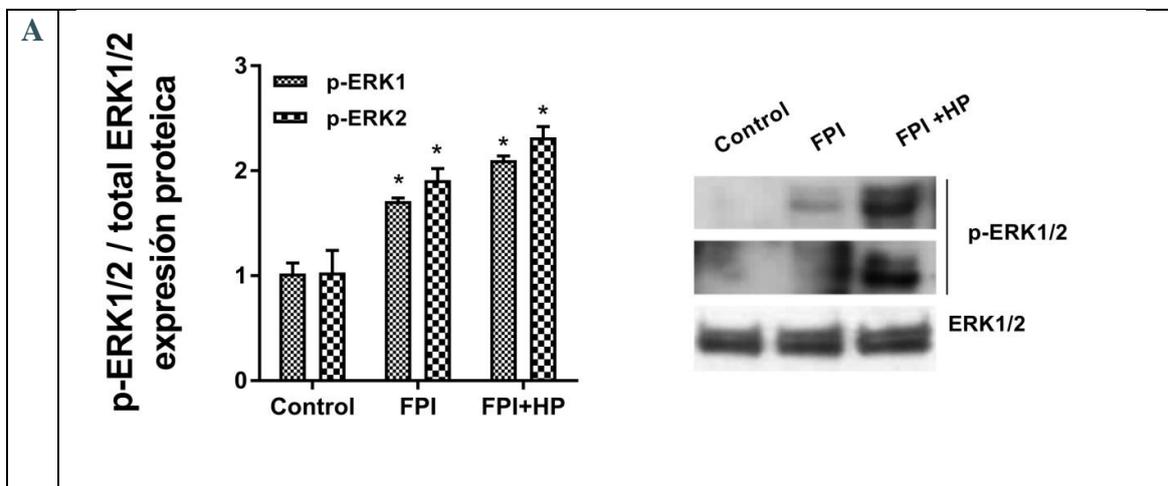


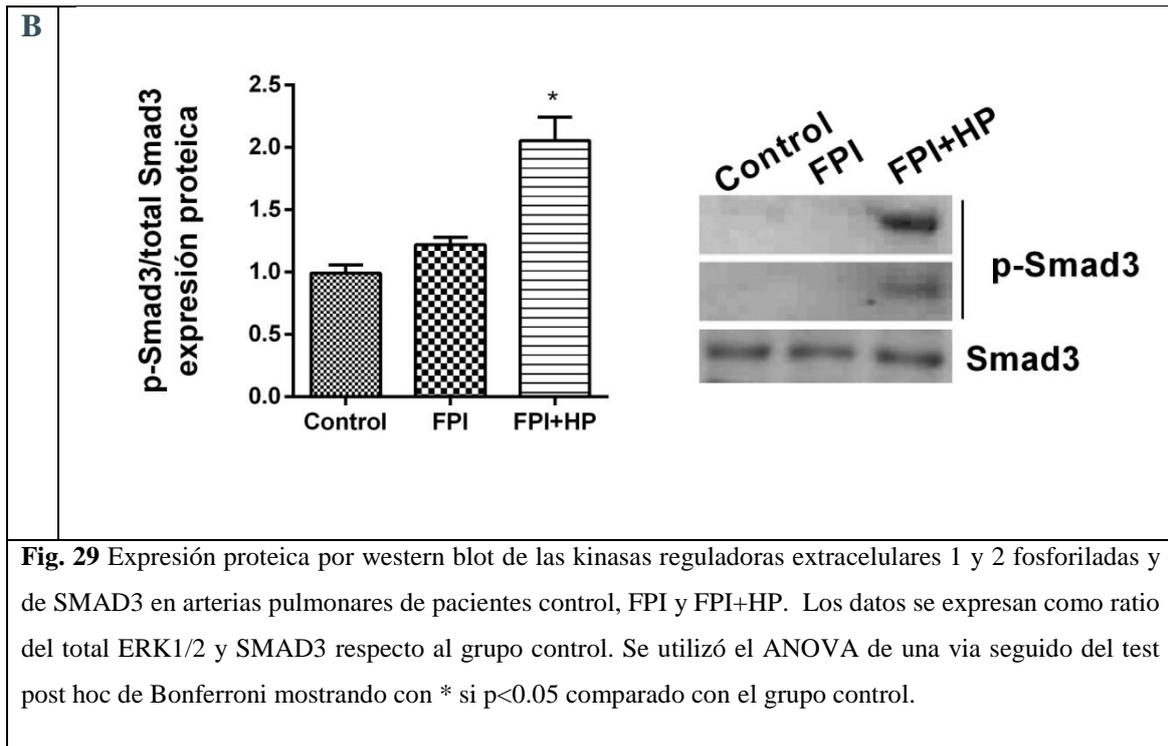
Los marcadores endoteliales: Óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS), (VE)-cadherina de endotelio vascular, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y el factor VIII (FVIII) estaban menos expresados en las arterias pulmonares de los pacientes con FPI y FPI+ HP (figura 28 A-D), lo que indica el deterioro de la función endotelial o un cambio en el fenotipo del endotelio.





La fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 fue mayor en las arterias pulmonares de pacientes con FPI + HP; Sin embargo esta mayor fosforilación respecto a los grupos control fue inferior en las arterias pulmonares de los pacientes con FPI ($p < 0.05$) (figura 29 A-B).





La expresión de la PDE5 (figura 30) estudiada por inmunofluorescencia se incrementó en las arterias pulmonares de pacientes con FPI y FPI+HP. Localizándose principalmente en las células endoteliales y en la íntima. Mientras que la PDE5 se expresó débilmente en las arterias pulmonares de los grupos control. Estos datos se corroboran con el estudio de expresión del mRNA de PDE5 con diferencia significativa entre FPI y FPI+HP con los grupos control.

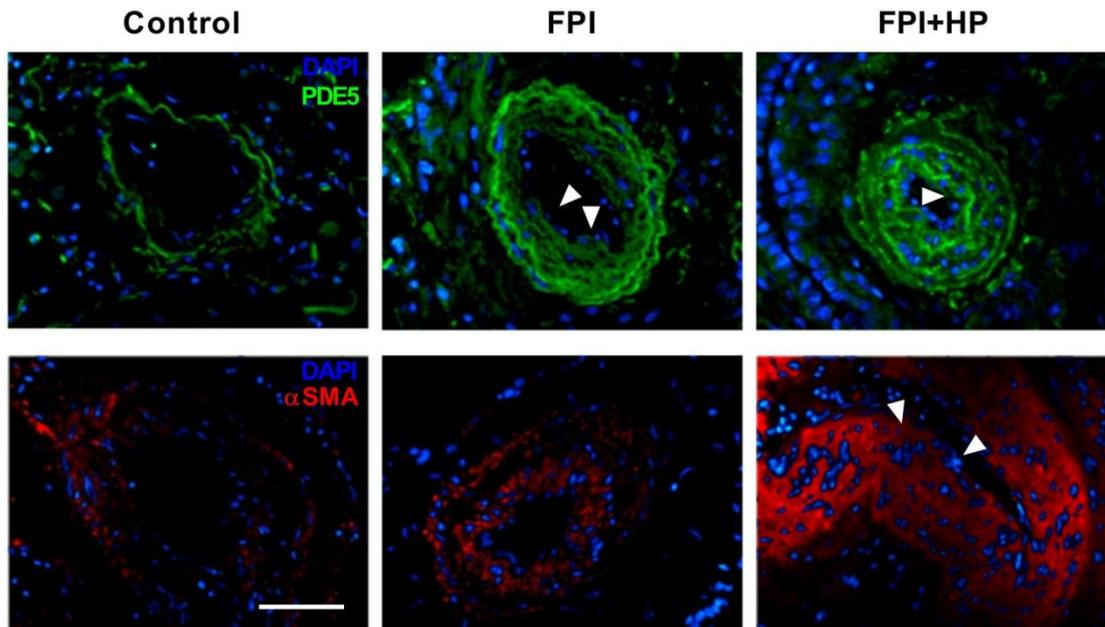


Fig 30 Inmunofluorescencia de fosfodiesterasa5 y α -SMA de anillos arteriales de parénquima pulmonar control, FPI y FPI+HP. Escala 200 μ m. Se utiliza DAPI para marcar los núcleos celulares. Se marca el endotelio con flechas blancas.

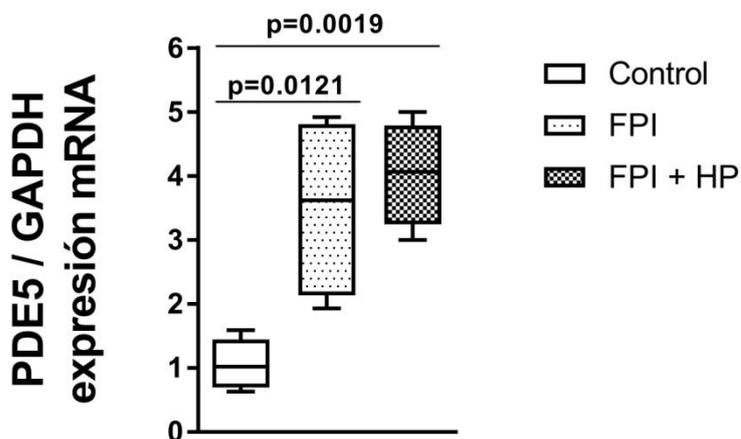


Fig 31 Expresión de genes basal de PDE5. Se muestra la p de comparación entre grupos en caso de ser significativa, realizado con test de Mann-whitney.

Efectos anti-remodelación del sildenafil en las arterias pulmonares humanas de pacientes con FPI

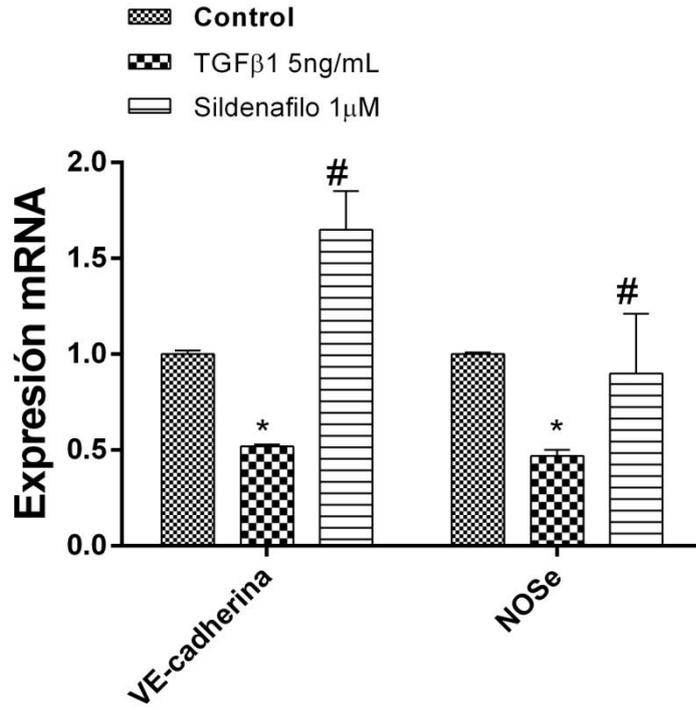
En los experimentos ex vivo se cultivaron anillos de arteria pulmonar con y sin fibrosis pulmonar idiopática y se estimularon con 5ng/mL de TGF- β 1 durante 72 h en presencia o ausencia de sildenafil (10 nM-1 μ M). En el caso del estudio con sildenafil, previo al estímulo con TGF- β 1 se incubaron con la concentración de sildenafil marcada durante una hora. Posteriormente como hemos visto en materiales y métodos, se homogeneizaron para extraer mRNA y realizar el estudio de expresión génica, o bien se incluyeron muestras en parafina para realizar análisis por inmunofluorescencia.

En anillos vasculares de 4 pacientes control (sin FPI) el tratamiento con TGF- β 1 (5ng/mL) dio como resultado una disminución de la expresión de los marcadores endoteliales VE-cadherina y eNOS (figura 32 A). En contraste, este tratamiento aumentó la expresión de PDE5 y los marcadores mesenquimales Col I y vimentina, pero no significativamente de α -SMA o TGF- β 1 (figura 32 B y 33 A).

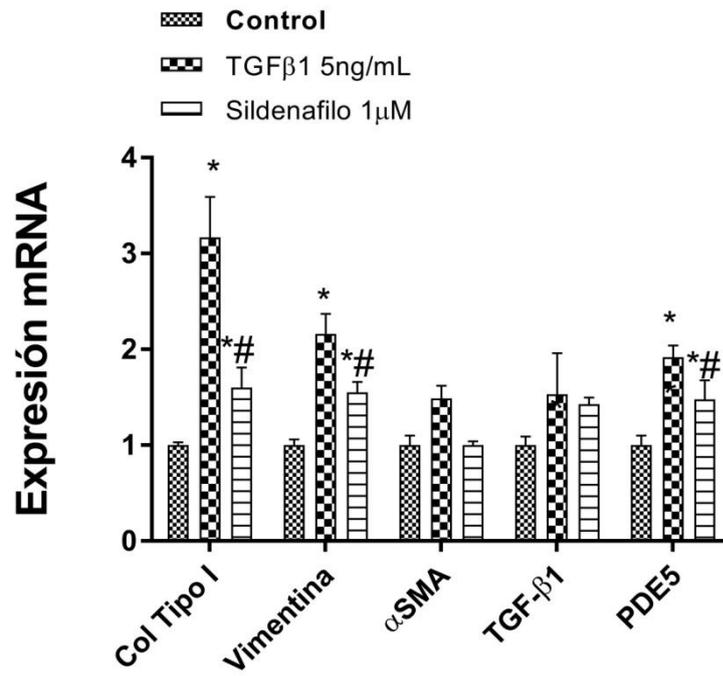
Estos cambios también se observaron en las arterias pulmonares de los 4 pacientes con FPI, donde la pérdida de endotelio y el aumento de los marcadores mesenquimales fueron más elevados, incluyendo en este caso, al contrario de lo que sucedía con los casos control, la elevación significativa de α -SMA y TGF- β 1 (figura 32 D y C; 33 B).

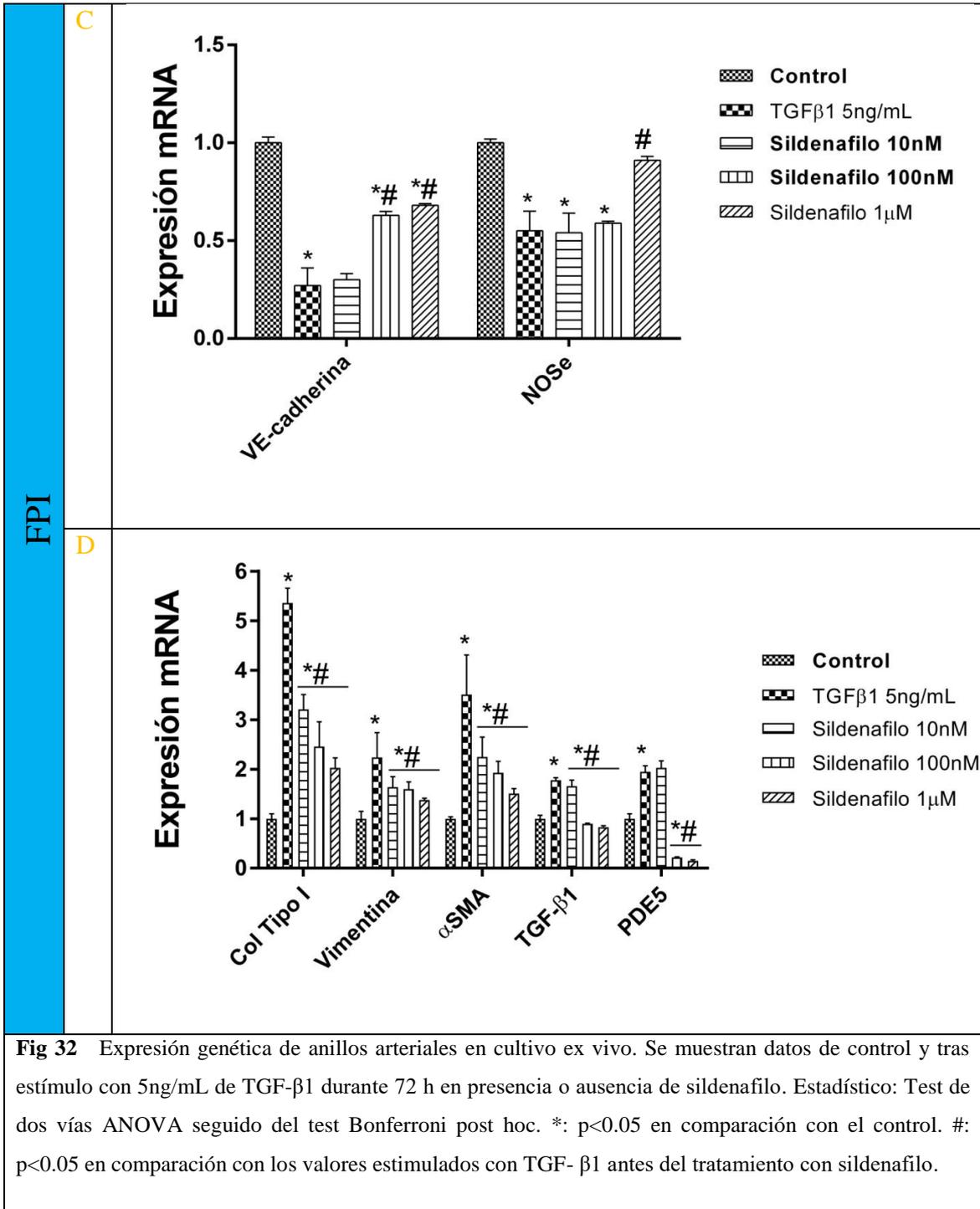
CONTROL

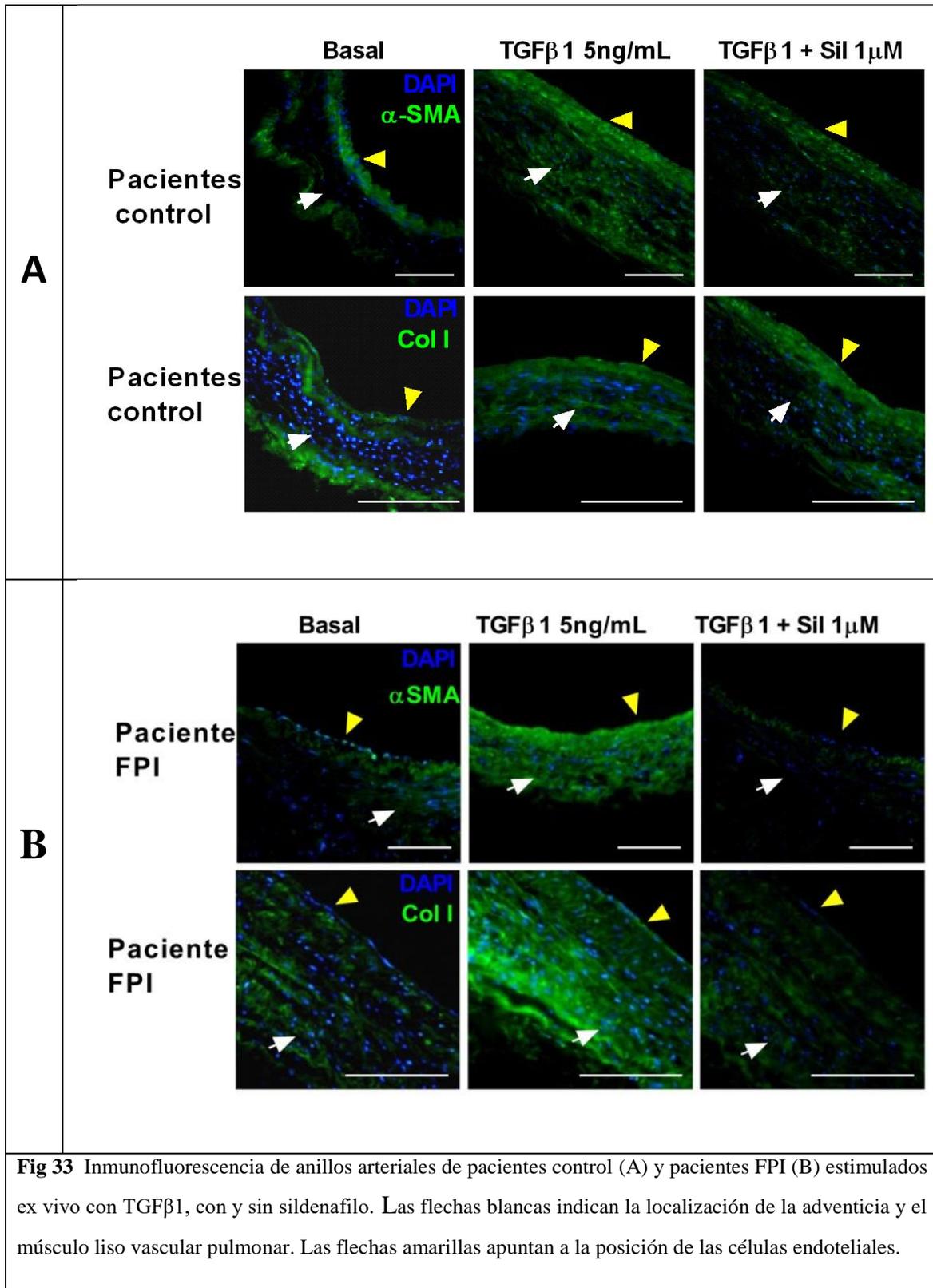
A



B







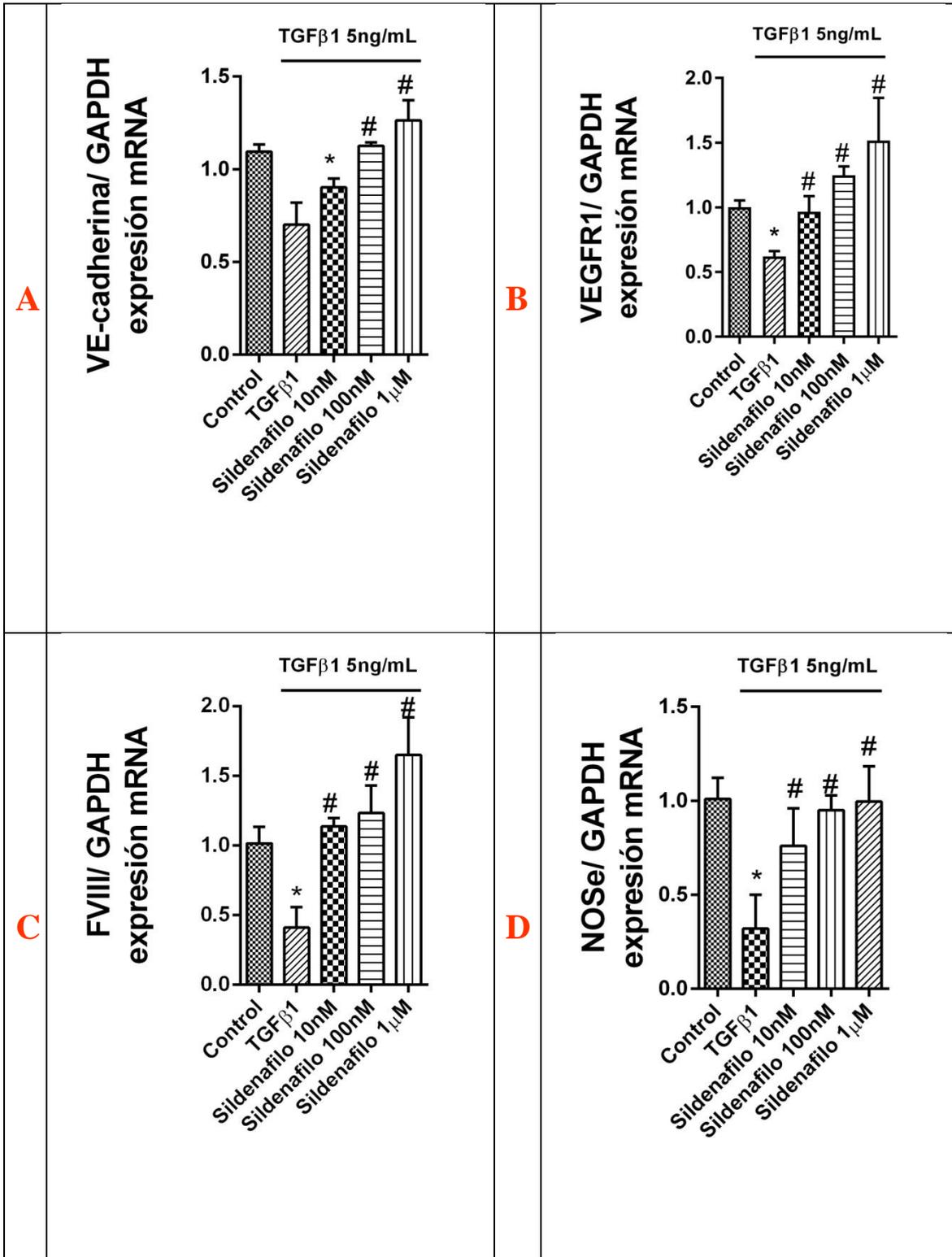
El sildenafil en arteria pulmonar inhibió las transiciones de endotelio a mesenquima y de células del músculo liso a miofibroblastos inducidas por TGF- β 1.

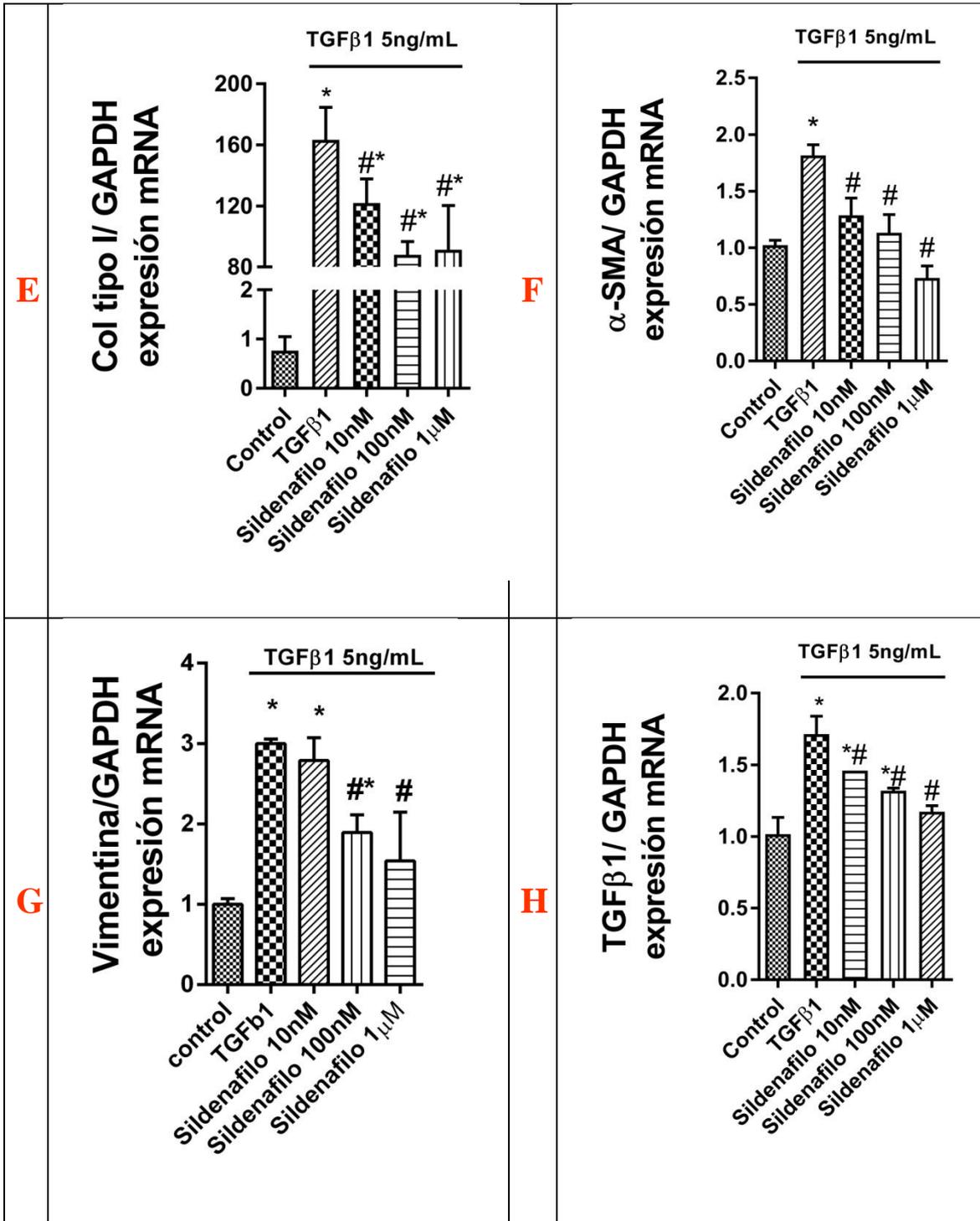
Los experimentos siguientes fueron diseñados para explorar los efectos anti-remodelación del sildenafil en células endoteliales de arteria pulmonar humana aisladas y cultivadas (HPAEC) y células musculares lisas de arteria pulmonar humana (HPASMCs) de pacientes con FPI (n=4).

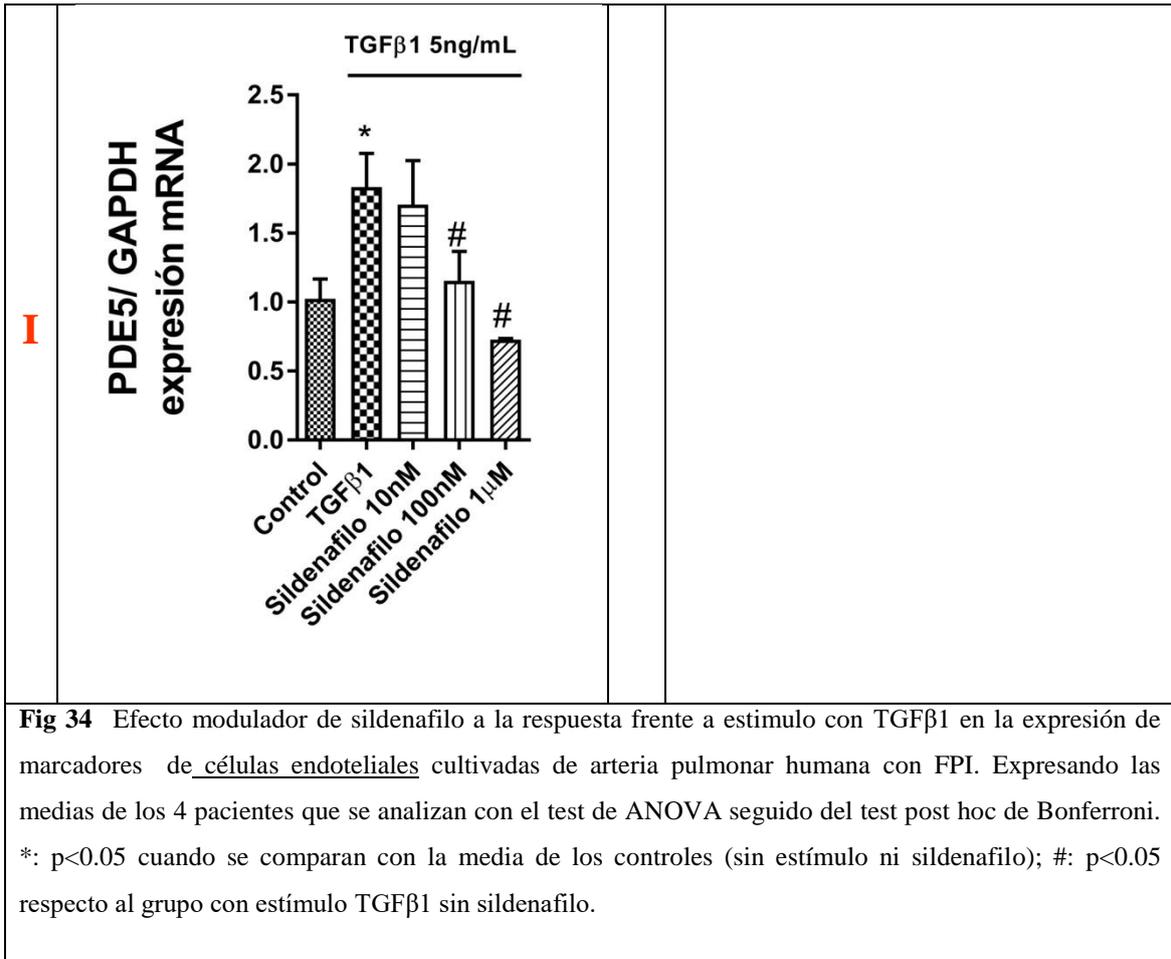
Como hemos visto en materiales y métodos, se aislaron células endoteliales de arteria pulmonar humana y células musculares lisas de arteria pulmonar humana de 4 pacientes con FPI. Se incubaron con diferentes concentraciones de sildenafil (10nM a 1 μ M) durante 30 minutos y después se estimularon con 5ng/ml TGF- β 1 durante 72 horas en el caso de las células endoteliales y 48 horas en las células de músculo liso. Posteriormente se analizaron los marcadores de expresión del mRNA endoteliales y mesenquimales mediante el ensayo BrdU ya explicado en métodos. Los resultados en las graficas se muestran como medias de los 4 pacientes y se analizaron con el test de ANOVA seguido del test post hoc de Bonferroni, se muestra con asterisco los resultados significativos (p<0.05) cuando se comparan con la media de los controles (sin estímulo ni sildenafil) y con almohadilla cuando existe significación respecto al grupo con estímulo TGF β 1 sin sildenafil.

La incubación de las células endoteliales con TGF- β 1 cambió su fenotipo de endotelial a un fenotipo mesenquimal/miofibroblástico caracterizado por la pérdida de la expresión mRNA de los marcadores endoteliales VE-cadherina, VEGFR1, FVIII y eNOS (Figura 34 **A, B, C y D**). Y por otro lado determinó un aumento en los marcadores mesenquimales Col I, α -SMA y vimentina (figura 34 **E-F-G**), así como la expresión de los factores profibróticos TGF- β 1 y PDE5 (figura 34 **H-I**).

Y como vemos en las gráficas de la figura 34 la incubación con Sildenafil impidió los cambios resultantes del estímulo con TGF β 1 en su mayoría desde una concentración baja (10 nM) permitiéndoles mantener a las células su fenotipo endotelial.



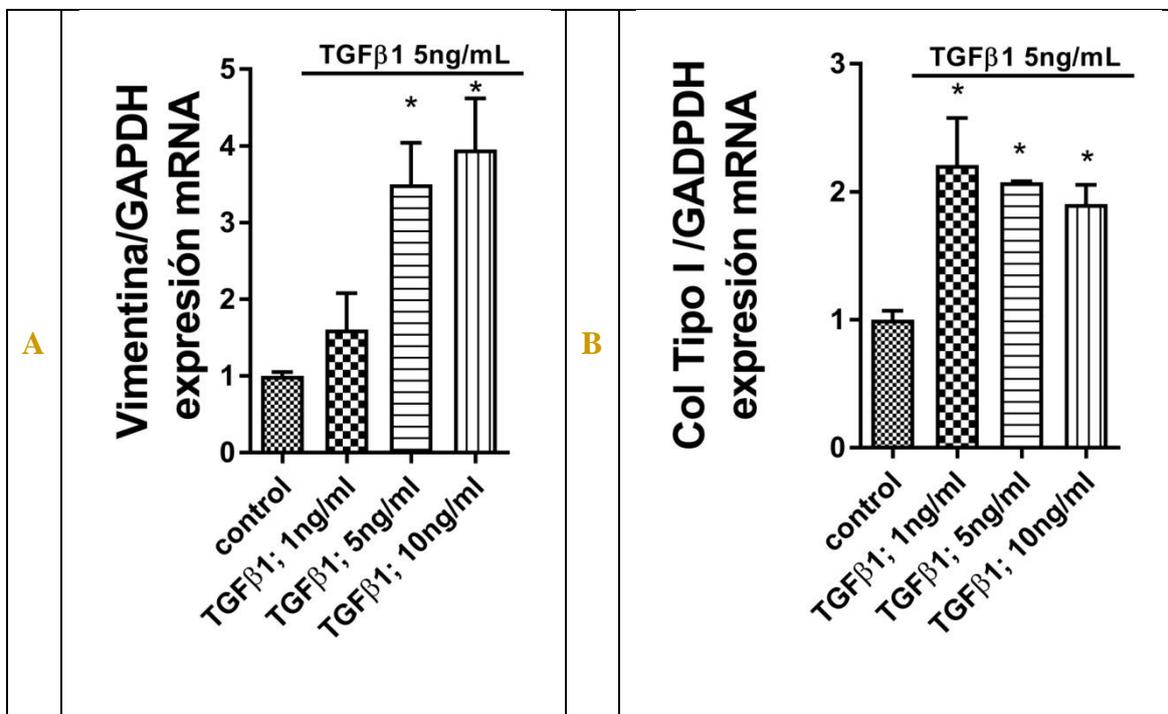


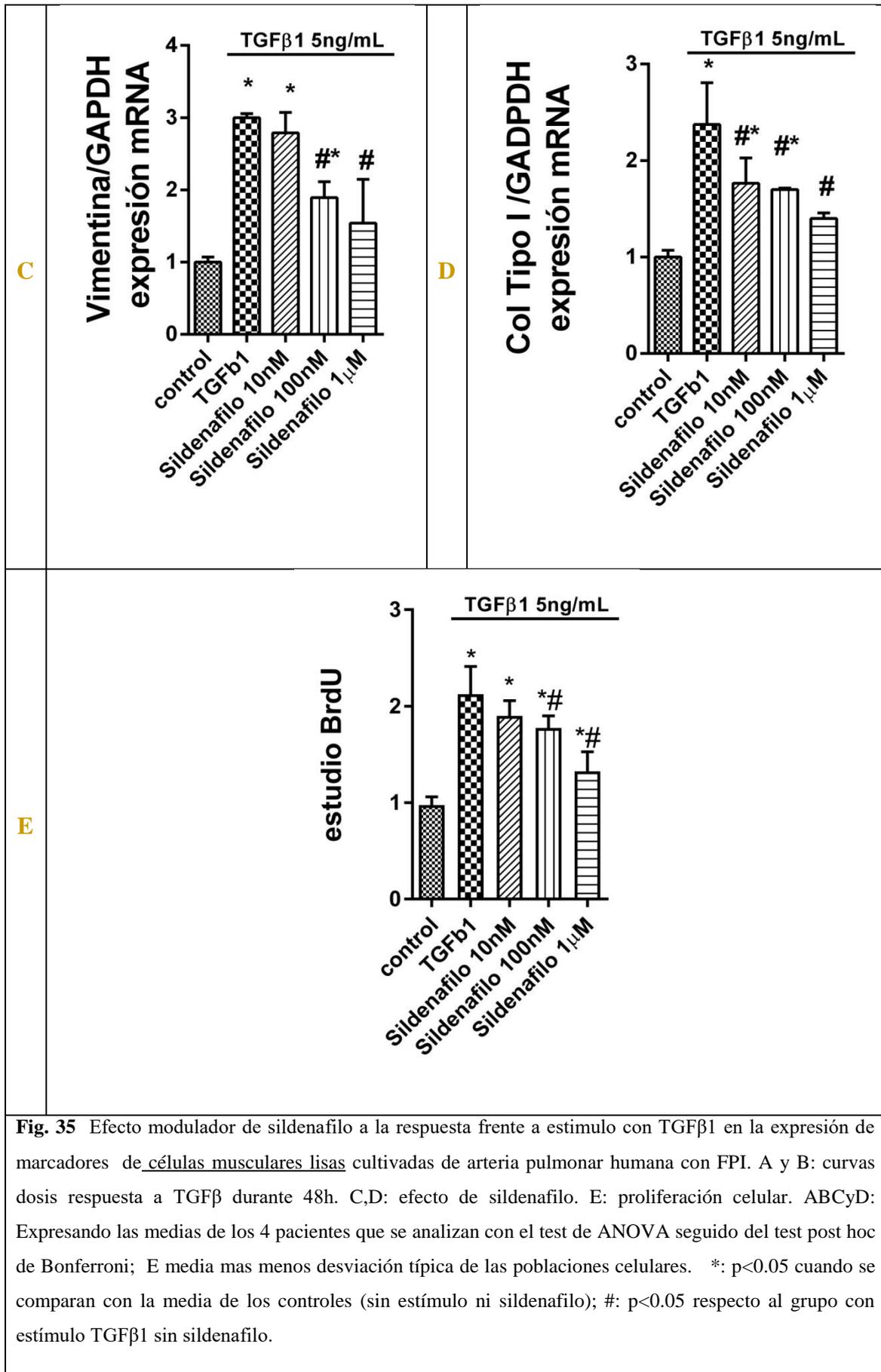


En el caso de las células de músculo liso de arteria pulmonar humana con FPI, TGF- β 1 aumentó la expresión del mRNA de Col I y vimentina (Figura 35 **A** y **B**). Siendo significativo en todas las dosis de TGF β 1 para colágeno tipo I respecto a control y en las dosis de 5ng/ml y 10ng/ml para Vimentina.

Cuando se incubaron las células musculares lisas con sildenafil el efecto producido por TGF β fue inhibido tanto para vimentina como para colágeno tipo I, salvo en la concentración más baja de sildenafil en el caso de la vimentina (figura 35 **C** y **D**)

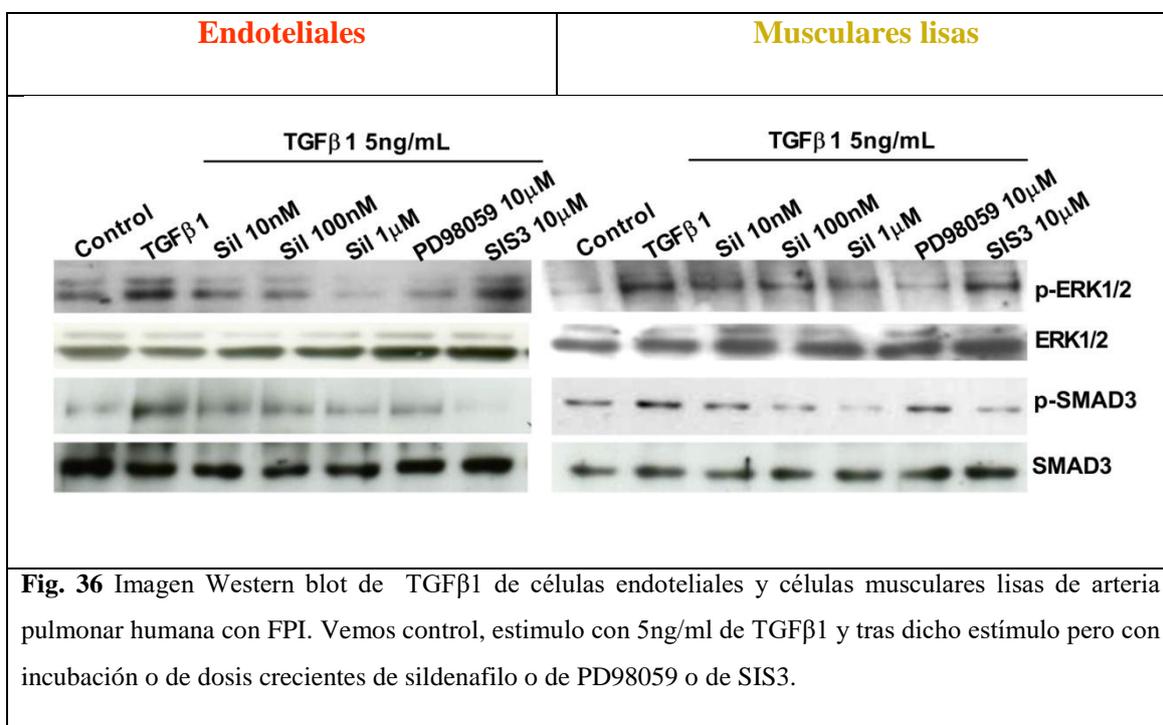
Por otro lado células musculares lisas de arterias pulmonares humanas de pacientes con FPI se incubaron como hemos descrito en materiales y métodos con sildenafil durante 30 minutos para posteriormente estimularlas con 5ng/ml de TGF β 1 durante 48h en los 96 pocillos del test de proliferación celular con bromodeoxiuridina (BrdU). Se muestran los resultados como medias más menos desviación típica de las poblaciones celulares de cuatro pacientes con FPI. Sildenafil inhibió la proliferación inducida por TGF β 1 de las células musculares lisas de arterias pulmonares de pacientes con FPI. Aunque no significativamente en la dosis de sildenafil de 10nM.





Por último se incubaron por separado células endoteliales y células musculares lisas de arterias pulmonares humanas de pacientes con FPI y se midió la expresión proteica por Western blot de fosfo-ERK1/2, de fosfo-SAMD3, de colágeno tipo I y de S100A4 en casos control, en casos tras estímulo con 5ng/ml de TGFβ1 y tras dicho estímulo pero con incubación, o de dosis crecientes de sildenafil o de PD98059 (inhibidor de ERK1/2) o de SIS3 (inhibidor SMAD3) (figura 36). Los datos se expresan como ratio del total de ERK1/2 y SMAD3 en las dos proteínas y sus respectivas fosforiladas; y respecto al total de β-actina para el colágeno tipo I y la proteína S100A4, normalizando según el grupo control. Los resultados se muestran como media más menos desviación típica de las 4 muestras estudiadas y se comparan con el test ANOVA de dos vías seguido del test post hoc de Bonferroni. Como en casos anteriores se identifica en las gráficas con asterisco cuando $p < 0.05$ comparado con el control y con almohadilla cuando se compara con el estímulo con TGFβ1 basal.

El estímulo con TGFβ1 en las células endoteliales y musculares lisas de arterias pulmonares humanas con FPI determinó un incremento en la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3. Dicha fosforilación se inhibe con el sildenafil (figuras 36 y 37).



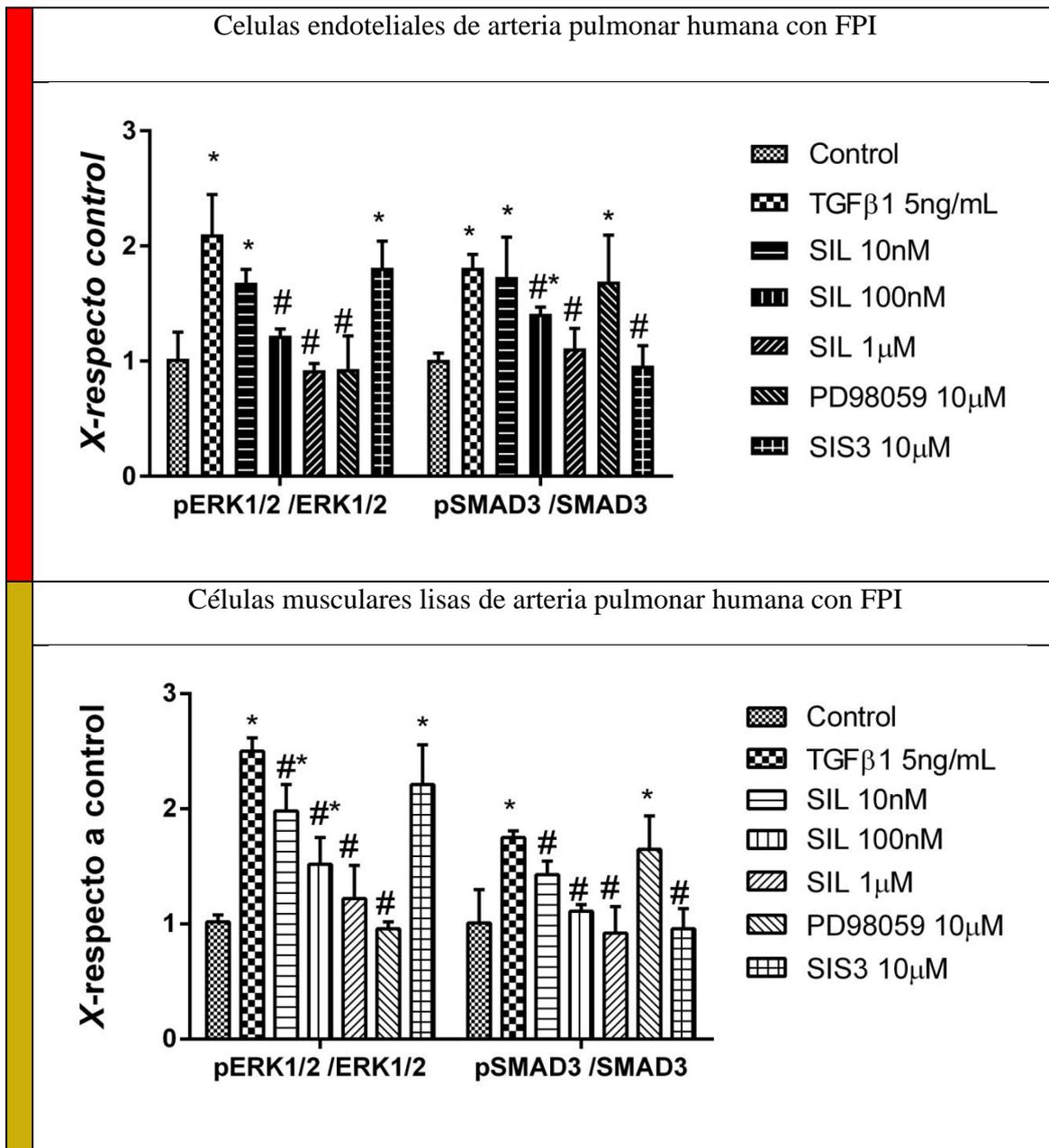
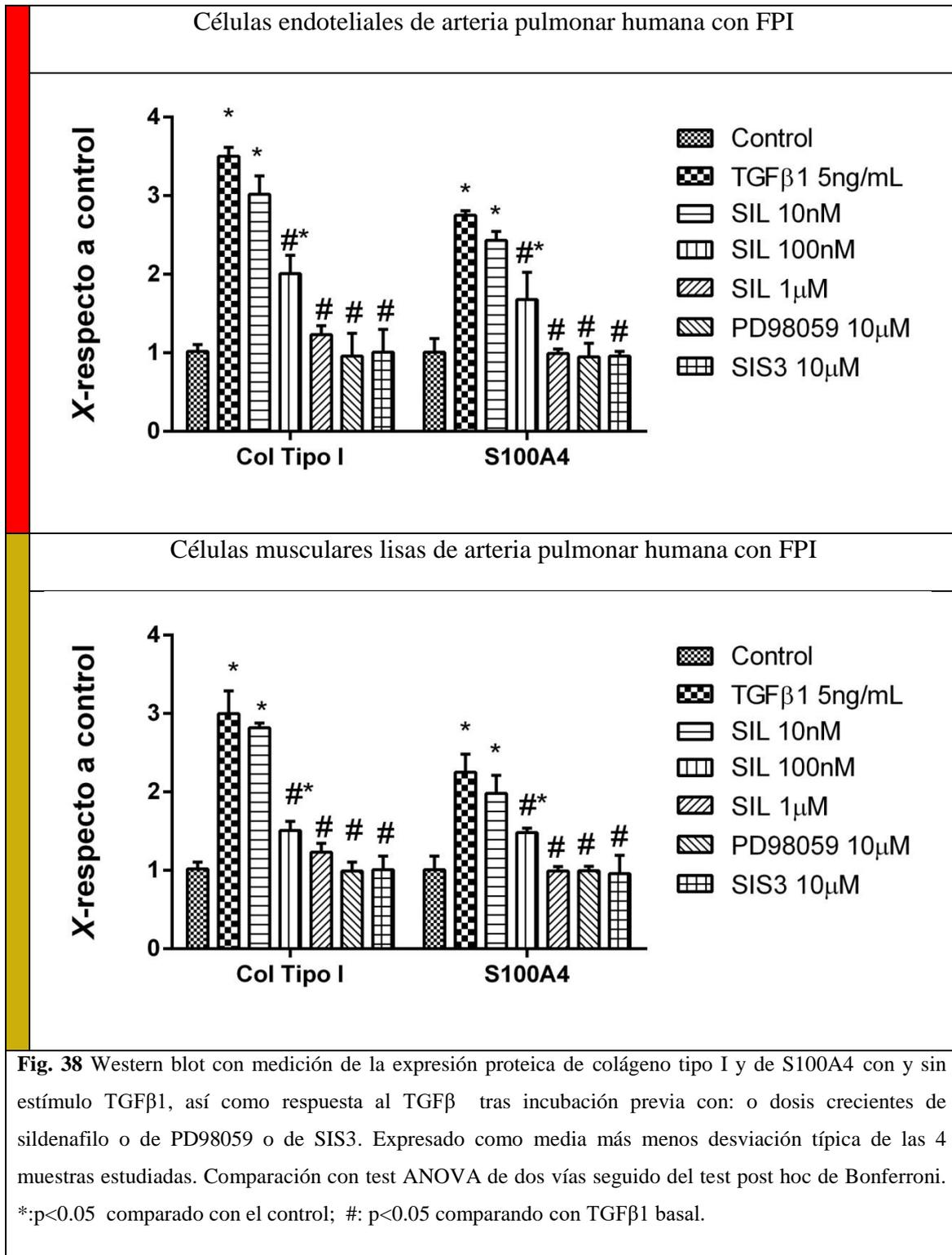
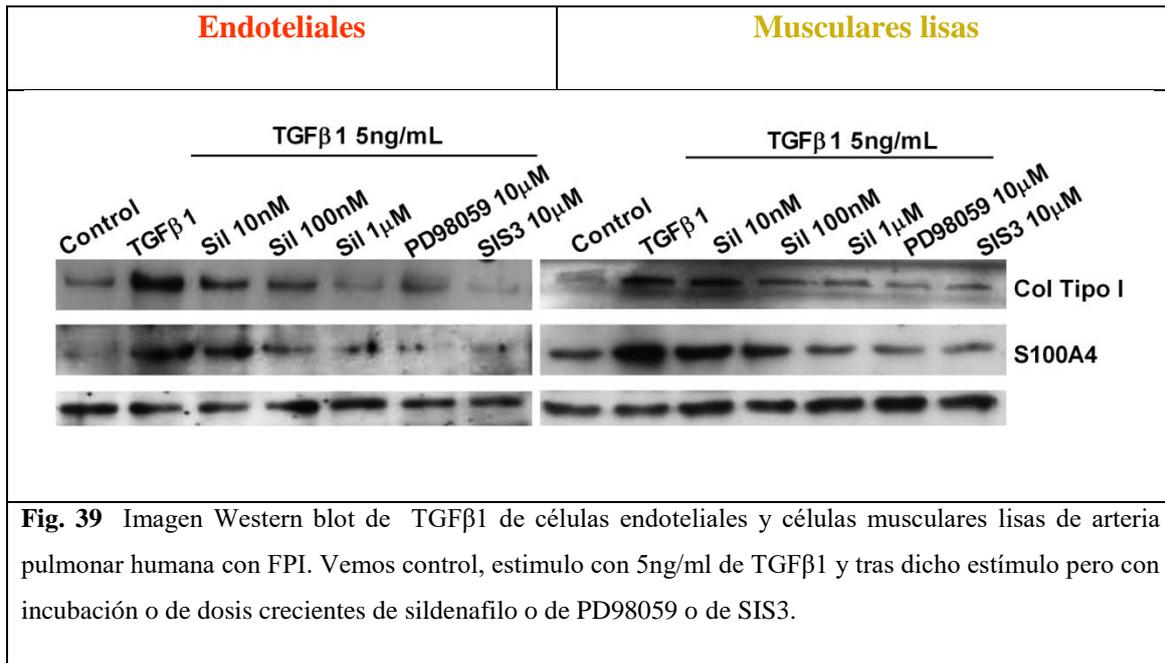


Fig. 37 Western blot con medición de la expresión proteica de la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 en respuesta a TGFβ1 sin y tras dicho estímulo, así como la tras incubación previa con: o dosis crecientes de sildenafil o de PD98059 o de SIS3. Expresado como media más menos desviación típica de las 4 muestras estudiadas. Comparación con test ANOVA de dos vías seguido del test post hoc de Bonferroni. *:p<0.05 comparado con el control; #: p<0.05 comparando con TGFβ1 basal.

De forma paralela las células endoteliales y musculares lisas de arteria pulmonar humana con FPI al ser estimuladas con TGFβ1 aumentaron la expresión de los marcadores de fibrosis: Colágeno tipo I y S100A4. Siendo también su efecto inhibido por el sildenafil, el PD98059 y el SIS3 (figuras 38 y 39).

Con estos resultados se puede deducir que el sildenafil media al menos parcialmente en el efecto antiremodelado de las arterias pulmonares de pacientes con FPI mediante la inhibición de ERK1/2 y SMAD3.





Efectos del sildenafil en modelo animal con fibrosis e hipertensión pulmonar inducidas con bleomicina.

Conforme se describe en materiales y métodos se indujo fibrosis pulmonar e hipertensión en ratas instilando en vía aérea bleomicina para estudiarlas 21 días después. Las imágenes de ventilación se obtuvieron tras respirar DTPA-^{99m}Tc y las de perfusión tras perfundir MAA-^{99m}Tc. El estudio de ventilación perfusión se realizó dos horas después de administrar 1mg·kg⁻¹ intraperitoneal de sildenafil.

Este experimento se analizó en 10 animales por condición experimental y se realizó un análisis estadístico con el test ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni. La significación (p<0.05) respecto a control en las gráficas se muestra con asterisco y comparada con los animales tratados con bleomicina se muestra con almohadilla.

Como se esperaba la Ventilación y la perfusión, así como el cociente diferían significativamente (p<0.05) en las ratas tratadas con bleomicina respecto al grupo control. En las ratas con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, sildenafil, aunque aumentó discretamente la perfusión (p<0,05), las relaciones de V/Q no se modificaron de forma significativa.

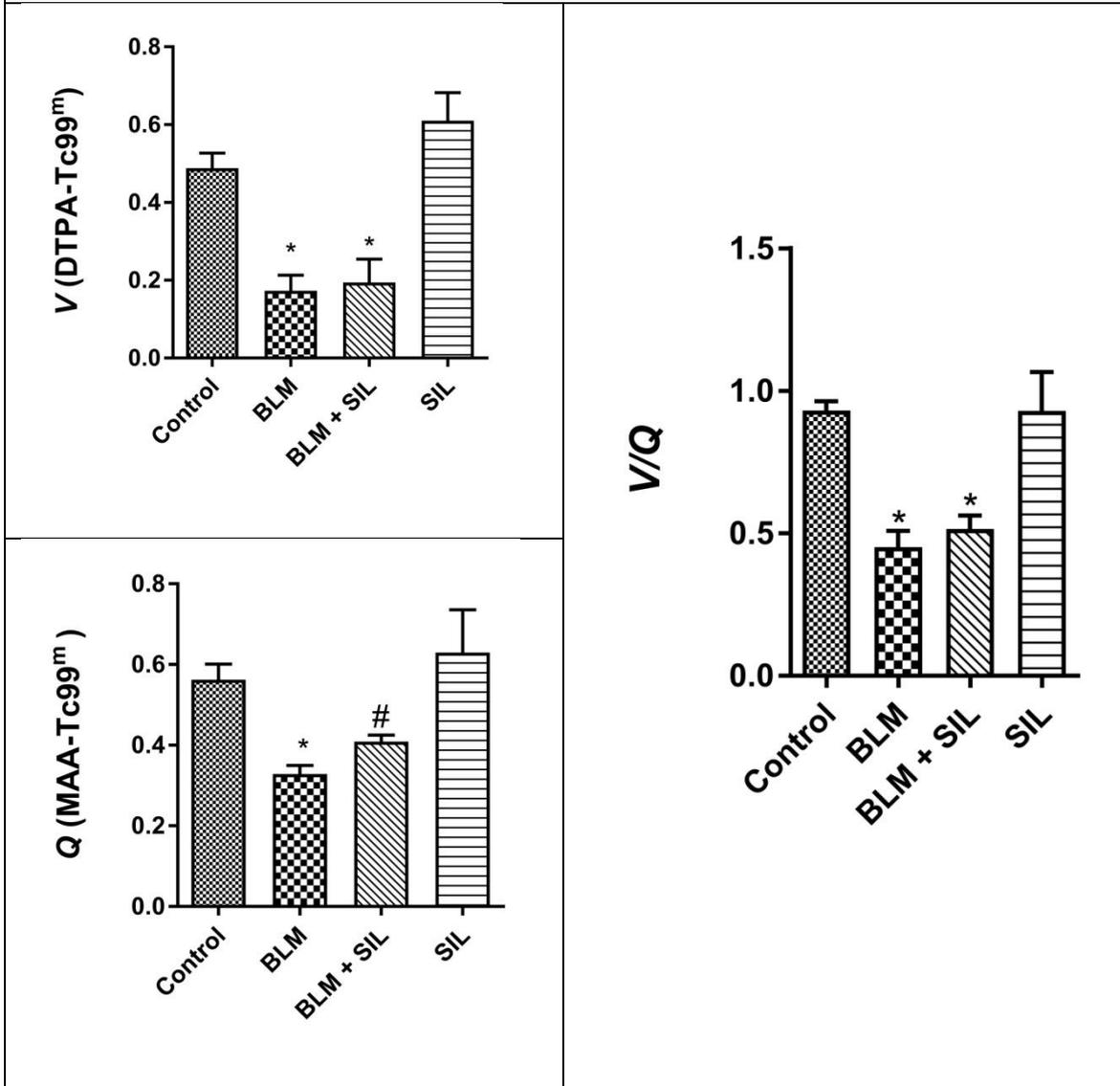
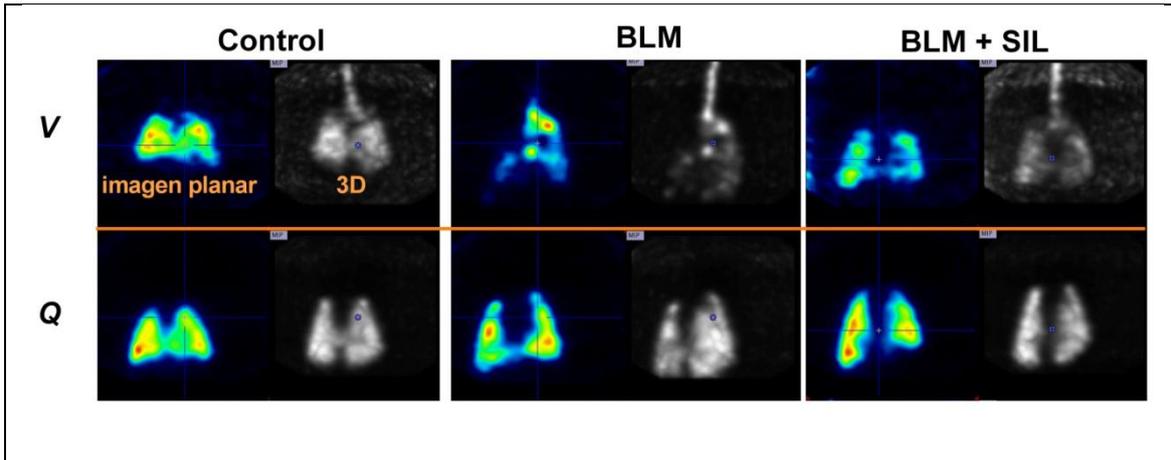


Fig. 40 Estudio ventilación perfusión en modelo animal con fibrosis inducida por bleomicina y posterior tratamiento con sildenafil por SPECT. Arriba: Imagen SPECT. Abajo: Graficas de V(ventilación), Q (perfusión) y V/Q (cociente V/Q). Estadístico empleado: test ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni. *: P<0.05 respecto a control; #: p<0.05 respecto a los animales tratados con bleomicina.

Como hemos visto en el resto del estudio, el sildenafil media sobre la respuesta anti-contráctil ante mediadores vasoactivos en FPI y FPI asociada a HTP, pero no se vió efecto relajante directo sobre las arterias precontraídas de dichos pacientes. Dicha hipótesis viene confirmada con este último estudio animal pues el sildenafil no induce vasodilatación directa sino que solo previene la vasoconstricción. Y por ello el sildenafil no recupera la alteración de la Ventilación-Perfusión.

Resultados respecto a hipótesis inicial

En esta tesis se ha investigado los efectos del sildenafil, inhibidor de la fosfodiesterasa 5 (PDE5), sobre la vasoconstricción y el remodelado de las arterias pulmonares de sujetos control y de pacientes con FPI (con o sin hipertensión pulmonar), así como pacientes con hipertensión pulmonar aislada. También se ha examinado el efecto del sildenafil sobre la ventilación/perfusión en un modelo animal de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

Los estudios funcionales relacionados con los anillos de arteria pulmonar han incluido un protocolo "relajante" en el que se agregaron dosis acumulativas de sildenafil a los anillos arteriales pulmonares precontraídos con serotonina (5-hidroxitriptamina (5-HT)) y un protocolo de "contracción" donde sildenafil estaba presente en el baño de órganos antes de que se añadieran concentraciones acumulativas de 5-HT. En el protocolo relajante, se ha visto que sildenafil induce relajación concentración dependiente, principalmente en los anillos vasculares de las muestras control y FPI y en menor grado en las muestras de FPI con HP y las de HP. Este efecto es sólo parcialmente dependiente del endotelio. En el protocolo contráctil, sin embargo, sildenafil disminuye la respuesta contráctil de los anillos arteriales de pacientes con

FPI y de forma más acusada en los precedentes de pacientes con FPI + HP y los de HP, sin presentar efecto en las muestras control.

Una vez vistas las diferencias funcionales en la respuesta vasomotora de los anillos de arteria pulmonar, se analizaron los marcadores de proliferación y remodelado celular con transición a mesenquima/miofibroblasto. Se ha visto que estas vías se activan tanto en FPI como en FPI + HP, pero con una expresión más pronunciada en FPI+HP, indicando una activación gradual de los procesos de transformación endotelio-mesenquimal y fibrosis en FPI que eventualmente podría condicionar el desarrollo de HP.

Se ha demostrado una disminución de la expresión de marcadores endoteliales (óxido nítrico sintetasa endotelial, cadherina endotelial vascular y receptor del factor de crecimiento de endotelio vascular) en arterias pulmonares de FPI y FPI+HP, sugiriendo disfunción endotelial. A destacar, la expresión aumentada de la fosfodiesterasa5 en arterias pulmonares de FPI y FPI+HP, lo que se correlaciona con el resultado funcional detectado en el baño de órganos. Además se ha examinado el papel de sildenafil y la estimulación con TGF- β en anillos vasculares cultivados. Encontrando que TGF- β disminuye la expresión de los marcadores endoteliales mientras incrementa la expresión de la fosfodiesterasa5 y los marcadores mesenquimales, efectos reversibles con el tratamiento con sildenafil. Se han obtenido efectos similares del TGF- β y sildenafil en cultivos de células endoteliales y células musculares lisas de las arterias pulmonares obtenidas de pacientes con FPI, donde sildenafil inhibe la transición de endotelio a mesenquima y de célula muscular lisa a miofibroblasto inducida por la TGF- β , aparentemente vía inhibición de la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3.

En la investigación de un fármaco vasodilatador pulmonar, debíamos tener en cuenta la posibilidad de que alterara el cociente V/Q y por tanto empeorara la hipoxemia. Por ello se estudió el efecto del sildenafil en un modelo de ratas con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, pudiendo demostrar que este fármaco no empeora la relación ventilación/perfusión. Estos resultados van en la línea de los obtenidos en el estudio Step en pacientes con FPI avanzada en los que sildenafil no empeoró su hipoxemia(10, 112)

En esta tesis hemos visto las propiedades anticontráctiles de sildenafil en anillos vasculares pulmonares de pacientes con FPI y FPI+HP, así como sobre los marcadores

de proliferación y transición celular a mesenquima. Reforzando los hallazgos al haber detectado un incremento de la expresión de PDE5 en las arterias pulmonares de los pacientes con FPI y FPI+HTP que hasta ahora no se había descrito. Este hallazgo proporciona sentido al empleo de fármacos que tengan como diana la PDE5 en el tratamiento de pacientes con FPI complicada con HP.

Respondiendo al planteamiento inicial, este estudio nos ha proporcionado datos que sugieren la conveniencia de seguir analizando los mecanismos del remodelado vascular en pacientes con FPI y buscar fármacos, que como sildenafil, frenen este proceso y retrasen el desarrollo de HP.

Discusión

Actualmente no existe una terapia específica para la HP asociada a las enfermedades pulmonares como la FPI. De acuerdo con las guías recientes, los vasodilatadores aprobados para la hipertensión arterial pulmonar (HAP) no se recomiendan para pacientes con HP secundaria a enfermedad intersticial pulmonar (17, 131). Sin embargo, se ha descrito que un pequeño grupo de pacientes con enfermedad intersticial pulmonar e HP asociada, habitualmente grave (“desproporcionada”), podría beneficiarse de la terapia específica para pacientes con HAP(17).

Hasta ahora no se conoce bien la patogenia de la HP asociada a enfermedad intersticial y dado que con frecuencia precede al desarrollo de insuficiencia respiratoria, hace suponer que intervienen otros factores asociados directamente a cambios en la expresión de los reguladores del tono arterial pulmonar y el remodelado vascular.

En esta tesis se han podido demostrar los efectos anticontracturante y antiremodelado de sildenafil en arterias pulmonares de pacientes con FPI, Este hecho, unido a los resultados de estudios previos(10), permiten abrir una nueva vía de tratamiento de la HP en pacientes con FPI.

En los estudios clínicos actuales se señala que el sildenafil (50 mg por vía oral) causa vasodilatación pulmonar aguda en pacientes con FPI severa e HP (presión arterial pulmonar media, 42 mmHg), principalmente en áreas bien ventiladas con NO disponible, sin afectar la vasoconstricción hipóxica o la saturación de oxígeno, y por lo tanto sin alterar el cociente V' / Q' (112). El ensayo a largo plazo STEP-IPF demostró que el sildenafil mejoró la distancia recorrida en el test de 6 minutos marcha, en un subgrupo de pacientes con FPI severa y disfunción sistólica ventricular derecha medida por ecocardiografía (11). Estos resultados positivos corroboran los hallazgos previos en pequeñas cohortes de pacientes con HP asociada a la FPI grave (14, 132), pero no en pacientes con FPI e Hipertensión pulmonar leve a moderada (15).

En este estudio, observamos un efecto vasodilatador directo del sildenafil en las arterias pulmonares previamente pre-contraídas con 5-HT de pacientes sanos control y de pacientes con FPI, siendo este efecto parcialmente dependiente del endotelio (40% con endotelio versus 20% de relajación máxima sin endotelio). Un efecto vasodilatador de sildenafil, muy bien descrito, implica la producción de NO desde la eNOS de las células endoteliales. La liberación de NO activa la guanilato ciclasa (GC) en las células del músculo liso de la arteria pulmonar para producir Guanosina monofosfato (cGMP) y

la proteína quinasa G (PKG), que inducen la vasodilatación(133). Sin embargo, se ha descrito un efecto vasodilatador del sildenafil independiente del endotelio tanto en vasos de seres humanos(134), como de cerdos(135), como en arterias pulmonares de rata(136). Además, el sildenafil redujo significativamente la vasoconstricción pulmonar hipóxica aguda en la perfusión de pulmones de ratones deficientes en eNOS, lo que indica que los efectos del sildenafil ocurren incluso cuando la eNOS está alterada(137).

En la tesis se observó un pequeño grado de vasodilatación en las arterias pulmonares precontraídas 5-HT de pacientes con FPI+HP e HP, independiente de la presencia de endotelio, lo que sugiere que el eje endotelial eNOS-NO está alterado en pacientes con FPI+HP, como se describe anteriormente(138). La síntesis de cGMP también se produce en respuesta al péptido natriurético después de la activación de partículas guanilato ciclasa en las células del músculo liso vascular pulmonar(139). El péptido natriurético sérico se eleva como mecanismo de compensación en los pacientes con FP asociada con HP(140), lo que explica parcialmente el aumento de la vasodilatación pulmonar después de una única administración oral de sildenafil en pacientes con FPI+HP(112).

En el estudio ex vivo de arterias pulmonares de pacientes con hipertensión pulmonar y fibrosis se detectó un bajo grado de vasodilatación que podría atribuirse a la falta del péptido natriurético circulante y a la ausencia de tejido pulmonar rico en NO de las áreas bien ventiladas donde el sildenafil induce un incremento selectivo de la vasodilatación(112). Esta es la razón fundamental para el sinergismo recientemente observado entre el sistema del péptido natriurético y el sildenafil en un modelo animal de fibrosis pulmonar asociada a HP(141). Aunque no exploramos el papel de los péptidos natriuréticos en este estudio, podemos especular que la pequeña producción local de arteria pulmonar del péptido natriurético podría ser parcialmente responsable de las acciones del sildenafil que hemos observado. Propiedades vasodilatadoras similares se vieron en el modelo animal de fibrosis inducida por bleomicina asociado con HP, después de la administración aguda de sildenafil cuando la relación V/Q permanecía inalterada

La imagen SPECT de V/Q es una técnica de medicina nuclear bien establecida que proporciona información espacial de intercambio de gases respiratorios, ventilación de

las unidades alveolares y perfusión de los lechos capilares pulmonares. Las enfermedades crónicas que cursan con hipoxia pulmonar tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o FPI tienen una ventilación y perfusión alteradas de las unidades pulmonares y pueden ser medidas por el análisis de la señal DTPA-^{99m}Tc inhalado y del MAA-^{99m}Tc perfundido. Sin embargo, el uso de esta técnica en estudios preclínicos es limitado. Que conozcamos, hay sólo un estudio que detectó una alteración de la ratio V/Q por SPECT en un modelo animal con ratas afectas por enfermedad pulmonar obstructiva por tabaco detectada de 8 a 10 semanas tras la exposición continua al humo del tabaco(129). En nuestra investigación observamos una alteración de la ratio V/Q medida por SPECT en los pulmones con fibrosis tras 21 días de la inducción con bleomicina. El sildenafil incrementó débilmente la señal de perfusión, pero sin afectar a la ratio V/Q, confirmando los resultados previos observados en humanos (112) y la utilidad de esta técnica para el estudio de vasodilatadores en enfermedades por hipoxia como la FPI. Sin embargo, la acción selectiva del sildenafil en las áreas bien ventiladas debería demostrarse con administraciones repetidas de sildenafil en un protocolo terapéutico y no en un experimento con una única administración, siendo esta una limitación de nuestro estudio que se debería revisar con futuros experimentos.

En el protocolo anti-contráctil se observaron varios resultados. La administración crónica de sildenafil es un escenario óptimo en pacientes con Hipertensión Pulmonar asociada a Fibrosis pulmonar idiopática. En ese sentido la inhibición mantenida de la PDE5 previene de los efectos contráctiles de la elevación de marcadores vasoactivos, como la ET-1 y la 5-HT, entre otros. En nuestro estudio, la preincubación con 10 μ M de sildenafil afectó mínimamente las curvas de respuesta a diferentes concentraciones de 5-HT (10% de inhibición) en los anillos de arteria pulmonar sanos. De forma similar a como se había visto previamente en el artículo de Ried et al.(142) usando ET-1 como mediador vasoactivo. En contraste con los resultados obtenidos en las muestras de pulmones sanos, concentraciones de sildenafil 10 μ M implicaron prácticamente la inhibición en un 50% de la contracción inducida por 5-HT en las muestras de pacientes con FPI; siendo significativamente mayor el efecto del sildenafil en arterias pulmonares de pacientes con FPI + HP y los de HP. Las diferencias encontradas en el estudio anticontráctil del sildenafil pueden ser parcialmente explicadas por los diferentes niveles de expresión de PDE5 en estos pacientes: PDE5 estaba sobre-

expresada en las arterias pulmonares de pacientes con FPI+HP (en menor grado en los pacientes con sólo FPI) comparados con los anillos vasculares de los sujetos sanos. Sin embargo no podemos descartar que existan otros mecanismos implicados que lo expliquen.

Seleccionamos 5-HT como agente vasoactivo porque se han descrito tanto niveles elevados de 5-HT como activación de su señal en pacientes con HP(24). Más recientemente, la sobreexpresión de receptores 5-HT se describió en pacientes con FPI comparado con los controles, particularmente el receptor 5-HT 2A en la capa de musculo liso de las arterias(143). En nuestro estudio, hemos detectado el aumento de la expresión del receptor 5-HT 2A en los anillos de arteria pulmonar de pacientes con FPI y la regulación positiva del receptor 5-HT 2A en los pacientes con FPI + HP. El receptor 5-HT 2A inicia la cascada de señalización, incluyendo la activación de la RhoA/RhoA Kinasa (ROCK) y consecuentemente la contracción de los vasos pulmonares. A este respecto, la vía GC/cGMP/PKG de las células musculares lisas puede reducir la contractilidad vascular pulmonar mediante el descenso de la sensibilidad al Ca^{2+} y fosforilando e inactivando la proteína RhoA(144). De este modo, la sobreexpresión de la PDE5 al disminuir la GMPc y la PKG puede aumentar la actividad de la vía RhoA / ROCK, la cual incrementa la sensibilidad vascular pulmonar a la 5-HT, como se sugirió previamente en células musculares lisas de los vasos pulmonares(145). Así, la sobreexpresión de la PDE5 en arterias pulmonares de pacientes con FPI y FPI+HP, debe explicar parcialmente porqué el sildenafil reduce selectivamente el efecto contráctil de la 5-HT en las arterias pulmonares de estos pacientes.

Recientemente se describió un perfil molecular similar en arterias pulmonares de pacientes con FPI+HP mediante la amplificación del perfil de expresión genómico(146). Dicho perfil reveló una reducción en el diámetro de la luz acompañado por el engrosamiento de las capas media e íntima mediante el incremento de los componentes de la matriz extracelular y α SMA en la íntima y la disminución del Factor von Willebrand localizado exclusivamente en el endotelio de los vasos pulmonares(146). En nuestro estudio detectamos además la regulación a la baja de los marcadores endoteliales típicos de la arteria pulmonar de pacientes con FPI y FPI+HTP, como VE-cadherin, VEGFR-1 y FVIII mientras eNOS disminuyó solamente en arterias pulmonares de los pacientes con FPI + HTP, lo cual explicaría el efecto relajante

dependiente de endotelio producido por el sildenafil en las arterias pulmonares de pacientes con FPI (figura 25B). En un estudio previo realizado como en esta tesis en el laboratorio de farmacología de la Universidad de Medicina de Valencia se describió en las células endoteliales de arterias pulmonares de pacientes con FPI+HP la pérdida del fenotipo endotelial para adquirir un fenotipo mesenquimal(125). Datos recientes obtenidos in vivo en pacientes con fibrosis pulmonar demostraron que las células endoteliales capilares parecen ser una especie de fibroblastos mediante la transición de endotelio a mesénquima(95). Por lo tanto, un aumento en la biodisponibilidad del NO inducido por sildenafil en las células endoteliales de la arteria pulmonar podría mejorar su transformación y remodelado. Anteriormente se observó que la adición de sepiapterin in vitro aumentó los niveles de tetrahydrobiopterina (BH4) acoplándose con la eNOS para producir NO, y de ese modo inhibía la transición de endotelio a mesenquima inducida por TGF- β 1(125). Otros estudios han demostrado que la inhibición crónica de la eNOS indujo la transición endotelial a mesenquima en las células endoteliales del riñón(147).

En el estudio actual, TGF- β 1 incrementa la expresión de marcadores de mesenquima y PDE5, y redujo la expresión de marcadores endoteliales en los anillos de arterias pulmonares control. El cambio molecular en pacientes con FPI ha sido más marcado indicando sensibilización al remodelado vascular. En ambos casos, sildenafil atenuó el incremento de la expresión de marcadores de mesénquima y la reducción de los marcadores de endotelio. Aislamos células musculares lisas y células endoteliales de las arterias pulmonares de pacientes con FPI para analizar los posibles mecanismos. TGF- β 1 disminuyó la expresión de marcadores endoteliales y aumentó los de mesénquima en las células endoteliales, mientras incrementó Col I y vimentina en las células musculares lisas, representando la transición de miofibroblastos. Sildenafil inhibió tanto en células endoteliales como musculares lisas la transición a mesénquima inhibiendo la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3, que son las principales señales de la cascada generada por TGF- β 1. Aunque aparentemente no tenga relación, estudios previos mostraron que el NO inhibía la transactivación de genes regulados por TGF- β 1 / SMAD de una manera dependiente de cGMP / PKG dirigiendo la degradación proteasomal de SMAD3 activado(148) o secuestrando SMAD3(149). La fosforilación de ERK1/2 puede también ser inhibida por PKG, lo que explica el efecto inhibitorio del sildenafil observado(145). Estos hallazgos son particularmente relevantes, ya que

observamos hiperfosforilación de ERK1/2 y SMAD3 en arterias pulmonares de pacientes con FPI+HP.

Esta tesis ha proporcionado la primera evidencia de efectos relajantes directos / anti-contráctiles y anti-remodelación del sildenafil en las arterias pulmonares de donantes sanos y pacientes con FPI o FPI+HP. Nuestros hallazgos pueden contribuir a comprender los efectos beneficiosos del sildenafil en pacientes con FPI; particularmente en aquellos con HP grave. El siguiente paso sería realizar ensayos clínicos controlados y aleatorizados de sildenafil en estos pacientes.

Conclusiones

- 1- Sildenafil tiene un efecto relajante directo sobre arterias pulmonares de sujetos control y de pacientes con FPI, precontractadas con 5-HT. Este efecto relajante fue menor en paciente con FPI e HP y pacientes con HP.
- 2- Aproximadamente el 50% del efecto relajante de sildenafil es endotelio dependiente.
- 3- Sildenafil inhibe la contracción inducida por 5-HT en mayor medida en pacientes con FPI + HP y pacientes con HP que en sujetos control o pacientes con FPI.
- 4- En las arterias pulmonares de pacientes con FPI y FPI + HP está aumentada la expresión de marcadores mesequimales. A destacar, la expresión aumentada de la fosfodiesterasa5.
- 5- En anillos de arterias pulmonares de pacientes con FPI, TGF β 1 induce sobreexpresión de marcadores mesenquimales y disminuye la expresión de marcadores endoteliales en relación a sujetos control. Efecto reversible con sildenafil.
- 6- Sildenafil inhibe el proceso de transformación endotelio-mesenquimal inducido por TGF β 1 en células musculares y endoteliales de arteria pulmonar humana, vía inhibición de la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3
- 7- Sildenafil incrementó discretamente la perfusión pulmonar de los animales con fibrosis inducida por bleomicina sin afectar a la relación ventilación/perfusión.

Índice de abreviaturas

ACh	Acetilcolina
ADNc	ADN complementario
ATI	Células alveolares tipo I
ATII	Células alveolares tipo II
ATS	American Thoracic Society
α -SMA	α -actina de músculo liso
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor type II
BH4	Tetrahidrobiopterina
Ct	Ciclo humbral
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
Col I	Colágeno tipo I
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDRF	Factor relajante endotelial
EMEA	Agencia Europea del medicamento
EMT	Transición epitelial a mesénquima
EndoMT	Transición endotelial a mesénquima
EPI	Enfermedad pulmonar intersticial
ERS	European Respiratory Society

ERK ½	Señal extracelular regulada por kinasas 1/2
ETT	Ecocardiografía trasntorácica
ET-1	Endotelina 1
FAD	Flavin adenin dinucleótido
FCS	Suero fetal de ternera
FPI	Fibrosis Pulmonar Idiopática
GAPDH	Gliceraldehido fosfato 6-deshidrogenasa
GMPC	Guanosin monofosfato cíclico
HAP	Hipertensión arterial pulmonar
HP	Hipertensión Pulmonar
HPAEC	Células endoteliales de arteria pulmonar humana
HPASMC	Células musculares lisas de arteria pulmonar humana
HPH	Hipertensión Pulmonar Heredable
HPP	Hipertensión Pulmonar Primaria
IL	Interleukina
ILD	Patología intersticial pulmonar
MEC	Matriz extracelular
mPAP	Presión arterial pulmonar media
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Oxido nítrico
NOe	Oxido nítrico origen endotelial
NOS	Oxido nítrico sintasa
NOSe	Óxido nítrico sintasa endotelial

OMS	Organización Mundial de la Salud
PAP	Presión arterial pulmonar
PAI-1	Inhibidor del plasminógeno 1
PDE5	Fosfodiesterasa 5
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
Q	Perfusión
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RT	Retrotranscripción inversa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
siRNA	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
SMAD3	Madres contra decapentaplégico homólogo
SMC	Células musculares lisas
SPAP	Presión sistólica de la arteria pulmonar estimada
TGF- β 1	Factor de crecimiento tumoral beta1
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteasas
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alpha
TXA2	Tromboxano A2
V	Ventilación
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
V/Q	Cociente Ventilación Perfusión

Bibliografía

1. King TEJ, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, et al. A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(22):2083-92.
2. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, et al. Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(22):2071-82.
3. Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, du Bois RM, Fagan EA, et al. Pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis: analysis of pooled data from three multinational phase 3 trials. *European Respiratory Journal*. 2016;47(1):243-53.
4. Bonella F, Wijsenbeek M, Molina-Molina M, Duck A, Mele R, Geissler K, et al. European IPF Patient Charter: unmet needs and a call to action for healthcare policymakers. *European Respiratory Journal*. 2016;47(2):597-606.
5. Wuyts WA, Antoniou KM, Borensztajn K, Costabel U, Cottin V, Crestani B, et al. Combination therapy: the future of management for idiopathic pulmonary fibrosis? *The Lancet Respiratory Medicine*. 2(11):933-42.
6. Nathan SD, Noble PW, Tudor RM. Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Pulmonary Hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007;175(9):875-80.
7. Nathan SD, Shlobin OA, Ahmad S, Koch J, Barnett SD, Ad N, et al. Serial development of pulmonary hypertension in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration*. 2008;76(3):288-94.
8. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research N, Zisman DA, Schwarz M, Anstrom KJ, Collard HR, Flaherty KR, et al. A controlled trial of sildenafil in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2010;363(7):620-8.
9. Hoepfer MM, Halank M, Wilkens H, Günther A, Weimann G, Gebert I, et al. Riociguat for interstitial lung disease and pulmonary hypertension: a pilot trial. *European Respiratory Journal*. 2013;41(4):853-60.
10. Zisman DA, Schwarz M, Anstrom KJ, Collard HR, Flaherty KR, Hunninghake GW. A controlled trial of sildenafil in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2010;363(7):620-8.
11. Han MK, Bach DS, Hagan PG, Yow E, Flaherty KR, Toews GB, et al. Sildenafil preserves exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and right-sided ventricular dysfunction. *Chest*. 2013;143(6):1699-708.
12. Raghu G, Behr J, Brown KK, Egan JJ, Kawut SM, Flaherty KR, et al. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with ambrisentan: a parallel, randomized trial. *Annals of internal medicine*. 2013;158(9):641-9.
13. Talmadge E, King J, Brown KK, Raghu G, Bois RMd, Lynch DA, Martinez F, et al. BUILD-3: A Randomized, Controlled Trial of Bosentan in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2011;184(1):92-9.
14. Collard HR, Anstrom KJ, Schwarz MI, Zisman DA. Sildenafil improves walk distance in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2007;131(3):897-9.
15. Jackson RM, Glassberg MK, Ramos CF, Bejarano PA, Butrous G, Gomez-Marin O. Sildenafil therapy and exercise tolerance in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung*. 2010;188(2):115-23.
16. Rochweg B, Neupane B, Zhang Y, Garcia CC, Raghu G, Richeldi L, et al. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a network meta-analysis. *BMC Medicine*. 2016;14(1):18.
17. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of

- Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *The European respiratory journal*. 2015;46(4):903-75.
18. Xaubet A, Ancochea J, Blanquer R, Montero C, Morell F, Rodriguez Becerra E, et al. [Diagnosis and treatment of diffuse interstitial lung diseases]. *Archivos de bronconeumologia*. 2003;39(12):580-600.
 19. Hooper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D42-50.
 20. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *The European respiratory journal*. 2009;34(4):888-94.
 21. Kuhr FK, Smith KA, Song MY, Levitan I, Yuan JX. New mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of Ca(2)(+) signaling. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;302(8):H1546-62.
 22. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25 Suppl):D34-41.
 23. Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2004;351(16):1655-65.
 24. Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, et al. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(1 Suppl):S20-31.
 25. Nadrous HF, Pellikka PA, Krowka MJ, Swanson KL, Chaowalit N, Decker PA, et al. Pulmonary hypertension in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2005;128(4):2393-9.
 26. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(12):13S-24S.
 27. Majka SM, Skokan M, Wheeler L, Harral J, Gladson S, Burnham E, et al. Evidence for cell fusion is absent in vascular lesions associated with pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2008;295(6):L1028-L139.
 28. Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, et al. Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(12):25S-32S.
 29. Yi ES, Kim H, Ahn H, Strother J, Morris T, Masliah E, et al. Distribution of obstructive intimal lesions and their cellular phenotypes in chronic pulmonary hypertension - A morphometric and immunohistochemical study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000;162(4):1577-86.
 30. Masri FA, Xu W, Comhair SAA, Asosingh K, Koo M, Vasanthi A, et al. Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2007;293(3):L548-L54.
 31. Tuder RM, Stacher E, Robinson J, Kumar R, Graham BB. Pathology of Pulmonary Hypertension. *Clin Chest Med*. 2013;34(4):639-+.
 32. Yeager ME, Frid MG, Stenmark KR. Progenitor cells in pulmonary vascular remodeling. *Pulmonary circulation*. 2011;1(1):3-16.
 33. Bobik A. Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(8):1712-20.
 34. Botney MD, Bahadori L, Gold LI. Vascular remodeling in primary pulmonary hypertension. Potential role for transforming growth factor-beta. *The American journal of pathology*. 1994;144(2):286-95.
 35. Bouros D, Antoniou KM. Current and future therapeutic approaches in idiopathic pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal*. 2005;26(4):693-702.

36. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1993;328(24):1732-9.
37. Gagermeier J, Dauber J, Yousem S, Gibson K, Kaminski N. Abnormal vascular phenotypes in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and secondary pulmonary hypertension. *Chest*. 2005;128(6 Suppl):601S.
38. Bargagli E, Olivieri C, Bennett D, Prasse A, Muller-Quernheim J, Rottoli P. Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: a review. *Respiratory medicine*. 2009;103(9):1245-56.
39. Lamb NJ, Gutteridge JM, Baker C, Evans TW, Quinlan GJ. Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration, and chlorination. *Critical care medicine*. 1999;27(9):1738-44.
40. Lettieri CJ, Nathan SD, Barnett SD, Ahmad S, Shorr AF. Prevalence and outcomes of pulmonary arterial hypertension in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2006;129(3):746-52.
41. Shorr AF, Wainright JL, Cors CS, Lettieri CJ, Nathan SD. Pulmonary hypertension in patients with pulmonary fibrosis awaiting lung transplant. *The European respiratory journal*. 2007;30(4):715-21.
42. Hamada K, Nagai S, Tanaka S, Handa T, Shigematsu M, Nagao T, et al. Significance of pulmonary arterial pressure and diffusion capacity of the lung as prognosticator in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2007;131(3):650-6.
43. Weitzenblum E, Ehrhart M, Rasaholinjanahary J, Hirth C. Pulmonary hemodynamics in idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial pulmonary diseases. *Respiration*. 1983;44(2):118-27.
44. Heath D, Gillund TD, Kay JM, Hawkins CF. Pulmonary vascular disease in honeycomb lung. *The Journal of pathology and bacteriology*. 1968;95(2):423-30.
45. Olman MA, Mackman N, Gladson CL, Moser KM, Loskutoff DJ. Changes in procoagulant and fibrinolytic gene expression during bleomycin-induced lung injury in the mouse. *J Clin Invest*. 1995;96(3):1621-30.
46. Zisman DA, Kawut SM. Idiopathic pulmonary fibrosis: a shot through the heart? *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(12):1192-3.
47. Milara J, Juan G, Ortiz JL, Guijarro R, Losada M, Serrano A, et al. Cigarette smoke-induced pulmonary endothelial dysfunction is partially suppressed by sildenafil. *Eur J Pharm Sci*. 39(5):363-72.
48. Yildirim A, Ersoy Y, Ercan F, Atukeren P, Gumustas K, Uslu U, et al. Phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate in a rat model of bleomycin-induced lung fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther*. 23(3):215-21.
49. Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ, Ignarro L. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *Journal of cyclic nucleotide research*. 1979;5(3):211-24.
50. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(24):9265-9.
51. Rubin RP. A Brief History of Great Discoveries in Pharmacology: In Celebration of the Centennial Anniversary of the Founding of the American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics. *Pharmacological Reviews*. 2007;59(4):289-359.
52. Richeldi L, Davies HR, Ferrara G, Franco F. Corticosteroids for idiopathic pulmonary fibrosis. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2003(3):CD002880.
53. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for

- diagnosis and management. American journal of respiratory and critical care medicine. 2011;183(6):788-824.
54. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). Am J Respir Crit Care Med. 2000;161(2 Pt 1):646-64.
 55. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). American journal of respiratory and critical care medicine. 2000;161(2 Pt 1):646-64.
 56. American Thoracic S, European Respiratory S. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. Am J Respir Crit Care Med. 2002;165(2):277-304.
 57. Demedts M, Wells AU, Anto JM, Costabel U, Hubbard R, Cullinan P, et al. Interstitial lung diseases: an epidemiological overview. The European respiratory journal Supplement. 2001;32:2s-16s.
 58. Meltzer EB, Noble PW. Idiopathic pulmonary fibrosis. Orphanet journal of rare diseases. 2008;3:8.
 59. Tzilas V, Koti A, Papandrinopoulou D, Tsoukalas G. Prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis. The American journal of the medical sciences. 2009;338(6):481-5.
 60. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. Annals of internal medicine. 2001;134(2):136-51.
 61. Tatler AL, Jenkins G. TGF-beta activation and lung fibrosis. Proceedings of the American Thoracic Society. 2012;9(3):130-6.
 62. Fernandez IE, Eickelberg O. The impact of TGF-beta on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. Proceedings of the American Thoracic Society. 2012;9(3):111-6.
 63. Xaubet A, Marin-Arguedas A, Lario S, Ancochea J, Morell F, Ruiz-Manzano J, et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2003;168(4):431-5.
 64. Hagimoto N, Kuwano K, Inoshima I, Yoshimi M, Nakamura N, Fujita M, et al. TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2002;168(12):6470-8.
 65. Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006;103(35):13180-5.
 66. Yu H, Konigshoff M, Jayachandran A, Handley D, Seeger W, Kaminski N, et al. Transgelin is a direct target of TGF-beta/Smad3-dependent epithelial cell migration in lung fibrosis. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2008;22(6):1778-89.
 67. Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S, Lympany PA, du Bois RM, Jeffery PK, et al. Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. The American journal of pathology. 1997;150(3):981-91.
 68. Coker RK, Laurent GJ, Jeffery PK, du Bois RM, Black CM, McAnulty RJ. Localisation of transforming growth factor beta1 and beta3 mRNA transcripts in normal and fibrotic human lung. Thorax. 2001;56(7):549-56.
 69. Sime PJ, Xing Z, Graham FL, Csaky KG, Gauldie J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. J Clin Invest. 1997;100(4):768-76.

70. Liu JY, Sime PJ, Wu T, Warshamana GS, Pociask D, Tsai SY, et al. Transforming growth factor-beta(1) overexpression in tumor necrosis factor-alpha receptor knockout mice induces fibroproliferative lung disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2001;25(1):3-7.
71. Bonniaud P, Margetts PJ, Ask K, Flanders K, Gauldie J, Kolb M. TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005;175(8):5390-5.
72. Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M, Schroeder JA, Kapoun AM, Damm D, et al. Progressive transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(8):889-98.
73. Sullivan DE, Ferris M, Pociask D, Brody AR. Tumor Necrosis Factor- α Induces Transforming Growth Factor- β 1 Expression in Lung Fibroblasts Through the Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2005;32(4):342-9.
74. Sullivan DE, Ferris M, Nguyen H, Abboud E, Brody AR. TNF-alpha induces TGF-beta1 expression in lung fibroblasts at the transcriptional level via AP-1 activation. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(8b):1866-76.
75. Pociask DA, Sime PJ, Brody AR. Asbestos-derived reactive oxygen species activate TGF-beta1. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2004;84(8):1013-23.
76. Dancer RC, Wood AM, Thickett DR. Metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal*. 2011;38(6):1461-7.
77. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*. 1998;93(7):1159-70.
78. Jenkins G. The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40(6-7):1068-78.
79. Margadant C, Sonnenberg A. Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO reports*. 2010;11(2):97-105.
80. Wilson MS, Wynn TA. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal immunology*. 2009;2(2):103-21.
81. Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *The EMBO journal*. 1998;17(11):3091-100.
82. Senoo T, Hattori N, Tanimoto T, Furonaka M, Ishikawa N, Fujitaka K, et al. Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis. *Thorax*. 2010;65(4):334-40.
83. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(11):807-21.
84. Kinnula VL, Fattman CL, Tan RJ, Oury TD. Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(4):417-22.
85. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, et al. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nature medicine*. 2009;15(9):1077-81.
86. Li M, Krishnaveni MS, Li C, Zhou B, Xing Y, Banfalvi A, et al. Epithelium-specific deletion of TGF- β receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(1):277-87.
87. Eickelberg O, Laurent GJ. The quest for the initial lesion in idiopathic pulmonary fibrosis: gene expression differences in IPF fibroblasts. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;42(1):1-2.
88. Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest*. 2007;132(4):1311-21.

89. Sousa AM, Liu T, Guevara O, Stevens J, Fanburg BL, Gaestel M, et al. Smooth muscle alpha-actin expression and myofibroblast differentiation by TGFbeta are dependent upon MK2. *Journal of cellular biochemistry*. 2007;100(6):1581-92.
90. Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology*. 2005;166(5):1321-32.
91. Kim KK, Wei Y, Szekeres C, Kugler MC, Wolters PJ, Hill ML, et al. Epithelial cell $\alpha 3\beta 1$ integrin links β -catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(1):213-24.
92. Willis BC, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2007;293(3):L525-34.
93. Andersson-Sjoland A, de Alba CG, Nihlberg K, Becerril C, Ramirez R, Pardo A, et al. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40(10):2129-40.
94. Hong KM, Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Strieter RM. Differentiation of Human Circulating Fibrocytes as Mediated by Transforming Growth Factor- β and Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ . *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(31):22910-20.
95. Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, Matsuo M, Nakashima H, Kawabe T, et al. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;43(2):161-72.
96. Rock JR, Barkauskas CE, Cronic MJ, Xue Y, Harris JR, Liang J, et al. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(52):E1475-E83.
97. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, et al. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *The American journal of pathology*. 2010;176(1):85-97.
98. Yamada M, Kuwano K, Maeyama T, Hamada N, Yoshimi M, Nakanishi Y, et al. Dual-immunohistochemistry provides little evidence for epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis. *Histochemistry and Cell Biology*. 2008;129(4):453-62.
99. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-30.
100. Hall MC, Young DA, Waters JG, Rowan AD, Chantry A, Edwards DR, et al. The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(12):10304-13.
101. Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, et al. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(9):6292-7.
102. Rosas IO, Richards TJ, Konishi K, Zhang Y, Gibson K, Lokshin AE, et al. MMP1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS medicine*. 2008;5(4):e93.
103. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW, et al. Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *The Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(3):535-52.
104. Bonniaud P, Kolb M, Galt T, Robertson J, Robbins C, Stampfli M, et al. Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;173(3):2099-108.
105. Zhao J, Shi W, Wang YL, Chen H, Bringas P, Jr., Datto MB, et al. Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2002;282(3):L585-93.

106. Flanders KC, Sullivan CD, Fujii M, Sowers A, Anzano MA, Arabshahi A, et al. Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *The American journal of pathology*. 2002;160(3):1057-68.
107. Roberts AB. The ever-increasing complexity of TGF-beta signaling. *Cytokine & growth factor reviews*. 2002;13(1):3-5.
108. Eickelberg O. Endless healing: TGF-beta, SMADs, and fibrosis. *FEBS letters*. 2001;506(1):11-4.
109. Blanco I, Ribas J, Xaubet A, Gomez FP, Roca J, Rodriguez-Roisin R, et al. Effects of inhaled nitric oxide at rest and during exercise in idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of applied physiology*. 2011;110(3):638-45.
110. Yeager ME, Frid MG, Stenmark KR. Progenitor cells in pulmonary vascular remodeling. *Pulm Circ*. 2011;1(1):3-16.
111. Smith JS, Gorbett D, Mueller J, Perez R, Daniels CJ. Pulmonary hypertension and idiopathic pulmonary fibrosis: a dastardly duo. *The American journal of the medical sciences*. 2013;346(3):221-5.
112. Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Weissmann N, et al. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9337):895-900.
113. Hemnes AR, Zaiman A, Champion HC. PDE5A inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension through inhibition of ROS generation and RhoA/Rho kinase activation. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;294(1):L24-33.
114. Yildirim A, Ersoy Y, Ercan F, Atukeren P, Gumustas K, Uslu U, et al. Phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate in a rat model of bleomycin-induced lung fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther*. 2010;23(3):215-21.
115. Milara J, Juan G, Ortiz JL, Guijarro R, Losada M, Serrano A, et al. Cigarette smoke-induced pulmonary endothelial dysfunction is partially suppressed by sildenafil. *Eur J Pharm Sci*. 2010;39(5):363-72.
116. Wharton J, Strange JW, Moller GM, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, et al. Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(1):105-13.
117. Ortiz JL, Gorenne I, Cortijo J, Seller A, Labat C, Sarria B, et al. Leukotriene receptors on human pulmonary vascular endothelium. *British journal of pharmacology*. 1995;115(8):1382-6.
118. Cortijo J, Iranzo A, Milara X, Mata M, Cerda-Nicolas M, Ruiz-Sauri A, et al. Roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor, alleviates bleomycin-induced lung injury. *British journal of pharmacology*. 2009;156(3):534-44.
119. Ortiz JL, Milara J, Juan G, Montesinos JL, Mata M, Ramon M, et al. Direct effect of cigarette smoke on human pulmonary artery tension. *Pulm Pharmacol Ther*. 2010;23(3):222-8.
120. Morcillo EJ, Cortijo J. Species differences in the responses of pulmonary vascular preparations to 5-hydroxytryptamine. *Therapie*. 1999;54(1):93-7.
121. Higuera J, Sarria B, Ortiz JL, Cortijo J, Maruenda A, Barbera M, et al. Halothane inhibits endothelium-dependent relaxation elicited by acetylcholine in human isolated pulmonary arteries. *European journal of pharmacology*. 1997;326(2-3):175-81.
122. Cortijo J, Marti-Cabrera M, Bernabeu E, Domenech T, Bou J, Fernandez AG, et al. Characterization of 5-HT receptors on human pulmonary artery and vein: functional and binding studies. *British journal of pharmacology*. 1997;122(7):1455-63.
123. Guerard P, Goirand F, Fichet N, Bernard A, Rochette L, Morcillo EJ, et al. Arachidonic acid relaxes human pulmonary arteries through K⁺ channels and nitric oxide pathways. *European journal of pharmacology*. 2004;501(1):127-35.
124. Milara J, Mata M, Mauricio MD, Donet E, Morcillo EJ, Cortijo J. Sphingosine-1-phosphate increases human alveolar epithelial IL-8 secretion, proliferation and neutrophil chemotaxis. *European journal of pharmacology*. 2009;609(1-3):132-9.

125. Almudever P, Milara J, De Diego A, Serrano-Mollar A, Xaubet A, Perez-Vizcaino F, et al. Role of tetrahydrobiopterin in pulmonary vascular remodelling associated with pulmonary fibrosis. *Thorax*. 2013;68(10):938-48.
126. Ranchoux B, Antigny F, Rucker-Martin C, Hautefort A, Pechoux C, Bogaard HJ, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. *Circulation*. 2015;131(11):1006-18.
127. Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2007;293(1):L1-8.
128. Milara J, Ortiz JL, Juan G, Guijarro R, Almudever P, Martorell M, et al. Cigarette smoke exposure up-regulates endothelin receptor B in human pulmonary artery endothelial cells: molecular and functional consequences. *British journal of pharmacology*. 2010;161(7):1599-615.
129. Jobse BN, Rhem RG, Wang IQ, Counter WB, Stampfli MR, Labiris NR. Detection of lung dysfunction using ventilation and perfusion SPECT in a mouse model of chronic cigarette smoke exposure. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2013;54(4):616-23.
130. Sasser TA, Chapman SE, Li S, Hudson C, Orton SP, Diener JM, et al. Segmentation and measurement of fat volumes in murine obesity models using X-ray computed tomography. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012(62):e3680.
131. Seeger W, Adir Y, Barbera JA, Champion H, Coghlan JG, Cottin V, et al. Pulmonary hypertension in chronic lung diseases. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D109-16.
132. Zimmermann GS, von Wulffen W, Huppmann P, Meis T, Ihle F, Geiseler J, et al. Haemodynamic changes in pulmonary hypertension in patients with interstitial lung disease treated with PDE-5 inhibitors. *Respirology*. 2014;19(5):700-6.
133. Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2004;351(14):1425-36.
134. Medina P, Segarra G, Martinez-Leon JB, Vila JM, Aldasoro M, Otero E, et al. Relaxation induced by cGMP phosphodiesterase inhibitors sildenafil and zaprinast in human vessels. *The Annals of thoracic surgery*. 2000;70(4):1327-31.
135. Moreno L, Losada B, Cogolludo A, Lodi F, Lugnier C, Villamor E, et al. Postnatal maturation of phosphodiesterase 5 (PDE5) in piglet pulmonary arteries: activity, expression, effects of PDE5 inhibitors, and role of the nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Pediatric research*. 2004;56(4):563-70.
136. Pauvert O, Bonnet S, Rousseau E, Marthan R, Savineau JP. Sildenafil alters calcium signaling and vascular tone in pulmonary arteries from chronically hypoxic rats. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2004;287(3):L577-83.
137. Zhao L, Mason NA, Morrell NW, Kojonazarov B, Sadykov A, Maripov A, et al. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2001;104(4):424-8.
138. Saleh D, Barnes PJ, Giaid A. Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(5):1763-9.
139. Wiedemann R, Ghofrani HA, Weissmann N, Schermuly R, Quanz K, Grimminger F, et al. Atrial natriuretic peptide in severe primary and nonprimary pulmonary hypertension: response to iloprost inhalation. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(4):1130-6.
140. Song JW, Song JK, Kim DS. Echocardiography and brain natriuretic peptide as prognostic indicators in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory medicine*. 2009;103(2):180-6.
141. Baliga RS, Scotton CJ, Trinder SL, Chambers RC, MacAllister RJ, Hobbs AJ. Intrinsic defence capacity and therapeutic potential of natriuretic peptides in pulmonary hypertension associated with lung fibrosis. *British journal of pharmacology*. 2014;171(14):3463-75.

142. Ried M, Potzger T, Neu R, Sziklavari Z, Szoke T, Liebold A, et al. Combination of sildenafil and bosentan for pulmonary hypertension in a human ex vivo model. *Cardiovascular drugs and therapy*. 2014;28(1):45-51.
143. Konigshoff M, Dumitrescu R, Udalov S, Amarie OV, Reiter R, Grimminger F, et al. Increased expression of 5-hydroxytryptamine_{2A/B} receptors in idiopathic pulmonary fibrosis: a rationale for therapeutic intervention. *Thorax*. 2010;65(11):949-55.
144. Murthy KS. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annual review of physiology*. 2006;68:345-74.
145. Li M, Sun X, Li Z, Liu Y. Inhibition of cGMP phosphodiesterase 5 suppresses serotonin signalling in pulmonary artery smooth muscles cells. *Pharmacological research*. 2009;59(5):312-8.
146. Hoffmann J, Wilhelm J, Marsh LM, Ghanim B, Klepetko W, Kovacs G, et al. Distinct differences in gene expression patterns in pulmonary arteries of patients with chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis with pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(1):98-111.
147. O'Riordan E, Mendeleev N, Patschan S, Patschan D, Eskander J, Cohen-Gould L, et al. Chronic NOS inhibition actuates endothelial-mesenchymal transformation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007;292(1):H285-94.
148. Saura M, Zaragoza C, Herranz B, Griera M, Diez-Marques L, Rodriguez-Puyol D, et al. Nitric oxide regulates transforming growth factor-beta signaling in endothelial cells. *Circulation research*. 2005;97(11):1115-23.
149. Gong K, Xing D, Li P, Hilgers RH, Hage FG, Oparil S, et al. cGMP inhibits TGF-beta signaling by sequestering Smad3 with cytosolic beta2-tubulin in pulmonary artery smooth muscle cells. *Molecular endocrinology*. 2011;25(10):1794-803.