

VNIVERSITAT D VALÈNCIA

Departament de Farmacologia  
Doctorat en Biomedicina i Farmàcia



**ESTUDIO DE LAS MUCINAS  
ANCLADAS A MEMBRANA  
COMO DIANA FARMACOLÓGICA  
EN LA FIBROSIS PULMONAR**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**MARÍA JOSÉ SAFONT AGUILERA**

Dirigida por:

**DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO  
DR. D. JAVIER MILARA PAYÁ  
DR. D. CARLOS CAMPS HERRERO**

JUNIO DE 2020

**DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA  
DOCTORAT EN BIOMEDICINA I FARMÀCIA**



**ESTUDIO DE LAS MUCINAS ANCLADAS A  
MEMBRANA COMO DIANA  
FARMACOLÓGICA EN LA FIBROSIS  
PULMONAR**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

MARÍA JOSÉ SAFONT AGUILERA

Dirigida por:

DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO  
DR. D. JAVIER MILARA PAYÁ  
DR. D. CARLOS CAMPS HERRERO

**JUNIO DE 2020**



CONSORCIO  
HOSPITAL GENERAL  
UNIVERSITARIO  
DE VALENCIA

**DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO**  
Catedrático Numerario de Universidad  
Departamento de Farmacología  
Universidad de Valencia

**Certifica:**

Que la Tesis Doctoral presentada por Doña María José Safont Aguilera, con el título:  
**“ESTUDIO DE LAS MUCINAS ANCLADAS A MEMBRANA COMO DIANA FARMACOLÓGICA EN LA FIBROSIS PULMONAR”**

ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En Valencia, 30 de Junio de 2020.

**JULIO  
FRANCISCO|  
CORTIJO|  
GIMENO**

Firmado  
digitalmente por  
JULIO FRANCISCO|  
CORTIJO|GIMENO  
Fecha: 2020.07.03  
11:56:14 +02'00'

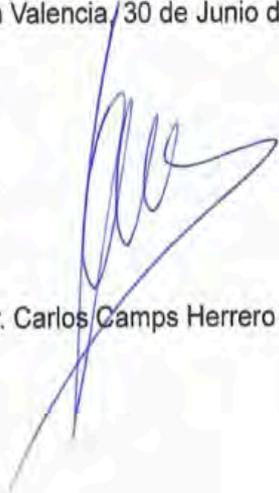
Dr. Julio Cortijo Gimeno

**DR. D. CARLOS CAMPS HERRERO**  
Catedrático Numerario de Universidad  
Departamento de MEDICINA  
Universidad de Valencia

**Certifica:**

Que la Tesis Doctoral presentada por Doña María José Safont Aguilera, con el título:  
**“ESTUDIO DE LAS MUCINAS ANCLADAS A MEMBRANA COMO DIANA FARMACOLÓGICA EN LA FIBROSIS PULMONAR”**  
ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En Valencia, 30 de Junio de 2020.



Dr. Carlos Camps Herrero

**DR. D. JAVIER MILARA PAYÁ**

Farmacéutico Adjunto en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

**Certifica:**

Que la Tesis Doctoral presentada por Doña María José Safont Aguilera, con el título:

**“ESTUDIO DE LAS MUCINAS ANCLADAS A MEMBRANA COMO DIANA FARMACOLÓGICA EN LA FIBROSIS PULMONAR”**

ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En Valencia, 30 de Junio de 2020

Dr. Javier Milara Payá



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

- Ministerio Español de Economía y Competitividad: SAF2011-26443, SAF2014-55322-P y SAF2017-82913-R.
- Subvenciones de la acción estratégica en salud (modalidad proyectos de investigación en salud) del Instituto de Salud Carlos III, dentro del subprograma estatal de generación de conocimiento, en el marco del plan estatal de investigación científica y técnica: FIS PI11/02618 y FIS PI14/01733.
- Centro de Investigación en Red de Enfermedades Respiratorias: CIBERES apoyado por el Instituto Nacional de Salud Carlos III y los Ministerios españoles de Economía y Competitividad y Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.
- Fondos de la Generalitat Valenciana: Prometeo II/2013/014 y Prometeo 2017/023

A Vicente, Mar y Alba.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero dedicar esta tesis,

*A mis directores, por todo su apoyo y tiempo dedicado y por la atención y accesibilidad mostradas en las fases del desarrollo de esta tesis. En especial a Julio Cortijo por guiarme y ayudarme en este proyecto y por transmitirme su extraordinaria capacidad de trabajo.*

*A mis compañeras de servicio por todos estos años de trabajo en equipo, por su complicidad y comprensión en los momentos mas duros de nuestro trabajo.*

*A mi familia, y en especial a mis padres, por la educación que me han dado y por el amor, trabajo y sacrificio demostrado a lo largo de todos estos años.*

*A mi marido y compañero, por su apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida. Por su paciencia y comprensión que me estimulan para intentar ser cada día mejor persona.*

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico.
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario.
A549	Línea celular epitelial basal alveolar humana adenocarcinómica.
$\alpha$ -SMA	Alfa actina del músculo liso.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ATS	American Thoracic Society.
AP-1	Activador de la proteína-1.
BSA	Albúmina sérica bovina.
CCE	Carcinoma célula escamosa.
CCL2	Ligando de quimioquinas 2.
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono.
Col-1	Colágeno tipo 1.
CP	Cáncer de pulmón.
CPCNP	Cáncer de pulmón de célula no pequeña
CPCP	Cáncer de pulmón de célula pequeña.
Ct	Ciclo umbral.
CT	Cola citoplasmática.
CV	Capacidad vital.
DAB	Diaminobenzidina.
DAPI	4', 6-Diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro.
DAMP	Patrones moleculares asociados a peligro.
DEPC	Dietilpirocarbonato.
DMEM	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco.
DLCO	Capacidad de difusión del pulmón de monóxido de carbono.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
EBV	Eibtein Barr virus.
EFG	Factor de crecimiento epidérmico.
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
EMT	Transición epitelio mesénquima.
EndoMT	Transición endotelio mesénquima.
EPID	Enfermedad pulmonar intersticial difusa.
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
ERK1/2	Quinasa regulada por señal extracelular.
ERS	European Respiratory Society.
ET-1	Endotelina tipo 1.
FAC	Fibroblasto asociado con el cáncer.
FBS	Suero bovino fetal
FDA	Food and Drug Agency
FEV <sub>1</sub>	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo.
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática.
FVC	Capacidad vital forzada pulmonar.
HEK293	Línea inmortalizada de células embrionarias de riñón 293.
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno.
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico.
HP	Hipertensión pulmonar
HRP	Peroxidasa de rábano.
IL-5	Interleuquina-5.
IL-6	Interleuquina-6.

IL-8	Interleuquina-8.
IL-13	Interleuquina-13.
INF	Interferon.
IT	Intratraqueal
JNK	Quinasa c - Jun N –terminal.
KO	Knock Out.
LBA	Lavado broncoalveolar.
LPA	Ácido lipofosfatidico
LPS	Lipopolisacárido.
MAPK	Protein quinasa activadas por mitógenos.
MB	Membrana basal.
MCE	Matriz extracelular.
MIF	Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos.
MMP	Metaloproteinasa de matriz.
MRC5	Línea celular de fibroblastos de pulmón humano.
MSC	Células madre mesenquimales.
MUC	Mucina.
MUC4 $\alpha$	Subunidad $\alpha$ de la mucina 4.
MUC4 $\beta$	Subunidad $\beta$ de la mucina 4.
NAC	N-acetilcisteina
NaOH	Hidróxido sódico.
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
NOX4	NADPH oxidasa 4
NF- $\kappa\beta$	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
NII	Neumopatía intersticial idiopática.
NLR	Receptores tipo Nod.
O <sub>2</sub>	Oxígeno
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Tampón salino fosfato.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PDE	Fosfodiesterasa.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PEF	Flujo espiratorio máximo.
PG	Prostaglandina.
PIF	Flujo inspiratorio máximo.
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinasa.
p-ERK	Proteína ERK fosforilada.
p-P38	Proteína P38 fosforilada.
ROS	Especies reactivas de O <sub>2</sub> .
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute.
RT	Retrotranscripción inversa.
Rt	Tiempo de relajación.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.
6MWD	Mejora de la distancia de 6 minutos a pie.
SBE	Smad Binding Element.
SHH	Vía Sonic Hedgehog.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SG	Supervivencia global.
SLP	Supervivencia libre de progresión.
SLPI	Inhibidor de la leucoproteasa secretada.
TBS	Solución salina tamponada.
Te	Tiempo espiratorio.
TCAR	Tomografía Computarizada de alta resolución.

TGF- $\beta$ 1	Factor de crecimiento transformante $\beta$ 1.
TMB	Tetranezilbencidina.
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa.
TLR	Receptor tipo Toll.
VEGF	Factor de crecimiento del endotelial vascular.
WT	Wild Type.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>1. ANATOMÍA Y FUNCIÓN DEL SISTEMA RESPIRATORIO</b> .....	<b>10</b>
<b>2. EL EPITELIO RESPIRATORIO COMO BARRERA DEFENSIVA</b> .....	<b>13</b>
2.1. <i>Complejos de unión intercelular</i> .....	14
2.2. <i>Productos antimicrobianos</i> .....	14
2.3. <i>Aclaramiento mucociliar</i> .....	15
2.4. <i>El epitelio respiratorio modula la respuesta inmune</i> .....	16
<b>3. MUCINAS</b> .....	<b>18</b>
3.1. <i>Mucina 4 (MUC4)</i> .....	24
<b>4. FIBROSIS PULMONAR</b> .....	<b>25</b>
4.1. <i>Epidemiología</i> .....	26
4.2. <i>Prevalencia e incidencia</i> .....	27
4.3. <i>Mortalidad</i> .....	28
4.4. <i>Factores etiológicos</i> .....	30
4.4.1. <i>Factores ambientales</i> .....	30
4.4.2. <i>Agentes microbianos</i> .....	31
4.4.2. <i>Reflujo gastroesofágico</i> .....	32
4.4.3. <i>Factores genéticos</i> .....	32
4.4.4. <i>Radioterapia Torácica</i> .....	32
4.4.5. <i>Bleomicina</i> .....	32
4.5. <i>Fisiopatología de la FPI</i> .....	33
4.6. <i>Aspectos macroscópicos de la FPI</i> .....	36
4.7. <i>Aspectos microscópicos</i> .....	38
4.8. <i>Marcadores moleculares</i> .....	41
4.9. <i>Fibrosis pulmonar idiopática y cancer de pulmón</i> .....	44
4.9.1. <i>Tipos de células y procesos celulares involucrados en el CP asociado con FPI</i> .....	44
4.9.2. <i>Procesos celulares comunes en el CP asociado a fibrosis pulmonar</i> .....	46
4.9.3. <i>Invasión del tejido</i> .....	48
4.9.4. <i>Inflamación</i> .....	48
4.9.5. <i>Moléculas fibrogénicas principales y vías de transducción de señales que participan en cáncer de pulmón asociado a fibrosis pulmonar</i> .....	48
4.9.6. <i>Vías embriológicas</i> .....	51
4.9.7. <i>Vía PI3K / AKT / mTOR</i> .....	52
4.9.8. <i>Alteraciones genéticas y epigenéticas en el CP asociadas a fibrosis pulmonar</i> .....	52
4.10. <i>Complicaciones asociadas a la FPI</i> .....	55
4.11. <i>Tratamiento clínico</i> .....	56
4.11.1. <i>Manejo farmacológico</i> .....	56
<b>5. MODELOS ANIMALES IPF</b> .....	<b>70</b>
<b>HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>72</b>
<b>1. HIPOTESIS</b> .....	<b>72</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>72</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>74</b>
<b>1. MATERIALES</b> .. .....	<b>74</b>
1.1. <i>Reactivos utilizados</i> .....	74

1.2. Pacientes .....	76
1.3. Animales de experimentación.....	77
1.4. Cultivos celulares.....	77
1.4.1. Cultivos de células inmortales .....	77
<b>2. METODOS.....</b>	<b>79</b>
2.1. Silenciamiento génico mediante ARN interferente .....	79
2.2. Transformación de células HEK293 para la expresión inducible de MUC4 (HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4).....	81
2.3. Ensayo de proliferación .....	85
2.4. Senescencia celular.....	85
2.5. Inmunofluorescencia celular .....	86
2.6. Estudio de la expresión génica .....	86
2.6.1. Extracción de ARN total y cuantificación .....	86
2.6.2. Transcripción reversa (RT) .....	88
2.6.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).....	88
2.6.4. Estudio de la expresión proteica.....	93
2.7. Estimulación in vitro.....	96
2.8. Modelo animal de fibrosis .....	96
2.8.1. Función pulmonar .....	98
2.9. Histología.....	99
2.9.1. Fijación tisular y deshidratación.....	99
2.9.2. Análisis inmunohistoquímico .....	100
2.9.3. La tinción tricrómica de Masson .....	100
2.9.4. Análisis de coinmunofluorescencia.....	101
2.10. Análisis estadístico .....	102
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>103</b>
1. EXPRESIÓN DE MUC4.....	103
2. MUC4 $\beta$ PARTICIPA EN LA SENESCENCIA CELULAR Y LA PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR TGF- $\beta$ 1 EN CÉLULAS ALVEOLARES II (A549) Y FIBROBLASTOS PULMONARES (MRC5) .....	104
3. TGF- $\beta$ 1 COLABORA CON MUC4 $\beta$ EN EL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES ALVEOLARES Y DE FIBROBLASTOS A MIOFIBROBLASTOS.....	104+
4. LA SOBREPRESIÓN DE MUC4 AUMENTA EL EFECTO DEL TGF- $\beta$ 1 EN EL PROCESO TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES (EMT).....	111
4.1. MUC4 media la fosforilación de tGfBR1 y smad3 inducida por tgf- $\beta$ 1 .....	113
5. TGF- $\beta$ 1 NO INDUCE TRASLOCACIÓN NUCLEAR DEL MUC4 $\beta$ .....	117
6. MODELO DE FIBROSIS PULMONAR IN VIVO .....	119
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>124</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>128</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>129</b>
ANEXO 1. Aprobación del Comité Ético del estudio .....	145
ANEXO 2. Autorización para el procedimiento de experimentación animal .....	146

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1. ANATOMÍA DEL SISTEMA RESPIRATORIO</b> .....	11
<b>FIGURA 2. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEFENSIVA DEL EPITELIO RESPIRATORIO</b> .....	12
<b>FIGURA 3. INTEGRACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL SURFACTANTE Y LA INMUNIDAD INNATA EN EL ALVEOLO</b> .....	13
<b>FIGURA 4. ACLARAMIENTO MUCOCILIAR</b> .....	15
<b>FIGURA 5. LOCALIZACIÓN Y SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL TLR)</b> .....	17
<b>FIGURA 6. ESTRUCTURA DE MUC4</b> .....	24
<b>FIGURA 7. MORBILIDAD EN PACIENTES CON FPI</b> .....	29
<b>FIGURA 8. FACTORES ETIOLÓGICOS RELACIONADOS CON LA APARICIÓN DE FPI</b> .....	31
<b>FIGURA 9. ANATOMÍA DEL PULMÓN</b> .....	33
<b>FIGURA 10. ESTRUCTURA DEL ACINO ALVEOLAR</b> .....	34
<b>FIGURA 11. ANATOMÍA PULMONAR DE LA FPI</b> .....	35
<b>FIGURA 12. FASES DE REPARACIÓN DE LA LESIÓN TISULAR</b> .....	36
<b>FIGURA 13. ALTERACIONES PATOLÓGICAS IMPLICADAS EN FPI</b> .....	37
<b>FIGURA 14. POSIBLES FUENTES DE FIBROBLASTOS PULMONARES</b> .....	39
<b>FIGURA 15. TIPOS DE CÉLULAS Y PROCESOS CELULARES ASOCIADOS AL CP Y LA FPI</b> .....	46
<b>FIGURA 16. MORFOLOGÍA DE CÉLULAS INMORTALES A549 Y MRC5</b> .....	79
<b>FIGURA 17. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE ARN INTERFERENTE</b> .....	80
<b>FIGURA 18. SISTEMA DE EXPRESIÓN INDUCIBLE TET-ON® 3G</b> .....	81
<b>FIGURA 19. GENERACIÓN Y COMPROBACIÓN DE LA LÍNEA HEK293/TET3G</b> ...	83
<b>FIGURA 20. MAPA GENÉTICO DEL PLÁSMIDO CS-H2247-PTRE3G</b> .....	84
<b>FIGURA 21. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y CUANTIFICACIÓN</b> .....	87
<b>FIGURA 22. TRANSCRIPCIÓN REVERSA</b> .....	88
<b>FIGURA 23. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</b> .....	89
<b>FIGURA 24. SISTEMA TAQMAN® DE CUANTIFICACIÓN FLUOROMÉTRICA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA</b> .....	90
<b>FIGURA 25. PCR A TIEMPO REAL</b> .....	92
<b>FIGURA 26. ESQUEMA DE LA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING</b> .....	94
<b>FIGURA 27. ESQUEMA DE LA TÉCNICA DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE COMPLEJOS GRA-MUC4b</b> .....	95

<b>FIGURA 28.</b> PLETISMOGRAFO BUXCO PARA ANIMAL PEQUEÑO .....	99
<b>FIGURA 29.</b> NIVELES DE EXPRESIÓN DE MUC4 EN TEJIDO DE PARÉNQUIMA PULMONAR PROCEDENTE DE SUJETOS SANOS Y PACIENTES FPI.....	104
<b>FIGURA 30.</b> MUC4 MEDIA LA PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS DE PULMÓN INDUCIDA POR TGF-B1 .....	105
<b>FIGURA 31.</b> MUC4 MEDIA EN LA SENESCENCIA INDUCIDA POR TGF-B1 DE CÉLULAS ALVEOLARES EPITELIALES Y FIBROBLASTOS .....	106
<b>FIGURA 32.</b> TGF-B1 Y MUC4 COLABORAN PARA INDUCIR LA TRANSICIÓN ALVEOLAR EPITELIAL A MESENQUIMA.....	108
<b>FIGURA 33.</b> TGF-B1 Y MUC4 COLABORAN PARA INDUCIR LA TRANSICIÓN DE FIBROBLASTO A MIOFIBROBLASTO .....	110
<b>FIGURA 34.</b> LA SOBREENPRESIÓN DE MUC4 AUMENTA LOS EFECTOS DE TGF-B1 EN LA TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA DE LAS CÉLULAS HEK293 TRANSFECTADAS.....	112
<b>FIGURA 35.</b> LA SOBREENPRESIÓN DE MUC4 AUMENTA LOS EFECTOS DE TGF-B1 EN LA SENESCENCIA.....	113
<b>FIGURA 36.</b> MUC4 MODULA EL EFECTO DE TGF-B1 SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE TGFBR1 .....	114
<b>FIGURA 37.</b> MUC4 MODULA EL EFECTO DE TGF-B1 SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE SMAD3.....	116
<b>FIGURA 38.</b> CO-LOCALIZACIÓN DE MUC4B Y P-TGFBR1 .....	117
<b>FIGURA 39.</b> INMUNOFLORESCENCIA CON-FOCAL DE P-SMAD3 Y MUC4B ...	118
<b>FIGURA 40.</b> LA ELIMINACIÓN DE MUC4 (KO) MEJORA LA SUPERVIVENCIA E INHIBE LA FP INDUCIDA POR BLEOMICINA.....	120
<b>FIGURA 41.</b> LA ELIMINACIÓN DE MUC4 (KO) INHIBE LA EXPRESIÓN DE ARNm INDUCIDA POR BLEOMICINA DE MARCADORES MOLECULARES DE FP.....	121
<b>FIGURA 42.</b> LA ELIMINACIÓN DE MUC4 (KO) INHIBE LA EXPRESIÓN DE ARNm INDUCIDA POR BLEOMICINA DE MARCADORES MOLECULARES DE FP....	122
<b>FIGURA 43.</b> CO-LOCALIZACIÓN DE MUC4B/P-SMAD2/3 Y MUC4B/PTGFBR1 EN PULMÓN DE RATONES CON FP INDUCIDA POR BLEOMICINA .....	123

## ÍNDICE DE TABLAS

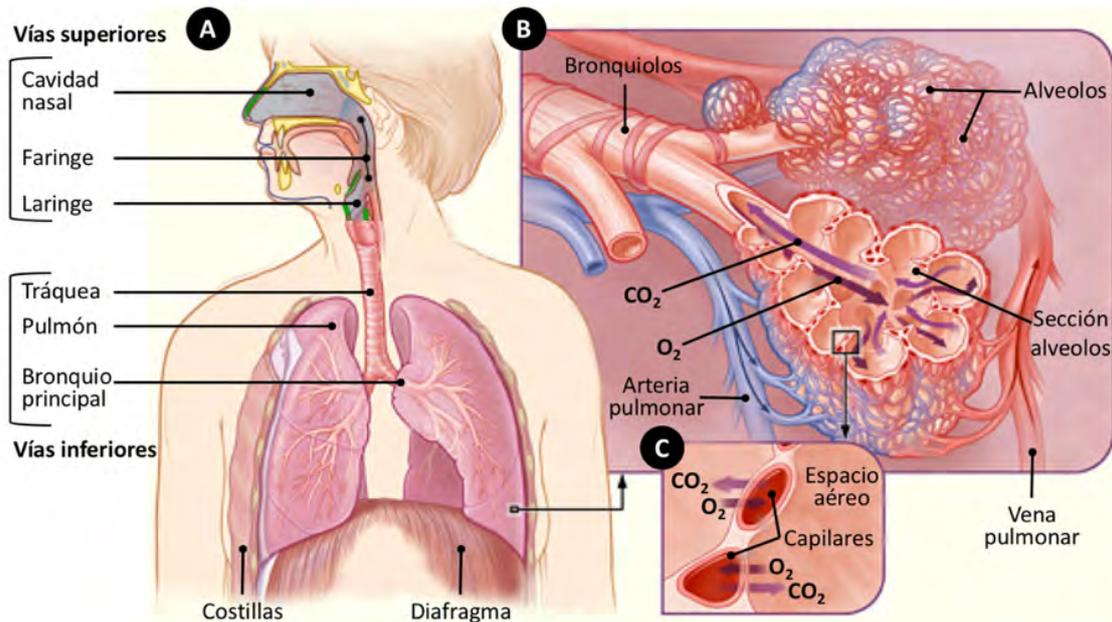
<b>TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LAS PRINCIPALES MUCINAS.....</b>	<b>21</b>
<b>TABLA 2: ESTUDIOS DE PREVALENCIA E INCIDENCIA DE FPI EN EUROPA...28</b>	<b>28</b>
<b>TABLA 3. GENES MUTADOS, GENES HIPERMETILADOS Y ARN NO CODIFICANTES CON EXPRESIÓN ALTERADA EN PACIENTES CON FPI, CP Y CP Y FPI.....</b>	<b>55</b>
<b>TABLA 4. NUEVOS FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS PULMONAR .....</b>	<b>68</b>
<b>TABLA 5. REACTIVOS UTILIZADOS.....</b>	<b>76</b>
<b>TABLA 6. INDICACIONES DEL PROTOCOLO DE SILENCIAMIENTO SEGÚN LÍNEA CELULAR .....</b>	<b>81</b>
<b>TABLA 7. SONDAS DE EXPRESIÓN GÉNICA TAQMAN® UTILIZADOS EN LA PCR A TIEMPO REAL.....</b>	<b>91</b>
<b>TABLA 8: ANTICUERPOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS PARA WESTERN BLOTTING.....</b>	<b>95</b>
<b>TABLA 9. INDUCCIÓN DE FIBROSIS PULMONAR POR BLEOMICINA EN RATÓN EN UN MODELO DE SILENCIAMIENTO GÉNICO TRANSITORIO DE MUC4.....</b>	<b>97</b>
<b>TABLA 10. PROTOCOLO DE FIJACIÓN Y DESHIDRATACIÓN DE TEJIDO PULMONAR.....</b>	<b>99</b>
<b>TABLA 11. ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS EN EL ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO... ..</b>	<b>100</b>
<b>TABLA 12.. CRITERIOS PARA CLASIFICACIÓN GRADO DE FIBROSIS.....</b>	<b>101</b>
<b>TABLA 13. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS SUJETOS DONANTES DE CONTROL Y PACIENTES CON FPI.....</b>	<b>103</b>

# INTRODUCCIÓN

## 1. ANATOMÍA Y FUNCIÓN DEL SISTEMA RESPIRATORIO

La función principal del sistema respiratorio humano es el intercambio gaseoso entre la sangre y la atmósfera, aprovisionando de oxígeno (O<sub>2</sub>) las células y eliminando el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) generado por el metabolismo (Hall y Guyton, 2011). Por ello disponemos de estructuras anatómicas llamadas vías aéreas que transportan el aire desde el exterior del organismo hasta los pulmones. En su conjunto, las vías aéreas de un individuo adulto tienen una superficie aproximada de 70 m<sup>2</sup> que está virtualmente en contacto con el medio exterior (Holt, Strickland, Wikström y Jahnsen, 2008). Esto unido a que inspiramos de media entre 6 y 12 litros de aire por minuto (Ganesan, Comstock y Sajjan, 2013) supone una exposición continuada a microbios, alérgenos y partículas; por esta razón el sistema respiratorio presenta la mayor tasa de infecciones en humanos (Fehervari y Kiyono , 2008). Es por tanto necesaria una barrera eficaz que elimine estas amenazas sin provocar inflamación, manteniendo la homeostasis del tejido a fin de preservar el intercambio gaseoso, que es crítico para el organismo.

La porción conductora del sistema respiratorio es un conjunto de estructuras anatómicas que transportan el aire desde el exterior del organismo hasta la porción respiratoria dentro de los pulmones. La porción conductora se divide en vías aéreas superiores e inferiores y no sólo conduce el aire inspirado sino que también lo filtra, humedece y atempera; mientras que la porción respiratoria está formada por los bronquiolos y sus unidades funcionales llamadas alveolos, donde se produce el intercambio gaseoso con la sangre (Kierszenbaum, 2006) (**Figura 1**).



**Figura 1. Anatomía del sistema respiratorio.** A, La porción conductora se divide consecutivamente en vías aéreas superiores (cavidades nasales, faringe, laringe) y vías aéreas inferiores (tráquea, bronquios y bronquiolos). B, la porción respiratoria incluye los bronquiolos respiratorios, los ductos alveolares y los alveolos. C, la fina pared que separa la luz alveolar de los capilares sanguíneos adyacentes permite el intercambio gaseoso. Imagen modificada de Kierszenbaum, 2006.

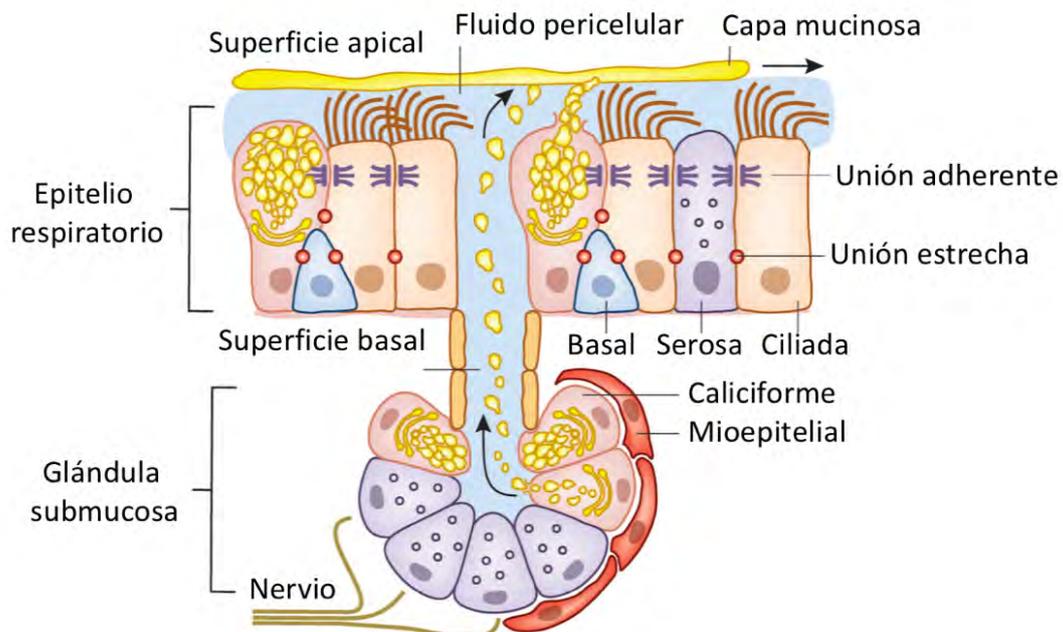
La superficie del sistema respiratorio está cubierta por una capa continua de células epiteliales que varían en su distribución, abundancia y tipo celular según la región. Las vías proximales hasta los bronquios están tapizadas con el denominado epitelio respiratorio, que es un epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado compuesto principalmente por tres tipos celulares:

- **Células ciliadas:** suponen hasta un 50% de la población celular en las vías aéreas. Tienen forma columnar con el núcleo en la base y poseen de 200 a 300 cilios en su membrana celular apical; el movimiento coordinado de estos cilios se conoce como batida ciliar y es de gran relevancia, como veremos más adelante.
- **Células secretoras no ciliadas** (caliciformes y serosas). Presentan múltiples gránulos en la región apical que liberan su contenido al lumen respiratorio. Morfológicamente las células caliciformes y serosas son similares, pero se distinguen en el contenido de sus gránulos. En el primer caso se trata de glicoproteínas de alto peso molecular llamadas mucinas, que atrapan partículas

inhaladas. En el segundo caso contienen un fluido seroso electro-denso que contribuye al volumen de líquido que recubre el epitelio e hidrata las mucinas secretadas por las células caliciformes, constituyendo el moco.

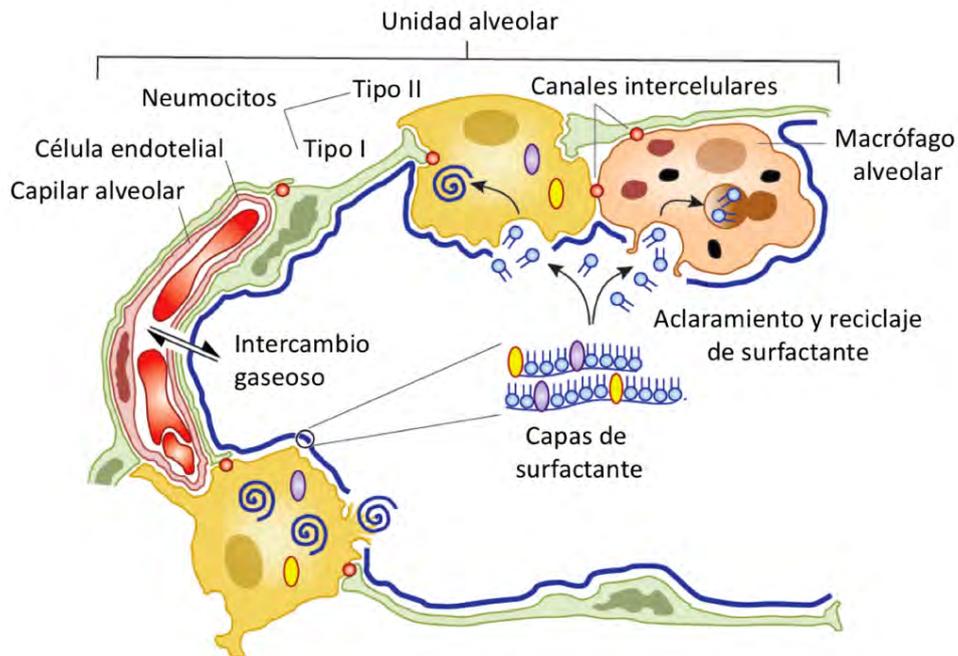
- **Células basales:** se sitúan sobre la lámina basal pero sus superficies apicales no alcanzan el lumen. Están relativamente indiferenciadas y se consideran células madre con capacidad de restaurar la mayoría de poblaciones celulares del epitelio respiratorio.

Además, en las vías más proximales, la invaginación del epitelio forma glándulas submucosas con una proporción variable de células ciliadas y secretoras (**Figura 2**). A medida que se llega a los bronquiolos, el epitelio cambia gradualmente a cuboidal simple y predominan las también secretoras células de Clara, que liberan proteínas surfactantes y anti-proteinasa que protegen el epitelio bronquiolar (Knight y Holgate, 2003; Ganesan y col. 2013).



**Figura 2 Estructura y función defensiva del epitelio respiratorio.** Las vías respiratorias desde los bronquiolos terminales hasta la tráquea están recubiertas de un epitelio pseudoestratificado formado por células ciliadas y secretoras, que junto a las glándulas submucosas secretan mucinas y otras proteínas de defensa al fluido pericelular. Las propiedades de gel del moco, las uniones célula-célula y la comunicación entre células epiteliales respiratorias proporciona múltiples barreras contra la infección. Figura adaptada de Whitsett y Alenghat, 2015.

Finalmente, en la porción respiratoria los bronquiolos y posteriormente los ductos alveolares presentan las pequeñas evaginaciones llamadas alveolos, cuyas paredes están formadas por un epitelio escamoso simple poblado por células epiteliales llamadas neumocitos tipo I y II. El intercambio gaseoso está mediado por el estrecho contacto entre las células endoteliales de los capilares pulmonares y los neumocitos tipo I, que forman y mantienen una extensa superficie gracias a las propiedades tensoactivas del surfactante pulmonar secretado por los neumocitos tipo II (**Figura 3**).



**Figura 3. Integración de la función del surfactante y la inmunidad innata en el alveolo.** El intercambio gaseoso está mediado por la proximidad de los neumocitos tipo I y II con las células endoteliales en los capilares pulmonares. Estos capilares forman una enorme superficie por la que la entrada de gases genera presiones sobre las paredes de los alveolos. El surfactante secretado por los neumocitos tipo II recubre estas paredes, reduciendo la tensión superficial de los alvéolos y evitando su colapso. El surfactante presenta además actividad antimicrobiana, atrapando microbios o partículas que son fagocitadas por macrófagos alveolares para generar inmunidad, y por neumocitos tipo II para reciclar y aclarar el surfactante del espacio alveolar. Figura adaptada de Whitsett y Alenghat, 2015.

## 2. EL EPITELIO RESPIRATORIO COMO BARRERA DEFENSIVA

En un principio se pensó que el epitelio respiratorio tenía únicamente una función de barrera física, impidiendo la entrada de patógenos de manera estática. No obstante, tras años de estudios se ha recogido una exhaustiva evidencia de que el epitelio respiratorio presenta una compleja dinámica en la defensa del organismo. Los tres componentes esenciales que contribuyen a la función barrera del epitelio de las vías respiratorias son: las uniones intercelulares estrechas y adherentes, que regulan la

permeabilidad intercelular epitelial (Phol y col., 2009), la secreción de productos antimicrobianos que matan a los patógenos inhalados y el aclaramiento mucociliar, que atrapa y elimina las partículas extrañas inhaladas de las vías respiratorias (Knowles y Boucher, 2002).

### **2.1 Complejos de unión intercelular**

Las células de los epitelios, incluyendo el respiratorio, disponen de estructuras proteicas enclavadas en los bordes apicolaterales que proporcionan unión intercelular. Estas estructuras se denominan uniones estrechas y uniones adherentes, y su cooperación regula la permeabilidad del epitelio. Las uniones estrechas forman canales entre las células con un transporte regulado de solutos e iones, mientras que las uniones adherentes impiden el paso de los patógenos inhalados y partículas ambientales. Además, las proteínas que componen las uniones adherentes, como cadherinas o cateninas, participan en la señalización de procesos de expresión génica, proliferación y diferenciación celular. Así pues, la disociación o los daños sostenidos que afectan estos complejos de unión interrumpen no sólo la función de barrera, sino que también pueden interferir en la reparación y diferenciación de las células epiteliales. En este sentido, en los fumadores y en los pacientes con asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se ha observado que el epitelio de las vías respiratorias se torna permeable, hiperproliferativo y anormalmente diferenciado (Whitsett y Alenghat, 2015). La infección por virus o bacterias también puede causar alteración transitoria de las uniones estrechas o adherentes. Factores tales como los interferones y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) expresados en respuesta a la infección pueden prolongar la interrupción de las uniones estrechas mucho después de que la infección se haya resuelto, dando paso a alérgenos inhalados y contaminantes (Coyne y col., 2002).

### **2.2 Productos antimicrobianos**

La defensa del epitelio no sólo es una cuestión física, sino que también existe una barrera bioquímica. Las células epiteliales expresan y liberan al lumen una gran variedad de componentes antimicrobianos que matan a los patógenos inhalados. Estas sustancias incluyen enzimas, inhibidores de proteasas, oxidantes y péptidos

antimicrobianos. Un ejemplo clave es la lisozima, que degrada la capa de peptidoglicano de las bacterias gram positivas (Ibrahim, Aoki y Pellegrini, 2002). Por otro lado, la lactoferrina permite también a la lisozima penetrar y degradar la capa de peptidoglicano de bacterias gram negativas (Ellison y Giehl, 1991). La lactoferrina actúa como un quelante de hierro, que es esencial para la respiración bacteriana, de manera que ejerce un efecto bactericida (Ganz, 2002); además presenta actividad antiviral contra los virus de ARN y de ADN, ya sea inhibiendo la unión del virus a las células huésped o por el bloqueo directo del virus (Van der Strate, Beljaars, Molema, Harmsen y Meijer, 2001). Por otro lado, los inhibidores de proteasas mitigan los efectos de las proteasas expresadas por patógenos y las células inmunes innatas reclutadas, como el inhibidor de la leucoproteasa secretada, inhibidor de la elastasa,  $\alpha$ 1-antiproteasa y antiqumiotripsina. Finalmente, las células epiteliales también generan moléculas oxidantes tales como óxido nítrico y peróxido de hidrógeno (Ganesan y col., 2013).

### 2.3 Aclaramiento mucociliar

Los principales actores que contribuyen a la función mucociliar del epitelio de las vías respiratorias son el moco y los cilios. Mientras que el moco atrapa patógenos inhalados u otro material particulado, el batido coordinado de los cilios de las células epiteliales barre el material atrapado hacia la faringe, lejos de los pulmón (Bals y Hiemstra, 2004). Para ello el moco flota sobre una capa periciliar menos viscosa, compuesta por proteínas de membrana, que actúa como lubricante de la batida ciliar (Figura 4).

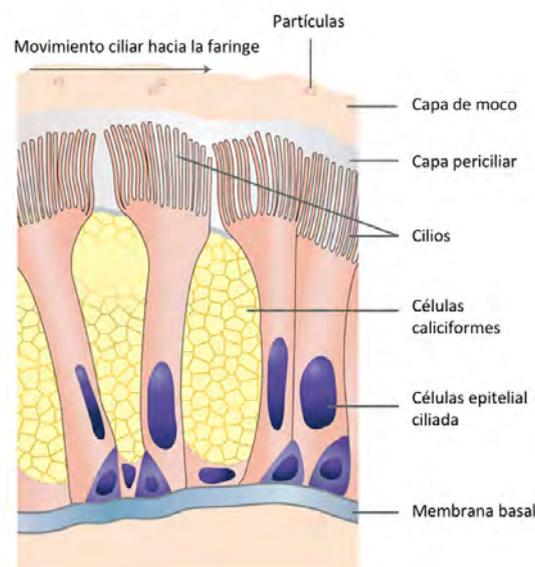


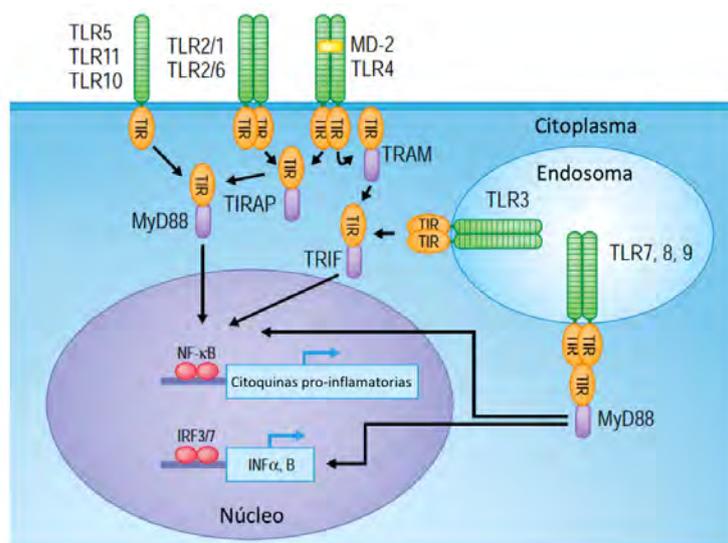
Figura 4. Aclaramiento mucociliar

El transporte eficiente del moco es dependiente de la velocidad del batido ciliar así como de la hidratación del moco, lo que contribuye a sus propiedades viscoelásticas (Tarran, Grubb, Gatzky, Davis y Boucher, 2001). En general, el moco más hidratado es eliminado más eficientemente de los pulmones. La mucosidad de las vías respiratorias contiene más de 200 proteínas, y es secretada tanto por las células caliciformes como por las glándulas submucosas. En individuos sanos, los ritmos circadianos regulan la secreción normal del moco, principalmente a través del nervio vago. Sin embargo, en pacientes con enfermedades inflamatorias respiratorias, la hipersecreción del moco a partir de células caliciformes hiperplásicas contribuye a la obstrucción de las vías aéreas (Rogers, 2007). Varios mediadores inflamatorios, como el TNF $\alpha$ , interleukinas (IL) IL-1 $\beta$ , IL-13, IL-17, factores de crecimiento tales como EGF (epidérmico) y TGF (transformante), y factores ambientales como el humo de tabaco, alérgenos y patógenos microbianos han demostrado estimular la hipersecreción de moco (Dohrman y col., 1998; Gensch y col., 2004). Terapias dirigidas a limitar la hipersecreción de moco como la N-acetilcisteína (NAC) y la carbocisteína, además de modular el aclaramiento mucociliar, pueden mejorar la obstrucción de las vías respiratorias. Por otro lado, el epitelio respiratorio alberga una flora bacteriana comensal cuyo mantenimiento está mediado por la barrera mucociliar y las respuestas inmunes innatas y adquiridas, que minimizan la inflamación y mantienen la homeostasis del tejido. No obstante, los pulmones de los fumadores y los pacientes con fibrosis quística, EPOC y/o asma muestran alteración del aclaramiento mucociliar normal, lo que podría alterar la cantidad y diversidad de poblaciones bacterianas en el epitelio respiratorio. Este hecho subyace a las infecciones respiratorias recurrentes y persistentes que contribuyen a la morbilidad y mortalidad en estos trastornos (Sze y col., 2012; Hansel y col., 2013).

#### **2.4 El epitelio respiratorio modula la respuesta inmune**

Además del sistema de defensa innata proporcionado por el aclaramiento mucociliar y el surfactante, las células epiteliales reconocen a los patógenos microbianos y sus productos, iniciando la señalización para reclutar e instruir a las células del sistema inmunitario. Las superficies de las células epiteliales proporcionan la interfaz inicial con el medio ambiente y están bien equipadas para responder a los patrones asociados a patógenos (PAMP) y los patrones moleculares asociados al peligro (DAMP). Receptores de reconocimiento de patrones, incluyendo receptores tipo *Toll* (TLR) y

receptores tipo *Nod* (NLR), se expresan ampliamente en las células epiteliales respiratorias (Arancibia y col., 2007). Aunque la señalización por estos receptores en las células hematopoyéticas es un componente esencial de la inmunidad innata en los pulmones, la señalización de los TLR en las células estructurales, incluyendo las células epiteliales de las vías respiratorias, es fundamental para impulsar las respuestas inmunológicas mucosas (Van Maele L y col., 2014). Las células epiteliales ciliadas y las células alveolares de tipo II expresan múltiples TLR, incluyendo TLR2, TLR4 y TLR5 (Greene y McElvaney, 2005). Los PAMP y los DAMP son reconocidos por los TLR de manera específica: lipoproteínas (TLR1, -2 y -6), liposacáridos (LPS) (TLR4), flagelina (TLR5), ADN (TLR9) y ARN (TLR3, -7, y -8). Este reconocimiento inicia la transducción de señales a través del adaptador MyD88 y otros mecanismos independientes. MyD88 provoca la fosforilación de quinasas como p38, JNK o ERK1/2 que a su vez activan factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y/o IRF3, induciendo la expresión de citoquinas inflamatorias como TNF, IL-1b, IL-6 e IL-8 en las células epiteliales (**Figura 5**). Estas citoquinas y quimiocinas inducen el reclutamiento y activación de células profesionales del sistema inmunológico para modular las respuestas inflamatorias. De este modo, el resultado de la señalización vía PAMPs o DAMPs, influenciado por la naturaleza tanto del patógeno como del entorno inflamatorio en los pulmones, puede desencadenar tanto efectos protectores como patológicos sobre las funciones de barrera de las vías respiratorias (Vareille. Kieninger, Edwards y Regamey, 2011).



**Figura 5. Localización y señalización de los receptores tipo Toll (TLR).** Los TLR se localizan en la membrana celular y endosomal. La unión del correspondiente ligando a cada TLR activa una cascada de señalización a través de sus dominios Toll/IL-1R (TIR), que mediante las moléculas adaptadoras MyD88 y/o TRIF inducen la transcripción de genes pro-inflamatorios. Figura adaptada de Rich, 2013.

### 3. MUCINAS

Las mucinas son una familia de proteínas de alto peso molecular y altamente glicosiladas producidas por las células de los tejidos epiteliales (**Tabla 1**) .

Mucina	Tipo	Localización	Rol fisiológico y patológico
<b>MUC 2</b>	<b>S</b>	Pulmón y vías respiratorias. Mucosa nasal normal. Pólipos nasales. Otras: Intestino (yeyuno, íleon, colon).	Principal mucina secretada en el intestino grueso. Papel importante en: la defensa del huésped innata, la regulación de la secreción, procesos de absorción, resistencia a la colonización y mantenimiento de la integridad de la barrera de moco en el intestino grueso. La expresión de MUC2 se correlaciona con enfermedades, como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.
<b>MUC 3</b>	<b>MT</b>	Epitelio gastrointestinal (colon, intestino delgado, vesícula biliar )	Principal mucina secretada en el intestino grueso. Papel importante en la defensa innata del huésped, la regulación de la secreción, procesos de absorción, resistencia a la colonización, Contribuyen en el mantenimiento de la integridad y a la protección de la barrera de moco en el intestino grueso La expresión de MUC3 se correlaciona con enfermedades inflamatorias intestinales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.
<b>MUC 4</b>	<b>MT</b>	En la superficie epitelial del pulmón y vías respiratorias. En la mucosa nasal normal. Pólipos nasales.  Otras: Ojos, cavidad oral, glándulas lacrimales, glándulas salivares, cuello uterino, próstata, estómago, colon y glándula mamaria.	Responsable de la naturaleza viscoelástica de la mucosidad. Papel como barrera protectora contra los patógenos invasores y productos químicos: ayuda en la depuración mucociliar de cuerpos extraños. Proporciona defensa de las vías respiratorias superiores e inferiores. Implicada en la progresión tumoral mediante la inducción de aumento del crecimiento, la proliferación y la supervivencia de la célula. La expresión aberrante en tumores de ovario y en lesiones pancreáticas malignas. Es frecuente un aumento de la expresión en cáncer de pulmón, mama y colon. Funciones de los diferentes segmentos MUC4 : Ectodominio (Anti- adhesivo, hidratación y lubricación de la superficie celular, ERBB de señalización).

<b>MUC5AC</b>	<b>S</b>	<p>Epitelio pulmonar y vías respiratorias (células caliciformes ) Mucosa nasal normal. Pólipos nasales.</p> <p>Otras: Ojos, estómago.</p>	<p>Principal mucina formadora de moco en el tracto respiratorio. Responsable de la naturaleza viscoelástica de la mucosidad. Protección y estabilización de la superficie ciliada Papel como barrera protectora contra los patógenos invasores y productos químicos: Ayuda en la depuración mucociliar de cuerpos extraños . Proporciona defensa de las vías respiratorias superiores e inferiores. Contribuye a la función de la barrera defensiva y la reología del moco de las vías respiratorias. Marcador para la metaplasia de células caliciformes. Asociado con enfermedades respiratorias principalmente con el asma.</p>
<b>MUC5B</b>	<b>S</b>	<p>Epitelio pulmonar y vías respiratorias (glándulas submucosas).</p> <p>Mucosa nasal normal. Pólipos nasales.</p> <p>Otras: Glándulas salivales, Glándulas submandibulares.</p>	<p>De las principales mucinas formadoras de moco en el tracto respiratorio. Responsable de la naturaleza viscoelástica de la mucosidad. Protección y estabilización de la superficie ciliada. Papel como barrera protectora contra los patógenos invasores y productos químicos. Ayuda en la depuración mucociliar de cuerpos extraños. Proporciona una defensa de las vías respiratorias superiores e inferiores. Contribuye a la función de la barrera defensiva y la reología del moco de las vías respiratorias. Asociado con enfermedades respiratorias, principalmente con EPOC. Interacción entre MUC5B y diferentes proteínas salivales (Importante en el mantenimiento de la fisiología oral: mejora de la protección física y la integridad del esmalte).</p>
<b>MUC6</b>	<b>S</b>	<p>Estómago, íleon, vesícula biliar. Mama.</p>	<p>MUC6 se expresa en cáncer de mama.</p>
<b>MUC7</b>	<b>S</b>	<p>Pulmón y vías respiratorias. Mucosa nasal normal. Pólipos nasales.</p> <p>Otras: Glándulas salivales, sublinguales y Glándulas submandibulares. glándula lagrimal .</p>	<p>Mucina secretada pero no formadora de gel. La interacción entre las mucinas y diferentes proteínas salivales son importantes en el mantenimiento de la fisiología oral (mejora de la protección física, la integridad del esmalte)</p>
<b>MUC8</b>	<b>S</b>	<p>Pulmón y vías respiratorias. Mucosa nasal normal. Pólipos nasales.</p>	<p>Sobreexpresión de MUC8 en los pólipos nasales.</p> <p>MUC8 como un marcador de células ciliadas en el epitelio nasal humano</p>

<b>Mucina</b>	<b>Tipo</b>	<b>Localización</b>	<b>Rol fisiológico y patológico</b>
<b>MUC9</b>	<b>S MT</b>	Ovarios. Trompas de Falopio	MUC9 se expresa en epitelios de tumores de ovario. MUC9 o glicoproteína del oviducto (OVGP1) está presente en el suero de las mujeres con cáncer de ovario y se ha descrito como posible marcador de suero para la detección de cáncer de ovario
<b>MUC10</b>		Mucina submandibular.	Mucina salivar.
<b>MUC11</b>	<b>MT</b>	Pulmón Otras: Colon Tracto reproductivo.	
<b>MUC12</b>	<b>MT</b>	Estómago, colon, páncreas.	
<b>MUC13</b>	<b>MT</b>	Pulmón y vías respiratorias.  Otras: Colon, tráquea, intestino, epitelio conjuntival.	Expresado de forma aberrante en cáncer gástrico, colorrectal, de ovario, páncreas, pulmón y carcinomas de ovario. La sobreexpresión de MUC13 aumenta el crecimiento celular, la formación de colonias, la migración celular y la invasión.
<b>MUC15</b>	<b>MT</b>	Pulmón y vías respiratorias. Otras: Colon, intestino delgado, próstata, placenta, glándulas salivares, glándula tiroides, moderadamente en riñón, epitelio conjuntival.	La expresión aberrante de MUC15 se correlaciona con el desarrollo de adenocarcinoma de colon. MUC15 es un potencial marcador de malignidad y de pronóstico en carcinoma papilar de tiroides.
<b>MUC16</b>	<b>MT</b>	Células epiteliales superficiales de pulmón y vías respiratorias. Pólipos nasales. Otras: epitelio de la superficie ocular, órganos y mesotelio que recubre las cavidades del cuerpo (cavidad pleural, peritoneal y pélvica). Epitelio conjuntival.	Papel como barrera protectora contra los patógenos invasores y productos químicos. Sobreexpresado en el cáncer de ovario y de endometrio. Marcador en suero para el cáncer de ovario.
<b>MUC17</b>	<b>MT</b>	Tracto gastrointestinal (duodeno, colon, estómago), epitelio conjuntival.	MUC17 tiene un papel en la protección de la mucosa intestinal contra patógenos lumenales. MUC17 se expresa en células de absorción intestinal en cáncer de páncreas y cáncer de colon. La expresión aberrante de MUC17 se correlaciona con el adenocarcinoma ductal de páncreas.

<b>MUC18</b>	<b>MT</b>	Pulmón y vías aéreas. Otras: Mama.	Se ha demostrado que MUC18 tiene un papel en la promoción de las metástasis en varios tumores, como el cáncer de mama y el melanoma por el aumento de su motilidad, invasión y la tumorigénesis. MUC18 amplifica la inflamación pulmonar durante la infección bacteriana.
<b>MUC19</b>	<b>S</b>	Pulmón y vías respiratorias (tráquea). Otras: Glándula salival.	Mayor mucina de la glándula salival.
<b>MUC20</b>	<b>MT</b>	Pulmón y vías respiratorias. Otras: Placenta, colon, próstata, hígado.	Aumentado en patología renal.
<b>MUC21</b>	<b>MT</b>	Pulmón y vía aérea.	MUC21 modula la adhesión celular. Marcador para adenocarcinoma de pulmón.
<b>MUC22</b>	<b>MT</b>	Pulmón y vía aérea.	

**Tabla 1. Características de las principales mucinas.** Tabla modificada de la revisión de Peir y col., 2014. Abreviaturas: MT: Membrane-tethered (Mucina de membrana); S: Mucina Secretada.

Se han distinguido al menos 22 genes humanos responsables de la codificación de mucinas por medio de la clonación de ADN, de los cuales 16 han sido identificados en pulmón (MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC8, MUC11, MUC13, MUC15, MUC16, MUC18, MUC19, MUC20, MUC21, and MUC22) (Rose y Voynow, 2006; Itoh y col., 2008; Simon y col., 2011).

Las mucinas están involucradas en la regulación de diversos procesos celulares tanto en condiciones normales como patológicas. La actividad y localización de las mucinas es mediada por varios mecanismos moleculares incluyendo, entre ellos, discretas interacciones con otras proteínas. Un conocimiento de las interacciones bioquímicas de las mucinas con otras proteínas, junto con una apreciación de su significado en situaciones patofisiológicas podría abrir la puerta al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

La principal característica de las mucinas es su capacidad para formar geles; es por ello que son un componente clave en la mayoría de las secreciones con aspecto de gel, cumpliendo funciones que van desde la lubricación, la protección de superficies o la señalización celular, pasando por la formación de barreras físicas y químicas donde con frecuencia juegan un papel inhibitorio. Algunas mucinas se encuentran relacionadas con el control de la mineralización de tejidos, incluyendo por ejemplo la formación del nácar en moluscos, calcificación en equinodermos y formación de hueso en vertebrados (Marin, Corstjens, De Gaulejac, de Vrind-De Jong y Westbroek,

2000). Estas proteínas cumplen también una función en el sistema inmune atrapando organismos patógenos. La sobreexpresión de mucinas, en especial de MUC1 se encuentra asociada a muchos tipos de cáncer (Niv, 2008)

Basándonos en su localización subcelular, tenemos dos tipos de mucinas, las que son secretadas al espacio extracelular y las que esta unidas a la membrana celular. Las mucinas secretadas (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6-8 y MUC19) carecen de un dominio transmembrana. Por otro lado están las mucinas ligadas a la membrana celular debido a la presencia de un dominio hidrofóbico que favorece su retención en la membrana plasmática (MUC1, MUC3, MUC4, MUC12-17 y MUC20) que son proteínas ancladas a la membrana tipo I, con un dominio de membrana que abarca una región NH<sub>2</sub>-terminal extracelular (en contacto con el exterior actúa como sensor) y una región COOH-terminal intracelular con cola citoplasmática (CT), que actúa como receptor y permite su participación en la señalización intracelular. Por lo tanto, estas mucinas unidas a la membrana no sólo modulan las interacciones extracelulares en las superficies celulares epiteliales sino que también participan en la señalización intracelular. Por el contrario, las mucinas secretadas son las glicoproteínas más abundantes en la composición del moco, siendo directamente responsables de sus propiedades viscoelásticas y de formación de gel.

Aunque todas las mucinas son codificadas por diferentes genes, comparten estructuras proteicas primarias con características similares. Las mucinas maduras se encuentran compuestas por dos regiones bien definidas:

- Las regiones terminales amino y carboxilo se encuentran muy levemente glicosiladas, aunque son ricas en cisteína. Los residuos de cisteína participan en el establecimiento de enlaces disulfuro dentro y entre los monómeros de mucina.
- Una gran región central formada por múltiples repeticiones en tándem de 10 a 80 residuos, donde al menos la mitad de los aminoácidos son serinas o treoninas. Esta área es modificada post-traduccionalmente por el agregado de cientos de residuos oligosacáridos unidos por enlaces O-glicosídicos. También es posible encontrar oligosacáridos unidos por enlaces N-glicosídicos, aunque en mucha menor proporción.

Las mucinas presentan una sobreexpresión en enfermedades pulmonares tales como asma, bronquitis, EPOC, o fibrosis quística. Dos mucinas de membrana, MUC1 y MUC4 han sido extensivamente estudiadas en relación a su implicación patológica en

el proceso de estas enfermedades (Singh y col., 2007). Las mucinas se encuentran bajo investigación como posibles marcadores diagnósticos para la ocurrencia de procesos malignos y otras enfermedades en los cuales se presenta una producción excesiva o aberrante de las mismas.

Bajo estímulo, la proteína MARCKS (sustrato para la kinasa C rica en alanina miristilada) coordina la secreción de mucina a partir de las vesículas llenas de mucina presentes dentro de las células epiteliales especializadas (Li, Martin, Spiz y Adler, 2001). La fusión de estas vesículas con la membrana plasmática provoca la liberación de la mucina, al tiempo que el intercambio de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Na}^+$  aumenta unas 600 veces. El resultado es un producto viscoelástico formado por un entretrejido de moléculas de mucina, las cuales combinadas con otras secreciones (por ejemplo las producidas por el epitelio respiratorio y las glándulas submucosas) forman el moco (Rogers, 2007; Perez-Villar J, 2008)

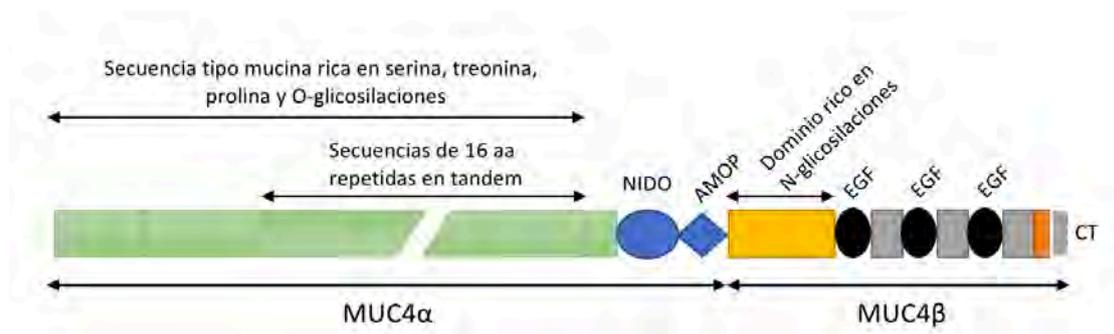
Basándose en la localización anatómica en el organismo así como en la compleja estructura de las mucinas, se sugirió hace bastante tiempo las propiedades multifacéticas del moco necesarias para la defensa del huésped: antimicrobianas, antiproteasas, antioxidantes y antiinflamatorias. Jacquot y col. (1992) fueron los primeros en demostrar las propiedades de las mucinas en las secreciones de las vías aéreas. Las mucinas de las vías aéreas son extremadamente hidrofóbicas. Constituyen los principales componentes sólidos del moco, proporcionándole sus propiedades viscosas y elásticas, permitiendo su función defensiva. Las principales mucinas expresadas en las vías aéreas son: tres mucinas ancladas a membrana (MUC1, MUC4, y MUC16) y tres mucinas secretadas formadoras de gel (MUC2, MUC5AC, MUC5B).

Recientes análisis proteómicos de las mucinas revelaron que están estrechamente asociadas con varias proteínas con las que comparten propiedades (Takishima y Shimura, 1993; Ali, Lillehoj, Park, Kyo y Kim, 2011). Las principales mucinas secretadas en las vías aéreas son la MUC5AC y MUC5B, mientras que la MUC2 se secreta principalmente en el intestino aunque también en pequeña proporción en las vías aéreas. MUC5AC y MUC5B son las mucinas principales productoras de gel en las vías aéreas y por lo tanto ambas contribuyen como barrera defensiva además de tener un papel regulatorio de los fluidos de las vías aéreas (Thornton, Rousseau y McGuckin, 2008). MUC5B es una mucina de las glándulas submucosas. MUC5AC ha sido usada como marcador de metaplasia celular. Ambas son producidas también por células

calciformes. Aunque el papel exacto de ambas en las vías aéreas tiene que ser completamente dilucidado, se ha sugerido que durante la inflamación de las vías aéreas es inducida la expresión de MUC5AC, mientras que la expresión de MUC5B es constitutiva (Evans, Kim, Tuvim y Dickey, 2009). También se ha demostrado que MUC5AC esta más asociado con asma (Kirkham y col. 2008) mientras que MUC5B se asocia mas a EPOC (Gendler y col. 1990). La sobreproducción de moco es un factor que contribuye a la progresión de la EPOC.

### 3.1 Mucina 4 (MUC4)

MUC4 es una O-glicoproteína de membrana formada por una gran subunidad alfa extracelular (MUC4 $\alpha$ ) que está fuertemente glicosilada y una subunidad beta (MUC4 $\beta$ ) que está anclada en la membrana celular y se extiende dentro del citosol. MUC4 $\alpha$  posee tres dominios funcionales putativos: TR, nidogen-like (NIDO) y el dominio asociado a la adhesión en MUC4 y otras proteínas (AMOP); mientras que MUC4 $\beta$  tiene tres dominios similares al EGF y una CT de 22 aminoácidos (**Figura 6**).



**Figura 6. Estructura de MUC4.**

MUC4 también ha sido implicado en la regulación de la señalización del crecimiento celular, a través de su interacción con la familia de proteínas ErbB, constituida por cuatro receptores tirosin-quinasa, estructuralmente relacionadas con el EGFR. La familia de ligandos del EGF se unen al dominio extracelular de los receptores ErbB, dando lugar a la formación de homo y heterodímeros (Riese y Stern, 1998). La formación de dímeros inducida por el ligando causa la fosforilación cruzada de residuos de tirosina específicos en la CT, que sirven como sitios de acoplamiento para la activación de diversas proteínas de señalización para controlar la proliferación, diferenciación, apoptosis y supervivencia de las células epiteliales respiratorias (Lemmon y Schlessinger, 2010). Por otro lado, la subunidad alfa glicosilada

probablemente confiere las propiedades anti-adhesivas a la célula, lo que permite el desprendimiento de los complejos célula-célula y célula-matriz en los epitelios sanos, así como cancerosos (Ramsauer, Carraway, Salas y Carraway, 2003; Jonckheere y col., 2012). Todas estas propiedades se correlacionan con el hecho de que la expresión de MUC4 esté incrementada en contextos de disrupción epitelial, como en las células epiteliales bronquiales de asmáticos severos (Hattori, Zhou, Trudeau y Wenzel, 2013) y en el epitelio de pólipos nasales (Woo, Bae, Song, Lee y Kim, 2010).

#### **4. FIBROSIS PULMONAR**

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) se define, según la American Thoracic Society (ATS), como una enfermedad de afectación específica intersticial fibrosante crónica, de origen desconocido y limitada al pulmón, que afecta a adultos de edad media a avanzada (Ley y Collard, 2013).

La FPI pertenece a un grupo de enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID), que presentan alteraciones heterogéneas en el tracto respiratorio inferior, con afectaciones del tejido intersticial y el espacio alveolar. Se caracterizan por presentar inflamación y cicatrización, tanto alveolar como del intersticio, que desemboca en alteraciones de las paredes alveolares y pérdida de la unidad funcional capilar alveolar. Dichas alteraciones se traducen en daños estructurales tales como el epitelio alveolar, el endotelio capilar pulmonar, la membrana basal y los tejidos perivasculares y perilinfáticos, como consecuencia del envejecimiento, factores genéticos y epigenéticos y la reactivación de rutas de señalización. La progresión de la fibrosis con pérdida funcional del tejido pulmonar conduce a una ventilación restringida, disfunción del intercambio gaseoso, ejercicio y respiración limitada, calidad de vida deficiente y finalmente la muerte (Ley y Collard, 2013.)

Se conocen más de 100 agentes causales que derivan en enfermedades intersticiales, pero en dos tercios de los casos, no se ha identificado la causa. Este grupo se conoce como EPID de causa desconocida, y la FPI es la forma más común de EPID. La definición de FPI implica la exclusión de todas las otras formas de neumonía intersticial, incluyendo las idiopáticas y las EPID asociadas a factores de exposición ambiental, medicación o enfermedades de carácter sistémico (*ATS/ERS, European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias, 2002; Visscher y col., 2006*) Es la forma más severa

de las EPIDs, es irreversible y presenta un curso clínico variable e impredecible asociado con un mal pronóstico.

#### **4.1. Epidemiología**

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

Publicaciones recientes indican un aumento de incidencia y la mortalidad. Estudios epidemiológicos realizados en la década de los 90 permitieron identificar que la FPI había resultado infradiagnosticada por falta de unanimidad en la nomenclatura de las enfermedades pulmonares con afectación intersticial idiopática (Olson y Swigris, 2012). Actualmente, la clínica y el diagnóstico de la FPI están bien consensuados y establecidos, ya que en el año 2002 el grupo multidisciplinario internacional de la ATS y la ERS redactaron un consenso donde se compilan los criterios clínicos, radiológicos y anatomopatológicos que permiten el diagnóstico de la FPI (*ATS/ERS International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias, 2002*). Dicho consenso establece que el diagnóstico definitivo de FPI requiere una biopsia de tejido pulmonar que confirme el patrón histológico de neumonía intersticial usual (UIP), además de presentar los siguientes criterios:

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

En ausencia de biopsia pulmonar, se valorará la biopsia transbronquial o el lavado broncoalveolar (LBA) y la confirmación de anomalías tisulares características como la opacidad reticular periférica con mínimas opacidades de vidrio deslustrado mediante la TC de alta resolución (TCAR) (Olson y Swigris, 2012).

La historia natural de la enfermedad se describe como un declive progresivo de la función pulmonar hasta eventualmente llegar a la muerte por fallo respiratorio u otras comorbilidades asociadas. La velocidad de progresión de la enfermedad es

impredecible y varía en cada enfermo. La mayoría sufren una progresión lenta y gradual, pero algunos se ven precipitados a una insuficiencia respiratoria aguda. Se desconoce si la historia natural de la enfermedad representa distintos fenotipos, o si esta progresión es atribuible a factores geográficos, étnicos, culturales, raciales y otros (Raghu y col., 2011).

#### **4.2. Prevalencia e incidencia**

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

En los últimos 30 años se han realizado estudios epidemiológicos exhaustivos en países como Estados Unidos y Reino Unido, los cuales revelan una tendencia al aumento en la incidencia de FPI, llegando a duplicarse en el año 2003, (Gribbin y col., 2006) y aumentando a una tasa del 5% por año (Navaratnam y col., 2011) sin poder correlacionarse con el envejecimiento poblacional general. La tendencia de los últimos años ha permitido apreciar un incremento en los datos de incidencia y prevalencia de esta entidad que pueden ser atribuidos a numerosos factores, tales como la mejora de las técnicas diagnósticas utilizadas, mayor sensibilidad de los profesionales en el diagnóstico de esta entidad, el mayor envejecimiento poblacional, etc.

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

En nuestro país se han realizado en los últimos años tres estudios epidemiológicos que reflejan las características de la EPI en el ámbito nacional y en algunas comunidades autónomas. El estudio epidemiológico más reciente publicado ha sido realizado en la Comunidad de Madrid (Neumomadrid) entre los años (2005-06), utilizando como referencia el consenso ATS/ERS publicado en 2002. Se realizó en una población de 3.400.000 habitantes, revelando una incidencia de EPID de 3 casos / 100.000 habitantes (h) y año, siendo las neumopatías intersticiales idiopáticas (NII) las más frecuentemente observadas entre las que se encuentra en primer lugar la FPI (29,5%), seguido de sarcoidosis (15,2%) y EPID asociada a conectivopatías (13,3%) (Linares y col 2007). El segundo estudio auspiciado por la SEPAR (Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica) se realizó en 2004 y tuvo como referencia el ámbito nacional; la incidencia estimada de EPID fue de 7,6 casos / 100.000 h y la de FPI, de 1,6 / 100.000 h (Raghu y col., 2011) Finalmente, el tercer estudio se realizó en la Comunidad Autónoma de Andalucía (Estudio RENIA), cuyos datos de incidencia (7,2 / 100.000 h) se asemejan a los obtenidos en el estudio nacional SEPAR (Lopez-Campos y Rodriguez-Becerra, 2004).

La tabla a continuación muestra datos de incidencia y prevalencia para algunos países europeos entre los que se encuentra los resultados de los estudios obtenidos en España comentados anteriormente (**tabla 2**):

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

**Tabla 2: Estudios de prevalencia e incidencia de FPI en Europa.** Comparación de la distribución de EPIDs en Europa entre 1992-2004 según registros prospectivos realizados por facultativos respiratorios. Únicamente se presentan los datos referentes a FPI y Neumonía intersticial idiopática (NII). Los datos se presentan como n (%), donde P equivale a prevalencia e I a incidencia. RENIA: Registro de Neumopatía Intersticiales de Andalucía; SEPAR: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. <http://www.erswhitebook.org/>

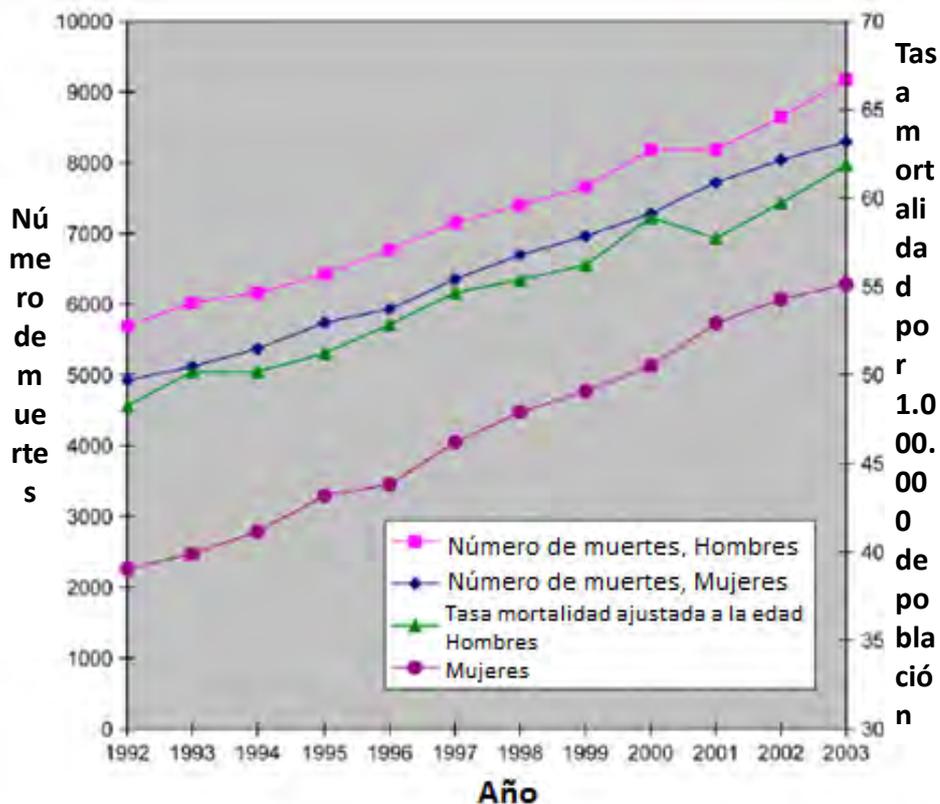
### 4.3. Mortalidad

La mortalidad hace referencia a la proporción de personas en la población general que fallecen al año como consecuencia de la enfermedad, en las que la FPI es

considerada la enfermedad causal de la muerte o asociada a la causa de la muerte. La mortalidad como consecuencia de la enfermedad se multiplica por 8 a partir de los 70 años frente a la mortalidad a edades entre 45-54 años. Los índices más elevados de mortalidad se encuentran en áreas industrializadas, lo que sugiere la exposición ocupacional y ambiental como posible factor de riesgo para el desarrollo de la FPI.

En referencia a los datos de mortalidad obtenidos en los estudios epidemiológicos realizados con anterioridad, se puede concluir que la mortalidad ha aumentado en la mayoría de los países, es superior en hombres que en mujeres y presenta variaciones regionales dentro de cada país (Ley y Collard, 2013).

Estudios realizados de mortalidad ajustada a edad y sexo revelan que la tasa de incidencia de la enfermedad aumenta con la edad y dicho aumento ha sido más notable en mujeres en los últimos años (**Figura 7**). Esto podría explicarse con los cambios en los patrones fumadores en mujeres. Todavía no existe ningún tratamiento eficaz para combatirla, siendo la supervivencia media de 2,8 años (Meltzer y Noble, 2008) similar a la de pacientes con cáncer de pulmón (Bouros y Antoniou, 2005).



**Figura 7. Morbilidad en pacientes con FPI.** Número de muertes al año y tasa de mortalidad ajustada al sexo en pacientes con fibrosis pulmonar por 1.000.000 habitantes, entre 1992-2003. La tasa de mortalidad está estandarizada a la edad según el censo de poblacional de EEUU en el 2000 (Olson y Swigris, 2012).

Entre 1989 y 2007, se realizaron ensayos epidemiológicos raciales, para estudiar la relación entre las diferencias étnicas y la FPI. Estos estudios determinaron que la incidencia en la población blanca (87,2%) es notablemente superior a la de la raza negra (5,1%) y la hispana (5,4%) (Ley y Colard, 2013)

#### **4.4. Factores etiológicos**

Por definición la FPI es una enfermedad de etiología desconocida, no obstante se han descrito una serie de factores de riesgo potenciales implicados en el desarrollo de la enfermedad. Estos factores abarcan desde hábitos de tabaquismo, hasta exposiciones ambientales y comorbilidades. Estudios epidemiológicos realizados en Estados Unidos, Reino Unido y Japón entre otros, han permitido la identificación de factores de riesgo en pacientes con diagnóstico de FPI. Estos estudios han logrado establecer una correlación ocupacional en determinados sectores altamente industrializados. Tal y como hemos descrito con anterioridad, la FPI tiene una incidencia mayor en hombres que en mujeres. Esta diferencia en la incidencia puede relacionarse con las ocupaciones predominantemente masculinas y los países altamente industrializados. Cabe destacar la relevancia clínica que implica conocer los factores ambientales implicados en esta enfermedad, ya que a raíz de estos pueden desarrollarse estrategias de prevención, pronta identificación y diagnóstico de la enfermedad, así como nuevas dianas terapéuticas.

A continuación se detallan aquellos factores etiológicos relacionados con la aparición y progresión de la FPI (**Figura 8**):

##### 4.1.1. Factores ambientales:

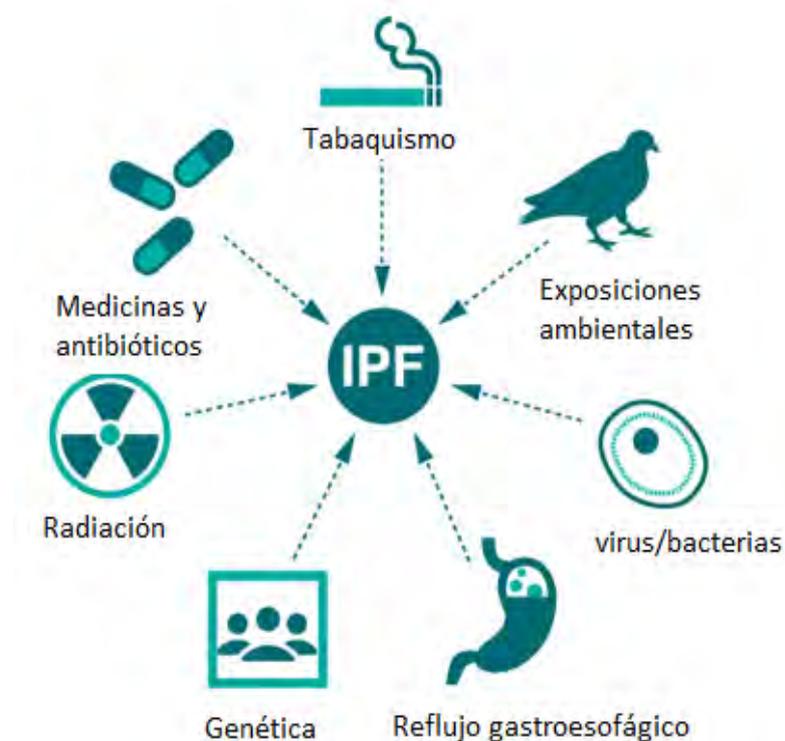
- **Tabaquismo:** el hábito tabáquico está estrechamente relacionado con la FPI, especialmente en individuos con un historial fumador extenso. La prevalencia del tabaco en pacientes con FPI oscila entre 41% y 83%, dependiendo de la definición empleada. Es considerado el factor de riesgo de mayor prevalencia, ya que aun habiendo cesado el hábito tabáquico, este es determinante en el desarrollo de la enfermedad, lo que sugiere que la exposición al tabaco es capaz de inducir algún tipo de lesión autosuficiente. El mecanismo por el cual el tabaco influye en el desarrollo de FPI es desconocido; se cree que puede acelerar el desarrollo de enfermedades edad-dependientes, o la enfermedad puede ser potenciada por el

estrés oxidativo aumentado en pacientes fumadores (Hubbard, Lewis, Richards, Johnston y Britton, 1996).

- Exposición ambiental y ocupacional: el riesgo de sufrir FPI está correlacionado con la exposición ambiental al polvo de metales (aleaciones de cobre, plomo y acero), polvo de madera de pino, arena, grava y silicio, la agricultura y la cría de pájaros (Hubbard y col., 1996).

#### 4.1.2. Agentes microbianos

Varios estudios epidemiológicos han relacionado el desarrollo de la FPI como consecuencia de una infección viral crónica. Se han encontrado proteína y ADN viral del Epstein-Barr virus (EBV) en tejido pulmonar de pacientes con FPI, en concreto en células epiteliales alveolares. El EBV, hepatitis C y herpesvirus son algunos de los agentes microbianos relacionados con la enfermedad. Resulta altamente complicado establecer conclusiones definitivas con la relación de agentes microbianos y la enfermedad ya que muchos de los pacientes con FPI recibieron terapia inmunosupresora, y la prevalencia de algunos de los virus como el EBV es per se muy elevada (*ATS/ERS International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias, 2002*).



**Figura 8. Factores etiológicos relacionados con la aparición de FPI.**

#### 4.1.2. Reflujo gastroesofágico

La presencia de contenido gástrico en el pulmón como consecuencia de la enfermedad de reflujo gastroesofágico, está altamente relacionada con la FPI aunque resulta imposible establecerla como agente causal directo. Una de las posibles teorías es la microaspiración crónica de contenido ácido o básico que va dañando el pulmón paulatinamente produciendo inflamación. Otra hipótesis es la constricción bronquial y de la laringe junto con hipersensibilidad como consecuencia de la presencia de ácido en el esófago.

#### 4.1.3. Factores genéticos

Menos de un 5% de la población que desarrolla FPI se debe a la transmisión genética familiar, esta es clínica e histológicamente indistinguible de la FPI espontánea. Recientes estudios genómicos, sugieren que el gen ELMOD2 de función desconocida y localizado en el cromosoma 4q31, puede relacionarse con la FPI familiar (Hodgson, Laitinen y Tukiainen, 2002). Estos estudios han asociado el desarrollo de la enfermedad con mutaciones en los genes TERT/TERC implicados en el acortamiento de los telómeros y mutaciones en MUC5B que codifica para la mucina 5B, y otros nuevos loci implicados en la defensa del hospedador, la adhesión celular y la reparación de ADN (Fingerlin y col., 2013; Noth y col., 2013).

#### 4.1.4. Radioterapia Torácica

Se emplea en el tratamiento del cáncer de pulmón (CP), esófago, mama y linfomas entre otros. La principal limitación en la dosificación de esta técnica es el desarrollo de lesiones intersticiales pulmonares y la emersión de focos fibróticos. Se han identificado lesiones como consecuencia de la radioterapia torácica que incluyen daño alveolar, aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y sus efectos tóxicos en las células parenquimales, junto con la afluencia de células inflamatorias tales como macrófagos y linfocitos. Además, se ha observado una desregulación de las citoquinas proinflamatorias y profibróticas TGF- $\beta$ , IL-6, MMPs y quimioquinas que pueden exacerbar la respuesta inflamatoria y de reparación de la lesión (Wilson y Wynn, 2009).

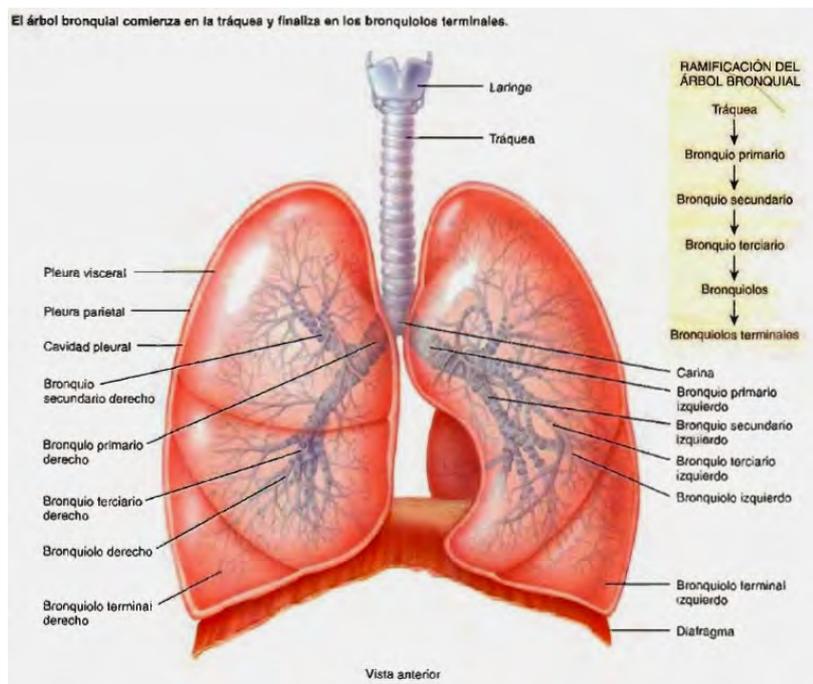
#### 4.1.5. Bleomicina

Es un antibiótico quimioterápico empleado en linfomas, carcinomas de células escamosas, tumores de células germinales, que produce fibrosis pulmonar como principal efecto secundario en humanos. La bleomicina actúa produciendo roturas en la cadena simple y doble del ADN de las células tumorales interrumpiendo el ciclo celular. Esto se produce por la quelación de los iones metales y la producción de

radicales de oxígeno. Esta sobreproducción ROS genera una respuesta inflamatoria pudiendo producir toxicidad pulmonar, activación de fibroblastos y la consecuente fibrosis pulmonar.

#### 4.5. Fisiopatología de la FPI

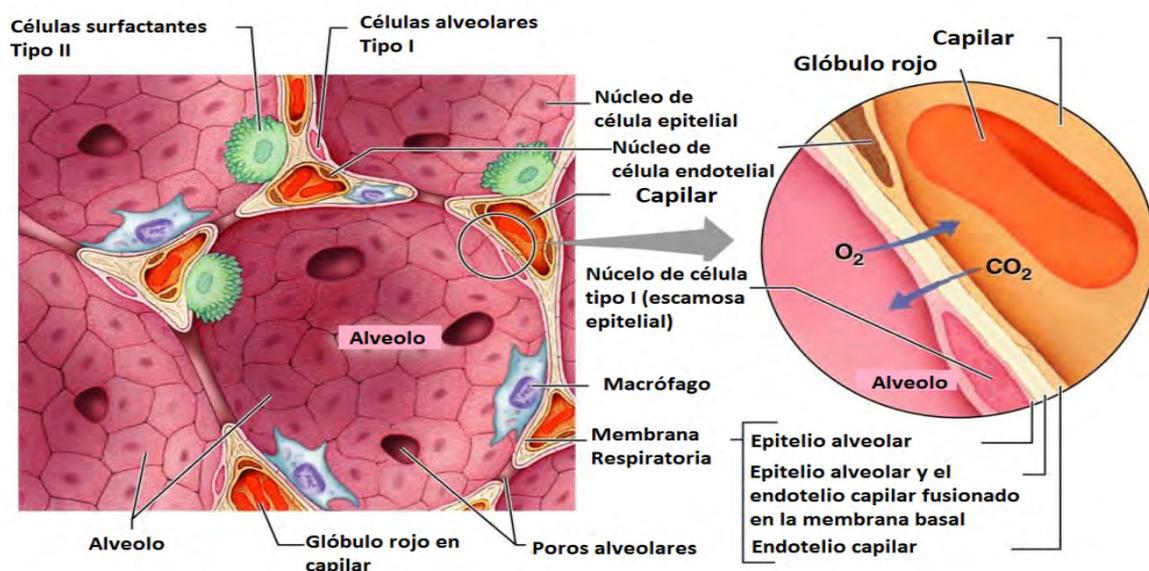
Los pulmones son órganos de vital importancia al proporcionar al oxígeno acceso a la circulación pulmonar y de esta forma distribuirlo a todas las células del organismo. Esto se consigue mediante unas estructuras conocidas como árbol bronquial que sufren ramificaciones hasta derivar en un entramado de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



**Figura 9. Anatomía del pulmón**

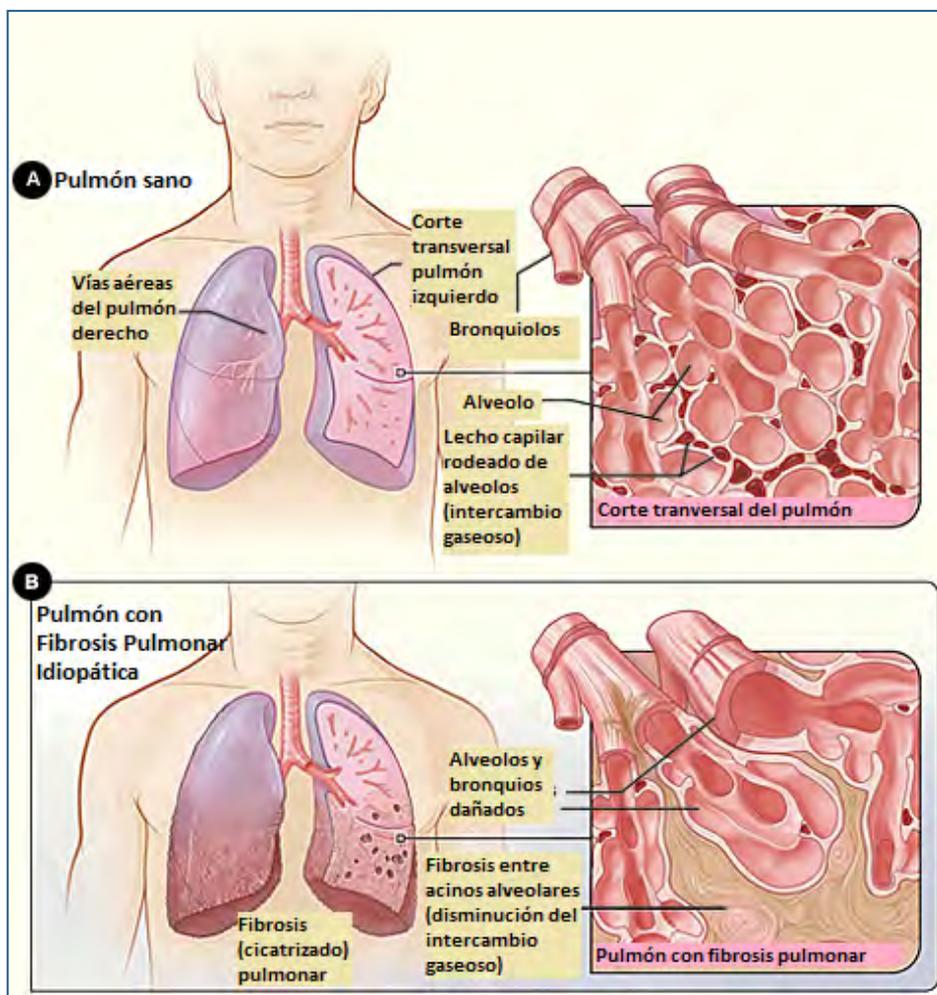
El acino o unidad respiratoria terminal, contiene los alveolos, lugar donde se produce el intercambio gaseoso. Tiene forma esférica y un diámetro de 7mm. Un acino está formado por los bronquiolos respiratorios (procedentes del bronquiolo terminal), que se continúan con los conductos alveolares, e inmediatamente se ramifican y desembocan en los sacos alveolares cuyas paredes están formadas enteramente por alveolos, que constituyen los extremos ciegos de las vías respiratorias (**Figura 9**).

Los alveolos se caracterizan por presentar paredes extremadamente delgadas que permiten el eficiente intercambio gaseoso entre los capilares sanguíneos adyacentes. Las paredes alveolares no son sólidas, están perforadas por numerosos poros de Kohn, que permiten el paso de las bacterias y exudados entre alveolos adyacentes. Estas paredes alveolares están formadas por endotelio capilar, membrana basal y epitelio alveolar. Los capilares pulmonares tienen un diámetro muy pequeño (5 a 7  $\mu\text{m}$ ) y están limitados por el endotelio que descansa sobre la membrana basal. La membrana basal y el tejido intersticial adyacente separan las células endoteliales del revestimiento epitelial alveolar. En estas porciones del septo alveolar, se fusionan las membranas basales del epitelio, mientras que en las porciones más gruesas, están separadas por un espacio intersticial (el intersticio pulmonar) que contiene fibras elásticas, pequeños haces de colágeno, algunas células de tipo fibroblástico, células musculares lisas, células cebadas, linfocitos y unos pocos monocitos. El epitelio alveolar forma una capa continua con dos tipos celulares, los neumocitos tipo I o neumocitos membranosos, células aplanadas, que tapizan el 95% de la superficie celular y alveolar y los neumocitos tipo II o neumocitos granulares, que tienen microvellosidades en su superficie, son de forma cuboidal y sintetizan y secretan un fosfolípido denominado surfactante pulmonar. Estas células tipo II son importantes ya que es el principal tipo celular implicado en la reparación del epitelio alveolar tras la destrucción de los neumocitos tipo I (**Figura 10**).



**Figura 10. Estructura del acino alveolar**

Las estructuras alveolares son extremadamente sensibles a lesiones y su reparación conlleva su posterior cicatrización. Esta cicatrización con la que responde nuestro organismo ante lesiones como tuberculosis o infecciones por hongos se denomina fibrosis. Sin embargo, existen casos de etiología desconocida en los que se desencadena el proceso fibrótico sin control. Si una proporción suficiente del pulmón se cicatriza, puede conducir a un fallo respiratorio. Esta cicatrización progresiva podría deberse a lesiones recurrentes en una región determinada del pulmón, o a un fallo en la reparación del tejido una vez la lesión ha sido reparada. En estos casos la cicatrización se convierte en un proceso descontrolado, carente de regulación (**Figura 11**).

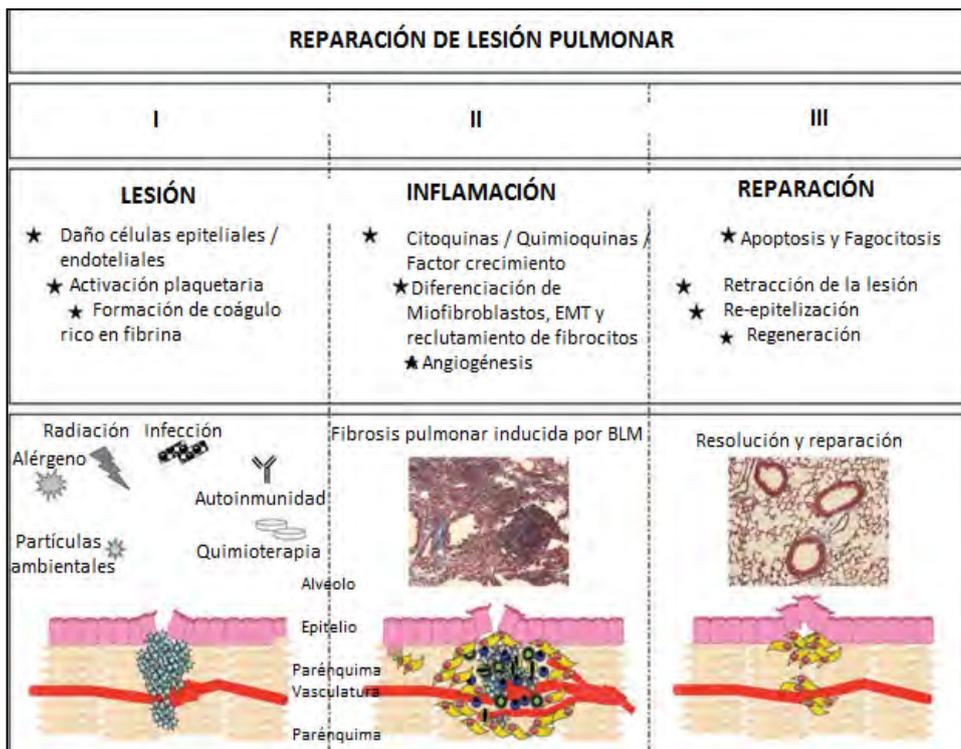


**Figura 11. Anatomía pulmonar de la FPI.** A) Anatomía del pulmón sano. Corte transversal ampliado de los acinos alveolares rodeados de lechos capilares. B) Anatomía de un pulmón con FPI. Corte transversal ampliado de los acinos alveolares con destrucción del parénquima pulmonar por focos fibróticos entre alveolos y disminución del intercambio gaseoso.

#### 4.6. Aspectos macroscópicos de la FPI

El modelo patogénico de la FPI propuesto originalmente se basaba en un proceso derivado de una respuesta inflamatoria ante la lesión del tejido pulmonar. La inefectividad de los fármacos antiinflamatorios e inmunosupresores, la ausencia de patrón histológico propio de la inflamación en tejidos biopsiados y la ausencia de opacidades en vidrio deslustrado en las TCAR obligaron a proponer una nueva hipótesis para explicar la patogenia de la enfermedad (du Bois, 2010).

La FPI comienza con la lesión del endotelio y el epitelio vascular. Cuando se lesiona la membrana basal (MB), se produce hemorragia y extravasación de plasma al tejido pulmonar; la activación plaquetaria y la desgranulación producen liberación de mediadores lipídicos, citoquinas, y factores de crecimiento de la matriz que generan la activación de células epiteliales, endoteliales, fibroblastos/miofibroblastos y leucocitos (Wilson y Wynn, 2009) (**Figura 12**).

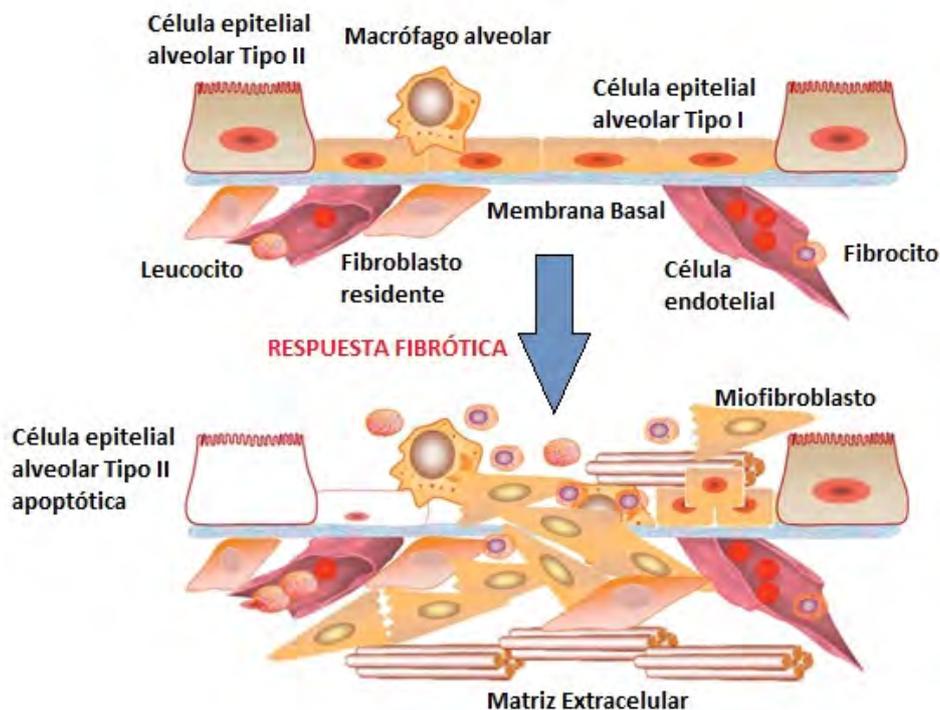


**Figura 12. Fases de reparación de la lesión tisular.**(1) Lesión; muchos agentes pueden causar lesión pulmonar, incluyendo partículas ambientales, alérgenos, agentes infecciosos, quimioterapia y radiación. La lesión de las células epiteliales y endoteliales inician una cascada anti-fibrinolítica, tamponando temporalmente el tejido lesionado. (2) Inflamación; las células fibrocitos circulantes inflamatorios son reclutados en el lugar de la lesión gracias a la liberación de quimioquinas, proporcionando citoquinas activadoras de fibroblastos y factores de crecimiento. La neovascularización proporciona acceso a las áreas dañadas y un aporte de células inflamatorias, antiinflamatorias y fagocíticas. (3) Reparación; los fibroblastos reducen el área lesionada. Las células inflamatorias,  $\alpha$ -SMA y miofibroblastos sufren apoptosis, cesa el depósito de colágeno, las células epiteliales y endoteliales son repuestas y la arquitectura bronquial es restaurada (Loomis-King, Flagerty y Moore, 2013).

Cuando la MB no está afectada y el estímulo de la lesión se elimina, se produce una reparación normal y completa mediante los procesos simultáneos de reabsorción de los depósitos en la matriz extracelular (MEC), y de reepitelización y reendotelización de la barrera alveolo-capilar (Wallace, Fitch, Simpson y Howie, 2007).

Por el contrario, en pacientes con FPI, se producen las siguientes circunstancias: (Strieter, 2005; Strieter, Gomperts y Keane, 2007) **(Figura 13)**:

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



**Figura 13. Alteraciones patológicas implicadas en FPI.** Se cree que la lesión de las células alveolares epiteliales conduce a la apoptosis celular. La pérdida del equilibrio homeostático del pulmón produce la acumulación de fibroblastos y miofibroblastos, así como inflamación crónica que implica la migración de monocitos/macrófagos y fibrocitos. El daño vascular inicia el depósito de matriz extracelular inicial. La hiperplasia de las células endoteliales alveolares se percibe en la lesión fibrótica. Las células mesenquimales pulmonares promueven la fibrosis a través de la secreción de matriz extracelular rica en colágeno tipo 1. La rigidez de la matriz extracelular puede contribuir a la perpetuación de las señales profibróticas hacia la formación de células mesenquimales (Loomis-King, Flaherty y Moore, 2013).

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

- mecanismos inmunológicos e inflamatorios: papel de la inflamación aguda y crónica derivada de la liberación de citoquinas,
- estrés y señalización oxidativa: papel de ROS,
- entorno procoagulante en el pulmón: papel de las proteinasas y sus receptores tisulares (Todd, Luzina y Atamas, 2012).

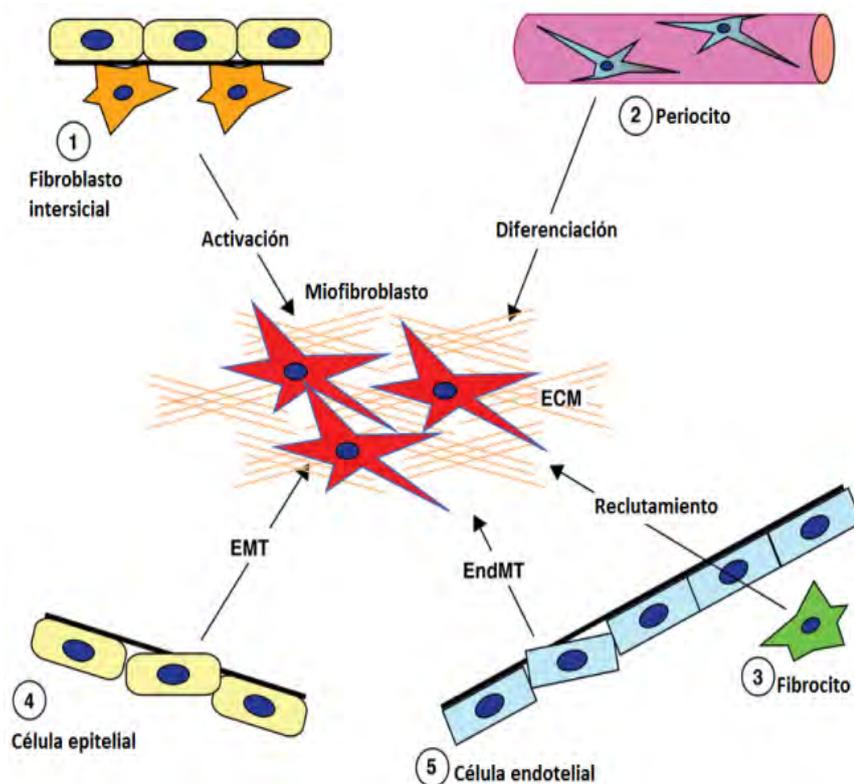
La patogénesis de la FPI se caracteriza por ser una enfermedad en la que las lesiones tisulares no son reparadas. Esta ausencia de reparación del tejido pulmonar puede apreciarse a nivel macroscópico mediante TCAR. La FPI presenta patrón radiológico en vidrio deslustrado, un término radiológico para el patrón difuso con aumento de atenuación observada en la TCAR. Se produce como consecuencia del infiltrado alveolar que excluye parcialmente el aire en los alveolos. La FPI cursa con bronquiectasia, ensanchamiento de los nódulos linfáticos, alteración de la estructura del panal de abeja y opacidades reticulares irregulares que predominan a nivel subpleural, posterior y distal. En las áreas fibróticas observamos un engrosamiento del septo y focos fibróticos que predominan en las regiones paraseptales o subpleurales. Los focos fibróticos son regiones altamente proliferativas de acumulación de miofibroblastos, localizados en las inmediaciones de las células alveolares epiteliales hiperplásicas o apoptóticas o ambas. La sintomatología clínica incluye tos, disnea, crépitos en la inspiración final y disminución del intercambio gaseoso (Fernandez y Eickelberg, 2012).

#### **4.7. Aspectos microscópicos**

La acumulación excesiva de la MEC así como el remodelado de la arquitectura bronquial, son consecuencias de la alteración del equilibrio de dos procesos fisiológicos: la proliferación y apoptosis de los fibroblastos y la acumulación y desintegración de la MEC. Cuando el equilibrio se desplaza hacia la formación de MEC y hacia la proliferación acelerada de fibroblastos o un enlentecimiento de su apoptosis, se produce un acúmulo de la MEC. Se ha observado que los fibrocitos circulantes son células progenitoras mesenquimales que se extravasan al foco de la

lesión tisular, se diferencian a fibroblastos y miofibroblastos, y contribuyen a la generación de MEC durante la fibroproliferación. Los fibrocitos implicados en el foco fibrótico pueden ser residentes del tejido pulmonar o provenir de la circulación sistémica por un proceso de migración celular. Independientemente del origen de la expansión de fibroblastos en los pulmones, el efector común en ambas vías es la formación de miofibroblastos, los cuales presentan propiedades contráctiles similares a las células lisas musculares, y va asociado a la presencia de  $\alpha$  actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) (Todd y col, 2012).

Como posibles orígenes de la activación de miofibroblastos se encuentran las células epiteliales responsables de la transición epitelio-mesenquimal (EMT), células endoteliales responsables de la transición endotelio-mesenquimal (EndoMT), células mesenquimales tales como los fibroblastos o pericitos a través de su proliferación e invasión, o células progenitoras circulantes, vía el reclutamiento, invasión y activación de los fibroblastos (**Figura 14**).



**Figura 14. Posibles fuentes de fibroblastos pulmonares**

El epitelio alveolar se encuentra dañado en aquellos pacientes que sufren la enfermedad. La hiperplasia alveolar epitelial es inducida por la secreción de sustancias por las propias células epiteliales, células inmunológicas y fibroblastos adyacentes. Las células epiteliales alveolares de tipo I son reemplazadas por células epiteliales tipo II, o células cúbicas bronquiolares (Todd y col., 2012). La EMT se produce en presencia de TGF- $\beta$ , el cual induce la transición de células epiteliales tipo II o neumocitos tipo II a estas células con fenotipo mesenquimal, fibroblastos y miofibroblastos, que contribuyen a la fibroproliferación (Willis y col., 2005; Kim y col., 2009).

Recientemente, se ha reconocido la EndoMT como un nuevo tipo de transdiferenciación celular, y ha sido propuesto como otro posible origen de formación de miofibroblastos. La EndoMT es un proceso biológicamente complicado por el que las células endoteliales pierden sus marcadores específicos y adquieren fenotipos mesenquimales o de miofibroblastos para expresar productos propios de las células mesenquimales como  $\alpha$ -SMA y colágeno tipo I (Col-1). Al igual que la EMT, la EndoMT puede ser inducida por TGF- $\beta$  (Piera-Velazquez, Li y Jiménez, 2011).

Los pericitos pulmonares son derivados de las células mesenquimales localizadas en la membrana basal o en el revestimiento perivascular implicadas en la reparación de tejido y en la síntesis de colágeno ( Armulik, Genove y Betsholtz, 2011). Se denominan pericitos a las células CD34+ circulantes derivadas de los miofibroblastos originadas en la médula ósea. Estudios recientes en el mapeo de destinos celulares han determinado que los pericitos son una fuente de activación de miofibroblastos inducidos por TGF- $\beta$  o por Sonic hedgehog (SHH) (Fabian y col., 2012).

La lesión producida en las células epiteliales las hace más vulnerables a la apoptosis, condición fundamental en la patogénesis de la enfermedad que imposibilita la regeneración de la capa celular epitelial. Estudios genéticos sugieren la implicación de determinados genes que codifican para proteína C y proteína A2 surfactante, que presentan la estructura tridimensional incompleta y no pueden ser procesadas adecuadamente por las células. Esto resulta en muerte celular si los mecanismos de reparación no son eficientes. Se han descrito genes implicados en el acortamiento de los telómeros asociados a la fibrosis pulmonar difusa (Alder y col., 2008). Si los telómeros se acortan hasta una longitud crítica, se induce a la muerte celular. El acortamiento de los telómeros se produce tras cada división celular y también está

relacionado con el envejecimiento, obesidad y tabaquismo. Sin embargo, se han observado variaciones en estos genes que codifican para proteínas implicadas en la renovación del acortamientos de los telómeros en casos de fibrosis pulmonar familiar y no familiar (Cronkhite y col., 2008)

#### **4.8. Marcadores moleculares**

El proceso fibrótico se inicia con la formación de un coágulo seguido de la respuesta inflamatoria que implica una vasodilatación local, aumento de la permeabilidad vascular y acumulación de leucocitos y monocitos. El daño epitelial se traduce en la liberación de mediadores profibróticos entre los que encontramos el TGF- $\beta$ , TNF, endotelina 1 (ET-1), citoquinas, metaloproteinasas y mediadores de factor de coagulación de tejidos (Chambers, 2008; Selman y Pardo, 2006.)

Las citoquinas IL-13 y TGF- $\beta$  han sido ampliamente estudiadas en la patogénesis de la FPI por su importante actividad profibrótica y por el reclutamiento y activación de fibroblastos, macrófagos y miofibroblastos. Se ha identificado a IL-13 como una citoquina clave en la respuesta fibrogénica, independientemente de la expresión de TGF- $\beta$ . La IL-13 puede desencadenar la diferenciación de fibroblastos en  $\alpha$ -SMA, expresando miofibroblastos y células productoras de factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Es responsable de la fibrosis subepitelial acompañada de una inflamación eosinofílica y de producción de moco (Zhu y col., 1999). En modelos animales de fibrosis pulmonar se ha visto como IL-13 es capaz de inducir al activador de plasminógeno MMP-9, potenciando la liberación de TGF- $\beta$  activo y la correspondiente fibrosis. Existe una respuesta coordinada y potencialmente combinada del efecto del IL-13 y TGF- $\beta$  en la activación de fibroblastos y el depósito de colágeno (Wilson y Wynn , 2009)

El TGF- $\beta$  se sintetiza en la médula ósea y su actividad se regula a nivel post-transcripcional por la proteína asociada a latencia que la mantiene inactiva. Se encuentra encapsulado en dos proteínas y requiere una activación proteolítica o un cambio conformacional para su activación. Una vez se activa, el TGF- $\beta$  es increíblemente pleiotrópica con propiedades quimiotácticas e inductoras del crecimiento celular, estimula la proliferación de fibroblastos y la síntesis de proteínas de la MEC y suprime la respuesta de las células T (Strutz y col, 2001). Los fibroblastos expresan tres tipos de receptores de TGF- $\beta$  en su superficie. Al unirse, los receptores

tipo I y tipo II se asocian en complejos y activan al receptor tipo I. El tipo III también conocido como receptor accesorio, facilita las interacciones entre TGF- $\beta$  y los receptores de señalización. La fosforilación del receptor I resulta en la activación de la cascada de transducción de señales intracelulares que implican una serie de proteínas entre las que cabe destacar tres tipos de proteínas pertenecientes a la familia de moduladores de transcripción denominados Smad. Una vez activada, Smad se transloca al núcleo dónde interactúa y facilita la activación de los genes implicados en la activación transcripcional de TGF- $\beta$  (Liu y col., 1996). La activación de la ruta TGF- $\beta$ /Smad2/3 está implicada en la EMT. Muchos otros mediadores son capaces de activar a Smad2 y Smad3 independientemente de TGF- $\beta$ , ya que actúan como integradores de señales e interactúan con otras vías de señalización como las MAPK (Protein quinasas activadas por mitógenos). Estudios realizados en fibrosis renal muestra la importancia de la interacción en la ruta MAPK-Smad en la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) mediante la activación de Smad2/3, en ausencia de TGF- $\beta$  (Lan, 2011).

La sobreexpresión de TGF- $\beta$  está relacionada con el desarrollo de fibrosis intersticial y pleural severa que cursa con un exceso del depósito de colágeno, proteínas de MEC, fibronectina y elastina, y la presencia de miofibroblastos. A diferencia con IL-13, TGF- $\beta$  no recluta células inflamatorias ni potencia la secreción de moco por el pulmón, lo que sugiere que puede inducir fibrosis directamente en ausencia de inflamación significativa (Wilson y Wynn, 2009).

Durante la fase inflamatoria de la FPI, las células estromales y células que pertenecen al linaje de los macrófagos y monocitos liberan citoquinas inflamatorias de la familia IL-6. Se cree que esta familia de citoquinas es responsable de la potenciación de la respuesta fibrótica a través de la proliferación de fibroblastos asociados a la señalización de Erk1/2 (Knight, Anderson, Moodley, Mutsaers, 2003) y a la inducción de la respuesta fibrótica mediada por ligandos de la familia TGF- $\beta$ . La IL-6 se caracteriza por presentar la subunidad de receptor gp130, implicada en la fibrosis pulmonar. Los niveles de IL-6 se han visto sobreexpresados en el LBA de pacientes con FPI (Mozaffarian A y col., 2008) .

El CTGF es liberado por células epiteliales, endoteliales y mesenquimales junto con la secreción de TGF- $\beta$ , con el particular rol de estimular la producción de MEC de fibroblastos y la diferenciación de miofibroblastos, y estimular el remodelado vascular. El remodelado vascular conduce a una hipertensión local que induce la expresión de

CTGF por retroalimentación positiva que agrava el remodelado vascular (Lipson, Wong, Teng y Sponget, 2012). La liberación de CTGF es inducida por otros mediadores profibróticos tales como la trombina. Se ha observado como su expresión se ve aumentada tanto en tejido pulmonar fibrótico como en LBA de pacientes con FPI, y se localiza en el epitelio alveolar tipo II proliferativo y en los fibroblastos activados (Scotton y Chamberts, 2007). Estudios realizados en ratones knockout para Smad3, han visto que estos son resistentes a la fibrosis inducida por TGF- $\beta$ , y dicha resistencia es asociada al fallo en la inducción de la expresión génica de CTGF. La sobreexpresión de CTGF en ratones resulta en la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y en un aumento de la concentración de colágeno durante 28 días, lo que sugiere que el CTGF es capaz de inducir pero no mantener la enfermedad pulmonar (Maher, 2012).

La familia de las endotelinas está compuesta por tres péptidos vasoactivos y dos receptores de unión, ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>. En los años 90 se identificó el papel de las endotelinas en la inducción de la quimiotaxis y la proliferación de fibroblastos en los vasos pulmonares (Peacock y col., 1992). La ET-1 se expresa mayoritariamente en el pulmón, en células endoteliales, epiteliales, células del músculo liso, células Clara y macrófagos alveolares. En fibrosis pulmonar la ET-1 se encuentra sobreexpresada en células alveolares tipo II. Su regulación se ve sobreexpresada por sustancias como la angiotensina II, vasopresina, trombina y TGF- $\beta$ . El papel profibrótico atribuido a la ET-1 proviene de su habilidad para inducir la proliferación y activación de fibroblastos, regular el tono y el remodelado vascular, y regular la inflamación. Además, también posee un papel importante como mediador en la permeabilidad vascular en lesiones pulmonares (Park, Saleh, Giaid y Michel, 1997).

Dentro de los subtipos de colágeno, cabe destacar el colágeno tipo I y tipo III tanto el pulmón sano como en la fisiopatología de la FPI. El precursor del colágeno es una proteína fibrilar soluble que se asocia para formar una estructura insoluble de triple hélice, que resiste al ataque de la mayoría de las enzimas (Loffek, Schilling y Franzke y col., 2011). Existen evidencias de la sobreexpresión de colágeno tipo I y tipo III en pacientes con FPI. Ambos tipos de procolágeno se han visto aumentados en LBA pero no en suero de los pacientes estudiados. El colágeno tipo I está presente en los estadios avanzados de la enfermedad, mientras que el tipo III predomina en el engrosamiento del septo alveolar en el intersticio. El procolágeno tipo I se expresa en los focos fibróticos sintetizados de novo, y el tipo III se expresa a nivel extracelular, debajo del epitelio alveolar metaplásico (Raghu, Striker, Hudson y Striker, 1985).

#### **4.9. Fibrosis pulmonar idiopática y cancer de pulmón**

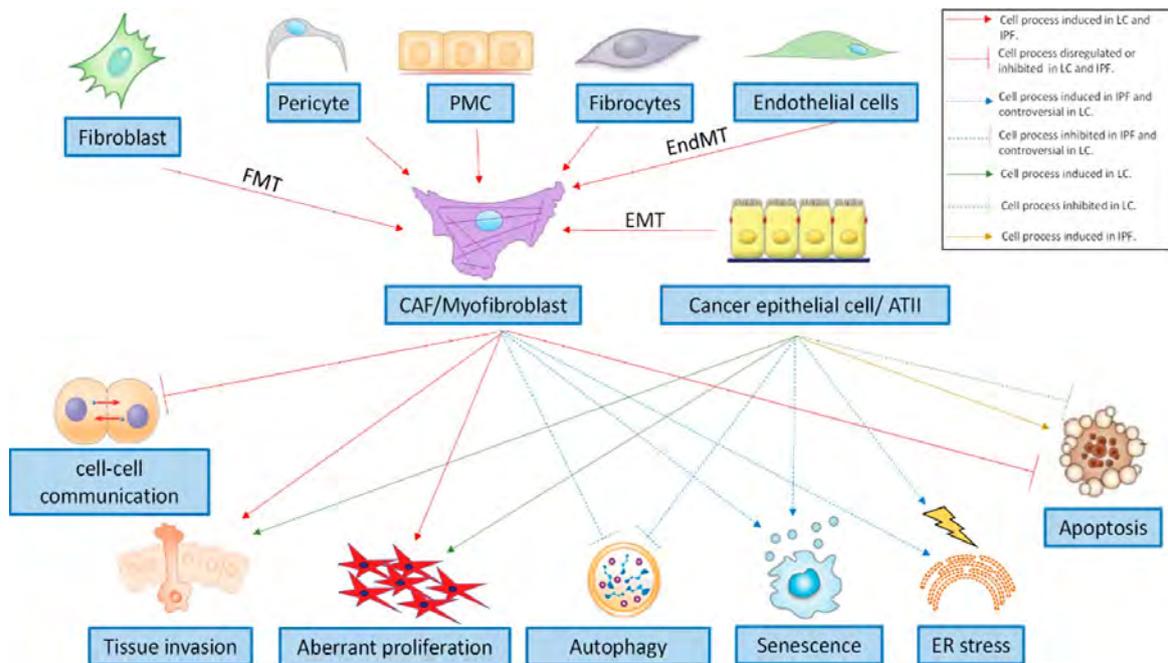
La prevalencia de CP en pacientes con FPI varía entre 20% y 31,2%. Aparentemente la fibrosis pulmonar es un factor de riesgo para el CP no asociado al tabaco y viceversa. En la población general, el tipo predominante de CP es el de células no pequeñas (CPCNP). Del mismo modo, CPCNP es el tipo predominante de CP en pacientes con CP y FPI (Dela Cruz, Tanoue y Matthay, 2011). Recientemente, la mayoría de los estudios han demostrado que el carcinoma de células escamosas (CCE) es el tipo más frecuente de CP en pacientes con FPI, mientras que el adenocarcinoma es el segundo más frecuente. Además, también se han notificado algunos casos aislados de carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP). De manera similar a las lesiones fibróticas, los CP generalmente se encuentran más frecuentemente en el área periférica de los pulmones en los pacientes con FPI, es decir, en los lóbulos inferiores y están asociados con lesiones de panal de miel. desarrollo a partir de áreas de nido de abeja o en la frontera entre panal y áreas no fibróticas y metaplasia epitelial. En general, la metaplasia escamosa, pero no la metaplasia de células cúbicas o la metaplasia de células bronquiales, se han observado con mayor frecuencia en pacientes con CP-FPI que en pacientes con FPI sin CP, se especula que podría reflejar una susceptibilidad constitucional de los pacientes con FPI de desarrollar CP (Ballester y col., 2019a).

##### **4.9.1. Tipos de células y procesos celulares involucrados en el CP asociado con FPI**

La FPI se caracteriza por un exceso de miofibroblastos que se activan de forma persistente en los pulmones fibróticos (Scotton y Chambers, 2007). Los miofibroblastos activados tienen forma de estrella o huso, y se caracterizan por la secreción de los componentes de la MEC (una característica compartida con los fibroblastos), como el colágeno tipo I, y por la formación de un aparato contráctil (una característica compartida con células del músculo liso de las vías respiratorias), como los microfilamentos de  $\alpha$ -SMA (Singh y Hall, 2008). En los pulmones con FPI, los miofibroblastos tienen fenotipos heterogéneos (**Figura 14**). El concepto clásico es que la lesión tisular induce la activación de los fibroblastos residentes para proliferar y expresar los constituyentes de las fibras de MEC y  $\alpha$ -SMA. Una teoría contemporánea es que la lesión tisular en presencia de TGF- $\beta$  induce la transición de células epiteliales a mesenquimatosas. En detalle, la EMT es parte de una forma de curación de heridas no disminuida en la que las células alveolares tipo II (ATII) pueden servir

como fuente para el aumento de la acumulación similar a la de los miofibroblastos que eventualmente conduce a la destrucción de órganos si la lesión inflamatoria primaria que provocó la curación de la herida no se elimina ni atenúa. Otra teoría contemporánea de la activación de los miofibroblastos es que los fibrocitos circulantes que se originan en la médula ósea son células progenitoras mesenquimáticas que se alojan y extravasan en sitios de lesión tisular, y se diferencian en el fenotipo similar a miofibroblastos en respuesta al TGF- $\beta$  y endotelina 1. Se ha sugerido que la transición mesenquimatoso de la célula endotelial arterial pulmonar es otra fuente de miofibroblastos que potencialmente contribuyen a la fibrosis pulmonar y la hipertensión pulmonar y a menudo se asocia con la FPI, lo que augura un pronóstico desfavorable. Finalmente, hay dos teorías emergentes que consideran las células mesoteliales pleurales o los pericitos pulmonares como fuentes significativas de miofibroblastos de pulmón en la FPI (Ballester y col., 2019b).

De manera similar a la FPI, los fibroblastos asociados con el cáncer (FAC) también son actores importantes en el CP porque exhiben características mesenquimales y tienen fenotipos heterogéneos. Se cree que los fibroblastos pulmonares que rodean la neoplasia maligna son los primeros en responder a la lesión que crea el tumor. Las células epiteliales residentes, en general las células epiteliales bronquiales, también pueden someterse a una EMT parcial y posiblemente reversible durante los primeros pasos de la carcinogénesis, la invasión del cáncer y la metástasis (Konigsoff, 2011). Asimismo, los fibrocitos reclutados de la circulación periférica también se han sugerido como una fuente potencial de FAC (Shiga y col., 2015). También se ha observado que hasta el 40% de los FAC surgen como consecuencia de EndoMT en dos modelos diferentes de cáncer murino, lo que sugiere que EndoMT puede desempeñar un papel en la formación de brotes angiogénicos de tumores en tejidos adyacentes (Zeisberg Potenta, Xie, Zeisberg y Kalluri, 2007). En el entorno del tumor, los pericitos vasculares también se han asociado con la vasculatura del tumor. Se ha demostrado que los pericitos que se desprenden de la microvasculatura tumoral se diferencian en fibroblastos estromales a través de la acción del factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (FCDP-BB), que contribuye significativamente a la invasión tumoral y la metástasis (Hosaka y col., 2016). Finalmente, las células mesoteliales pleurales también se hipotetizan como una fuente de FAC, donde se ha identificado un linaje precursor mesotelial capaz de generar clones fibroblastos en los pulmones, riñones, hígado e intestino (Rinkevich y col., 2012) (**Figura 15**).



**Figura 15. Tipos de células y procesos celulares asociados al CP y la FPI**

#### 4.9.2. Procesos celulares comunes en el CP asociado a fibrosis pulmonar

##### 4.9.2.1. Apoptosis y autofagia

Existen evidencias que indican el papel prominente del estrés del retículo endoplásmico en la FPI. Con respecto al papel del estrés del retículo endoplásmico en la tumorigénesis, es controvertido, sin embargo, pruebas recientes muestran que el estrés del RE puede atenuar la senescencia y promover la tumorigénesis (Zhu y col., 2014). Así, los miofibroblastos y las células cancerosas de FPI escapan de la apoptosis (Hanahan y Weinberg, 2011).

También existen evidencias de que la autofagia es defectuosa en la FPI (Patel y col., 2012; Sosulski y col., 2015), lo que promueve la diferenciación del fibroblasto pulmonar en miofibroblastos mediante la producción excesiva de MEC (Sosulski y col., 2015) y la resistencia del fibroblasto a la apoptosis (Marino, Niso-Santano, Baehrecke y Kroemer, 2014). En el CP, la autofagia funciona como un arma de doble filo porque suprime la tumorigénesis en un número limitado de contextos y la facilita en la mayoría de los otros (White, 2015). De hecho, se ha observado que la autofagia puede promover o inhibir la apoptosis en diferentes contextos celulares dentro de la misma población de células tumorales.

##### 4.9.2.2. Proliferación celular

La evidencia apoya firmemente la activación persistente de vías de señalización proliferativas en FPI. De hecho, los miofibroblastos mantienen su propio crecimiento a través de la producción autocrina de TGF- $\beta$ 1 y pierden en parte su capacidad para producir prostaglandina E2 antifibrótica (PGE2). Además, muestran una falta de respuesta a la actividad inhibitoria de PGE2, y a otras señales antiproliferativas (Moore y col., 2005).

Los receptores para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el factor de crecimiento liberado por endotelial vascular y el factor de crecimiento de fibroblastos también se han implicado recientemente en la señalización de proliferación sostenida de los fibroblastos pulmonares (Grimminger, Gunther y Vancheri, 2015). El papel de la proliferación excesiva de fibroblastos como mecanismo patógeno de la FPI no está claro, por el contrario, la proliferación aberrante de células cancerosas y la señalización proliferativa sostenida se han descrito como "posiblemente el rasgo más fundamental de las células cancerosas" (Hanahan y Weinberg, 2011).

#### *4.9.2.3. Comunicaciones célula-célula*

Los canales intercelulares formados por conexinas son esenciales para la sincronización de la proliferación celular y la reparación del tejido (Losa, Chanson y Crespín, 2011) En particular, la expresión de conexina 43 (Cx43) se considera crucial en la comunicación de fibroblasto a fibroblasto. En los fibroblastos de FPI, la expresión de Cx43 está fuertemente regulada a la baja, lo que lleva a una pérdida de control proliferativo (Trovato-Salinaro y col., 2006). De manera similar, las líneas celulares de cáncer de carcinoma de pulmón humano y de ratón tienen niveles bajos o una ausencia de expresión de Cx43 (Cesen-Cummings, Fernstrom, Malkinson y Ruch, 1998), lo que resulta en una comunicación reducida de célula a célula; esto puede explicar tanto la liberación de células del control de inhibición por contacto como la proliferación descontrolada que caracteriza a esta enfermedad.

#### *4.9.2.4. Senectud*

Los análisis de los tipos de células en los pulmones tanto de la FPI humana como del modelo de ratón expuesto a bleomicina han demostrado que los fibroblastos y las células epiteliales adquieren identidades senescentes (Schafer y col., 2017). La senescencia parece ser un fenotipo central que promueve la fibrosis pulmonar mediante el aumento de la producción de un complejo fenotipo secretor asociado a la senescencia basado en factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas y

metaloproteinasas de matriz, así como una resistencia a la apoptosis adquirida en fibroblastos de FPI (Selman y Pardo, 2014) .

#### 4.9.3. Invasión del tejido

Los fibroblastos pulmonares de FPI se caracterizan por su capacidad para invadir a través de la membrana basal y la MEC por la acción de las metaloproteinasas (Lovgren y col., 2011). A diferencia de los cánceres que pueden diseminarse en largas distancias porque adquieren mecanismos invasivos adicionales, los fibroblastos de pulmón fibróticos están restringidos a la invasión local. La capacidad de las células cancerosas para infiltrarse en el tejido circundante está estrictamente relacionada con la expresión de laminina y fascin (Pelosi y col., 2003). Curiosamente, en la FPI, se ha demostrado que las células basales bronquiales que rodean los focos de fibroblastos expresan grandes cantidades de estas proteínas, lo que induce la motilidad celular y la invasión de los miofibroblastos.

#### 4.9.4. Inflamación

El papel de la inflamación en la FPI es controvertido, aunque las evidencias muestra la existencia de un fenotipo predominante de macrófagos asociados a la fibrosis. Siendo de un fenotipo M2 de macrófagos asociados a fibrosis (Zhang y col., 2018) que facilitan la producción mejorada de citoquinas profibróticas y metaloproteinasas de matriz (Ballinger y col., 2015). Al igual que los macrófagos asociados a fibrosis FAM, los macrófagos asociados a tumores también muestran un fenotipo M2 y apoyan el crecimiento tumoral a través de su capacidad para promover la angiogénesis, activar las células mesenquimales, remodelar la matriz y suprimir las respuestas de las células T efectoras (Noy y Pollard, 2014). Por lo tanto, los macrófagos M2 podrían considerarse efectores clave en el desarrollo de CP asociado a FPI.

#### 4.9.5. Moléculas fibrogénicas principales y vías de transducción de señales que participan en cáncer de pulmón asociado a fibrosis pulmonar.

##### 4.9.5.1. Factores de crecimiento

El TGF- $\beta$  es un importante factor de crecimiento profibrótico y, a menudo, se sobreexpresa crónicamente en el cáncer y la fibrosis (Akhurst y Hata, 2012). TGF- $\beta$  puede ser activado por la integrina  $\alpha$ V $\beta$ 6 y, en FPI, TGF- $\beta$ 1 media la fibrogénesis por acción antiproliferativa y apoptosis en células epiteliales alveolares o por estimulación

de la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, síntesis de proteínas de la MEC e inhibición de la degradación de la MEC (O’Riordan, Smith y Raghu, 2015). TGF- $\beta$  también induce la producción de factores de crecimiento fibrogénicos o angiogénicos y provoca fuertemente EMT y EndoMT. En las primeras etapas de la patogénesis del cáncer, el TGF- $\beta$  actúa como un supresor de tumores porque inhibe el crecimiento de muchos tipos de células y retrasa la aparición de tumores primarios. Sin embargo, después de la aparición de ellos, el TGF- $\beta$  promueve la progresión del tumor, porque puede inducir EMT y EndoMT, y suprime la vigilancia inmunológica. Por lo tanto, durante la progresión del tumor, el TGF- $\beta$  desencadena la formación de metástasis pulmonares espontáneas.

Los ligandos del receptor de la tirosina quinasa, como el PDGF, el factor de crecimiento del endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), se expresan anormalmente en el CP y la FPI (Grimminger y col., 2015). En la FPI, el PDGF desempeña un papel importante en la inducción de la secreción de componentes de la MEC y factores de crecimiento en los fibroblastos (Hetzl, Bachem, Anders, Trischler y Faehling, 2005). También promueve la proliferación de fibroblastos y recluta fibrocitos al pulmón (Noskovicova, Petrek, Eickelberg y Heinzemann, 2015). Además, TGF- $\beta$ 1, FGF y el TNF- $\alpha$ , exhiben actividad profibrótica dependiente de PDGF (Battegay, Raines, Colbert y Ross, 1995). La señalización de PDGF también es importante para el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la linfangiogénesis en el cáncer (Noskovicova y col., 2015).

Otro factor de crecimiento fibrogénico importante en el CP es el CTGF. En FPI, CTGF induce la proliferación de fibroblastos y la deposición de la MEC. Por el contrario, se ha observado que CTGF inhibe la metástasis y la invasión del adenocarcinoma pulmonar humano (Chang y col., 2004).

#### 4.9.5.2. *Ácido Lisofosfatídico (LPA)*

LPA, es un mediador profibrótico con actividad proinflamatoria, es liberado por las plaquetas durante la lesión epitelial. La producción extracelular de LPA es catalizada por autotaxina y regulada adicionalmente por fosfolípidos fosfatasa. Los pacientes con FPI han aumentado los niveles de LPA en su líquido de lavado broncoalveolar y recientemente, se ha demostrado que la señalización de LPA media tanto el reclutamiento de fibroblastos como la fuga vascular inducida por la lesión pulmonar en un modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (Funke, Zhao, Xu, Chun y Tager, 2012; Tager y col., 2008).

#### 4.9.5.3. *Citoquinas y quimiocinas*

La lesión epitelial causa un desequilibrio en la expresión de citoquinas T-helper tipo 1 (Th1) / tipo 2 (Th2), lo que resulta en una respuesta Th2 más fuerte. En particular, existe evidencia de que la interleucina 13 (IL-13) (Zhu y col., 1999) desempeña un papel dominante en la patogénesis de la fibrosis en los pulmones de los pacientes con FPI (Hancock, Armstrong, Gama y Millar, 1998). IL-13 desencadena la transformación de los fibroblastos en miofibroblastos a través de las vías dependientes e independientes de TGF- $\beta$ , mientras que también induce apoptosis epitelial (Lee, Kang, Homer, Chupp y Elias, 2006). Con respecto a la IL-13, un estudio reciente observó el nivel más alto de expresión de IL-13 en el CP subtipo de células escamosas, seguido del subtipo adenocarcinoma (Pastuszak-Levandoska y col., 2018). Además, se ha demostrado una asociación clara entre la sobreexpresión de la subunidad alfa-2 del receptor de IL-13 y la escasa supervivencia en pacientes con el subtipo de células no microcítica resecaado (Xie, Wu, Zhang y He, 2015). Existen otras citoquinas profibróticas además de la IL-13 que también están asociadas con la FPI. Por ejemplo, se ha informado que el ligando de quimiocinas 2 (CCL2) está presente en el LBA de pacientes con FPI en concentraciones significativas. En FPI, se ha demostrado que CCL2 induce la diferenciación de células T en desarrollo en linfocitos tipo 2 de tipo (Gu y col., 2000), y estimula la síntesis de colágeno y la expresión de TGF- $\beta$  en fibroblastos de pulmón (Chakraborty, Chopra, Ambi, Dastidar y Ray, 2014).

#### 4.9.5.4. *Especies reactivas de oxígeno (ROS)*

La producción de ROS por las células ATII da como resultado un estrés oxidativo, que induce la apoptosis de las células epiteliales, activa las vías de señalización intracelular, y regula al alza la síntesis de citoquinas profibróticas que en última instancia conduce a lesiones tisulares y fibrosis (Vancheri y col., 2010). En este contexto, se publicó sobre la regulación positiva de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) en fibroblastos pulmonares y otras células relevantes en la FPI. De la misma manera, se ha informado que NOX4 se sobreexpresa en tumores de células no microcíticas, lo que contribuye a la proliferación celular y la metástasis (Zhang y col., 2014). Además, después de la sobreproducción de ROS, las alteraciones en los patrones de metilación del ADN y las modificaciones específicas de las histonas llevan a una expresión génica aberrante, y posiblemente desencadenan el proceso de múltiples etapas de la carcinogénesis (Vancheri y col., 2010). Además, también se ha informado que las moléculas antioxidantes que mitigan el estrés oxidativo, como el Nrf2, están desreguladas en FPI y/o CP.

#### 4.9.5.5. *Mucinas*

Se ha encontrado una sobreexpresión significativa de la proteína Mucina 5B (Muc5B) secretada en los pulmones de FPI y se plantea la hipótesis de que el exceso de Muc5B perjudica la defensa de la mucosa del huésped; a su vez, esto puede interferir con la reparación alveolar y conducir al desarrollo de neumonía intersticial idiopática (Seibold y col., 2011). En este contexto, la expresión de MUC5B se ha asociado con un alto riesgo de metástasis a distancia en pacientes con CPCNP y un peor pronóstico en pacientes con adenocarcinoma (Nagashio y col., 2015).

También se ha observado la sobreexpresión de las mucinas transmembrana, MUC1 (Ballester y col., 2017; Ballester y col., 2019b), que pueden participar en los procesos moleculares que conducen al desarrollo de la fibrosis pulmonar. Además, la región extracelular de Muc1 contiene el epítipo KL-6, que se considera un biomarcador útil para evaluar la actividad de la enfermedad y predecir los resultados clínicos en la FPI (Ishikawa, Hattori, Yokoyama y Kohno, 2012). De manera similar, estas mucinas transmembrana se han considerado previamente como proteínas clínicamente relevantes que se sobreexpresan aberrantemente en la carcinogénesis pulmonar (Bafna, Kaur y Batra, 2010). De hecho, Muc1 es un objetivo en varios ensayos preclínicos y clínicos para el tratamiento del cáncer (Stroopinsky y col., 2018). Al mismo tiempo, existe evidencia de que la galectina 3 es un objetivo prometedor para la FPI (Lederer y Martínez, 2018) porque tiene una acción profibrótica que está mediada en parte por la unión a Muc1 (Ramasamy y col., 2007).

#### 4.9.6. Vías embriológicas

También hay evidencia de que algunas vías embrionarias se reactivan o se desregulan en las enfermedades fibróticas. Por ejemplo, la vía Wnt /  $\beta$ -catenina se sobreexpresa en el tejido pulmonar de la FPI (Chilosi y col., 2003) y los pacientes con CP). Esta vía regula la expresión de las moléculas involucradas en la invasión tisular, como la matrilisina, la laminina y la ciclina D1, que induce el proceso de EMT. Lo más importante es que esta vía está involucrada en las relaciones cruzadas con TGF- $\beta$  biológicamente relevantes (Chilosi y col., 2003).

La vía de Sonic hedgehog (SHH) también se activa de forma anómala en la FPI, principalmente en las células epiteliales (Coon, Roberts, Loscertales y Kradin, 2006). La sobreexpresión de la vía shh promueve una mayor susceptibilidad a la apoptosis de células epiteliales y una mayor resistencia a la apoptosis de fibroblastos (Moshai y col., 2014). Esta vía también se reactiva en la etapa temprana de la oncogénesis por las células del cáncer y conduce a la acción paracrina en otras células tumorales, lo que resulta en el crecimiento del tumor, la diseminación del tumor y la EMT. En el CP, la

reactivación de la vía SHH está involucrada en el desarrollo de resistencia a todos los tratamientos principales del CP (Giroux-Leprieur, Costantini, Ding y He, 2018).

Finalmente, la vía de señalización de Notch también se reactiva en las células alveolares, induce la expresión de  $\alpha$ -SMA en los fibroblastos y media en la EMT que se produce en ellas. La expresión anormal de los miembros de la vía de señalización de Notch es un evento relativamente frecuente en pacientes con CPCNP. Igualmente se ha demostrado que los miembros de la vía de señalización de Notch pueden ser biomarcadores potenciales para la predicción de la progresión y pronóstico de este tipo de pacientes (Ye y col., 2013). Además, la señalización de Notch promueve la proliferación de células e inhibe la apoptosis de las células en el cáncer de células grandes (Zou y col., 2018).

#### 4.9.7. Vía PI3K / AKT / mTOR

La fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) / proteína quinasa B (AKT) / mamífero vía dependiente de la rapamicina (mTOR) está disregulada en las enfermedades fibroproliferativas, como la fibrosis pulmonar (Lawrence y col., 2018). De hecho, la sobreexpresión de la isoforma p110 $\gamma$  de clase I en homogeneizados de pulmón se produce en pacientes con FPI (Conte y col., 2013), y se ha demostrado que activa la señalización de varios factores de crecimiento profibróticos clave implicados en la FPI, incluidos el PDGF y el TGF- $\beta$ 1 (Horowitz y col., 2004), así como proliferación anormal de células basales epiteliales y proliferación y diferenciación de fibroblastos inducida por TGF- $\beta$  (Conte y col., 2011). Además, se ha observado que la supresión de la fosfatasa y el homólogo a la tensina media la resistencia mediada por la matriz a la apoptosis (Horowitz y col., 2004). La fosfatasa y el homólogo de la tensina son reguladores negativos de PI3K que a su vez activan el AKT. La desregulación de la vía PI3K / AKT / mTOR también está involucrada en el CPCNP y se ha asociado con tumores de alto grado y enfermedad avanzada. Además, las anomalías en esta vía son más comunes en CCE que en adenocarcinoma (Fumarola y col., 2014).

#### 4.9.8. Alteraciones genéticas y epigenéticas en el CP asociadas a fibrosis pulmonar

##### 4.9.8.1. Alteraciones genéticas

La mayoría de los pacientes con FPI que tienen antecedentes de agrupamiento familiar de neumonía intersticial familiar muestran mutaciones en los genes que codifican la proteína C asociada a surfactante, la proteína A2 asociada a surfactante, los componentes de telomerasa (TERT y TERC), y genes asociados con la biología de

los telómeros, tales como la nucleasa de la difeneasa de la ribonucleasa específica de poli (a) y el regulador de la elongación de las telómeros helicasa 1. Además, varias variantes comunes en TERT, regiones genómicas cercanas a TERC, pliegue de unión a oligonucleótido que contiene 1 (OBFC1), RTEL1, PARN y proteína de interacción de peaje (TOLLIP), se han asociado con un riesgo esporádico de desarrollar FPI. Sin embargo, el factor de riesgo genético más importante para la FPI esporádica es una variante común (rs35705950) en la región promotora del gen MUC5B, aunque también se asocia con fibrosis pulmonar familiar (Tsakiri, y col., 2007; Fingerlin y col., 2013; Noth y col., 2013; Van Moorsel y col., 2015; Stuart y col., 2015).

El desarrollo del CP es el resultado de una acumulación gradual de múltiples mutaciones adquiridas de genes supresores de tumores o candidatos, y la sobreexpresión y mutación de los oncogenes (**Tabla 3**). En este contexto, se han encontrado múltiples mutaciones en el gen P53 durante la etapa temprana del carcinoma bronquial (Bennett y col., 1993). También se han detectado alteraciones frecuentes del gen P53 en lesiones epiteliales de pacientes con FPI (Takahashi y col., 2002) y en metaplasia escamosa, distribuidas en la zona periférica del área fibrótica en pacientes con FPI (Kawasaki y col., 2001). Del mismo modo, la aberración y la pérdida de la función de la tríada de histidina frágil (FHIT) del gen supresor de tumores candidato se ha indicado en CPCNP, así como en lesiones de FPI. Además, la pérdida alélica del gen FHIT se ha observado con mayor frecuencia entre las metaplasias y las muestras de epitelio bronquiolar obtenidas de pacientes con CP y FPI que de pacientes con FPI sin CP. Sin embargo, se ha observado que la frecuencia de expresión de la proteína Ras en las células alveolares tipo II es significativamente mayor en los tejidos pulmonares de los pacientes con CP y FPI en comparación con los tejidos pulmonares de los pacientes con FPI que no tuvieron CP. Además, se detectó una mutación puntual específica en el codón 12 del gen KRAS en pacientes con CP y FPI (Takahashi y col., 2002). Curiosamente, esta mutación no se ha identificado entre las numerosas mutaciones KRAS observadas en el tejido del CP (Karachaliou y col., 2013). Además, se ha observado una prevalencia significativamente mayor de mutaciones BRAF en CP asociado a FPI que con CP solo, con una distribución igual entre los subtipos adenocarcinoma y CCE. Por todo ello, se puede sugerir que estas mutaciones somáticas en los genes supresores de tumores y los oncogenes, así como la sobreexpresión del oncogén, predisponen a los pacientes con FPI a desarrollar CP.

Recientemente se ha indicado que algunas mutaciones de la línea germinal que predisponen a los pacientes a desarrollar FPI, también los predisponen a desarrollar CP. De hecho, se han identificado dos mutaciones missense heterocigotas y una mutación missense heterocigótica en SFTPA2 y SFTPA1 respectivamente (Wang y col., 2009; Nathan y col., 2016), en familias con CP y FPI. Aunque el papel del estrés en la tumorigénesis es controvertido, la evidencia reciente demuestra que el estrés puede atenuar la senescencia y promover la tumorigénesis podría explicar la co-ocurrencia de CP (subtipo histológico adenocarcinoma) y la fibrosis pulmonar en familias con SFTPA1 / 2 mutación (Zhu y co., 2014) ]. También se han identificado otras dos mutaciones de la línea germinal en TERT (rs2736100) y CDKN1A (rs2395655) en varios pacientes con CP y FPI (Hwang y col., 2018). Estas mutaciones afectan la función de la telomerasa y afectan la respuesta celular al daño del ADN, respectivamente. En consecuencia, también podrían explicar la concurrencia de ambas enfermedades. Además, se ha informado que la variante de la línea germinal, rs2736100, está asociada con el riesgo de adenocarcinoma pulmonar, y otros polimorfismos TERT, TERC, OFBC1 y RTEL1 también se han revelado como factores de riesgo de CP (Landi y col., 2009; McKay y col., 2017). Sin embargo, la funcionalidad de los telómeros y su contribución al desarrollo del CP es controvertida.

#### *4.9.8.1. Alteraciones epigenéticas*

Debido a mecanismos patógenos similares entre la FPI y el CP, sus patrones de metilación global también son algo similares (**tabla 3**). Sin embargo, también hay diferencias, que pueden explicarse en parte por la FPI o los cambios específicos del cáncer (Rabinovich y col., 2012). Por ejemplo, se encontró que, como consecuencia de la hipermetilación del promotor, la expresión relativa del gen SMAD4 fue significativamente menor en los tumores de pacientes con cáncer y fibrosis en comparación con aquellos que tenían solo cáncer. Este fue un hallazgo sorprendente porque SMAD4 ha sido identificado como un gen supresor de tumores, pero la señalización de TGF- $\beta$ 1 es el principal efector en la FPI. Por lo tanto, se esperaría la sobreexpresión de SMAD4 en esta enfermedad. Otra alteración epigenética involucrada en la FPI es la hipermetilación del promotor THY-1 y la ausencia de expresión de Throb-1 en los fibroblastos, que está vinculada a la transformación de los fibroblastos en miofibroblastos (Sanders y col., 2008). La pérdida de esta molécula también se ha documentado en el cáncer y se asocia con una enfermedad más invasiva (Lung y col., 2005).

El gen de la ADN metiltransferasa es una de las primeras marcas epigenéticas en el cáncer de pulmón (Langevin, Kratzke y Kelsey, 2015), mientras que en los

fibroblastos de la FPI, la MGMT es uno de los genes más hipometilados ( Huang Scruggs, McEachin, White y Peters-Golden, 2014). Un 10% de los miRNAs se expresan anormalmente en la FPI. Todas estas variaciones son capaces de influir en la EMT e inducir la regulación de la apoptosis o de la MEC. Algunas de estas variaciones también se encuentran en el CP. Por ejemplo, común a la FPI, mir-21 se sobreexpresa en cáncer, que es un factor pronóstico negativo independiente para la supervivencia global (SG) en pacientes con cáncer pulmón no microcítico (Yang y col., 2012).

	FPI	CANCER PULMÓN	CANCER PULMÓN + FPI
<i>Mutated Genes</i>			
<b>SFTPA1</b>	SI	ND	SI
<b>SFTPA2</b>	SI	ND	SI
<b>TERT</b>	SI	SI	SI
<b>TERC</b>	SI	SI	ND
<b>PARN</b>	SI	ND	ND
<b>OBFC1</b>	SI	SI	ND
<b>RTEL1</b>	SI	SI	ND
<b>TOLLIP</b>	SI	ND	ND
<b>MUC5B</b>	SI	SI	ND
<b>P53</b>	SI	SI	SI
<b>FHIT</b>	SI	SI	SI
<b>KRAS</b>	ND	SI	SI
<b>BRAF</b>	ND	SI	SI
<b>CDKN1A</b>	SI	ND	SI
<i>Hypermethylated Genes</i>			
<b>SMAD4</b>	ND	ND	SI
<b>THY-1</b>	SI	ND *	ND
<b>MGMT</b>	No	SI	ND
<i>Non-coding RNAs</i>			
<b>Let-7d</b>	Downregulated	Downregulated	ND
<b>miR-21</b>	Upregulated	Upregulated	ND

ND: No determinado. \* Descrito en carcinoma metastásico de nasofaringe

**Tabla 3. Genes mutados, genes hipermetilados y ARN no codificantes con expresión alterada en pacientes con FPI, CP y CP y FPI. Modificado de Ballester y col., 2019a.**

#### **4.10. Complicaciones asociadas a la FPI**

Existen una serie de comorbilidades asociadas a la FPI. Entre ellas cabe destacar hipertensión pulmonar (HP), enfisema, diabetes, cáncer de pulmón, enfermedad de reflujo gastroesofágico, depresión, apnea del sueño obstructiva y enfermedades cardiovasculares.

La HP es una enfermedad que afecta a la musculatura pulmonar que se caracteriza por presentar vasoconstricción y remodelado de las arterias pulmonares, aumentando las resistencia vascular pulmonar y la presión arterial (Paulin R y col., 2012). Es una

enfermedad reconocida como complicación asociada a la FPI. El desarrollo de la HP pulmonar en los estadios avanzados de la enfermedad empeora la calidad de vida del paciente y reduce las posibilidades de supervivencia. Esta se desarrolla ante una pérdida significativa de la densidad del lecho vascular, aumentando la resistencia vascular pulmonar. En las fases tempranas del desarrollo del panal de abeja pulmonar predomina la muscularización vascular. A medida que el panal de abeja se va desarrollando, se produce un estado de atrofia vascular fibrótica y la ablación del tejido que con el tiempo alcanza la vascularización. La ablación vascular reduce el riego del lecho vascular, incrementando la resistencia y generando HP. Es más, la fibrosis perivascular puede afectar a la distensión de los vasos pulmonares aumentando la resistencia vascular y la presión arterial pulmonar (Nathan y col., 2007).

Los procesos biológicos complejos implicados en la FPI pueden contribuir a la patogénesis del remodelado vascular. Las áreas fibróticas poseen menos vasos sanguíneos adyacentes, pero las áreas no fibróticas aparentemente aumentan su vascularización. Los cambios estructurales oscilan desde la pérdida de capilares hasta lesiones vasculares complejas con engrosamiento de la íntima y la túnica media, y fibrosis adventicia. La neovascularización se caracteriza por la ausencia de la capa de elastina, lo cual puede contribuir al desarrollo de HP. La lesión endotelial producida por la apoptosis celular puede estar implicada en el remodelado vascular debido a la liberación de mediadores que promueven el remodelado vascular (Farkas, Gaudie, Voelkel y Kolb, 2011, Ballester y col., 2019b)

#### **4.11. Tratamiento clínico**

A pesar de la extensa investigación sobre la FPI, su fisiopatología aún no se conoce completamente y las opciones de tratamiento para esta enfermedad siguen siendo limitadas. En 2011, la ATS, la ERS, la Japanese Respiratory Society y la Latin American Thoracic Association publicaron directrices conjuntas para el manejo basado en la evidencia de la FPI (Raghu y col., 2011). La provisión de la "mejor terapia de apoyo" es uno de los principales enfoques para el manejo de la FPI y se recomienda a pesar de la fortaleza variable en la evidencia de respaldo. Otra categoría de tratamiento incluye el uso de agentes farmacológicos con intención terapéutica, a menudo en un estado de investigación en el contexto de ensayos clínicos controlados.

##### 4.11.1. Manejo farmacológico

#### 4.11.1.1. Ensayos clínicos fallidos

El enfoque del tratamiento de la FPI en décadas anteriores fue el uso de fármacos antiinflamatorios / inmunomoduladores en combinación con antioxidantes. De hecho, en el estudio IFIGENIA, la NAC agregada a la azatioprina / prednisona produjo una disminución más lenta de la capacidad vital pulmonar forzada (FVC) y de la capacidad de difusión del pulmón de monóxido de carbono (DLCO) que la terapia convencional de dos fármacos (prednisona y azatioprina) utilizada anteriormente para tratar la FPI (Demedts y col., 2005). Sin embargo, cualquier utilidad terapéutica del tratamiento "antiinflamatorio / inmunomodulador" en la FPI se vio seriamente cuestionada por el resultado desfavorable del ensayo PANTHER en el que el brazo de tratamiento con prednisolona / azatioprina y NAC tuvo que terminar prematuramente debido a un aumento significativo de la mortalidad, hospitalizaciones y eventos adversos graves (Raghu y col., 2012). Posteriormente, los resultados de la monoterapia con NAC también fueron negativos, aunque un subgrupo de pacientes con FPI con el genotipo TT rs3750920 (TOLLIP) mostró una respuesta favorable (Oldham y col., 2015).

Los avances en la comprensión de la patogenia de la FPI dieron lugar a más ensayos preclínicos y clínicos centrados en fármacos con efectos antiproliferativos y antifibróticos. En este contexto, se probaron numerosos fármacos fallidos en pacientes con FPI. En primer lugar, el interferón (IFN), que se investigó inicialmente debido a sus efectos inmunomoduladores, antifibróticos y antiproliferativos. Sin embargo, en un gran ensayo multicéntrico de fase III (INSPIRE), INF- $\gamma$  combinado con prednisona no mejoró la función pulmonar, la supervivencia sin progresión ni la calidad de vida. En segundo lugar, aunque son eficaces en la HP, los antagonistas de los receptores ET-1 fracasaron en los ensayos clínicos de FPI. ET-1 es un péptido vasoconstrictor activo con propiedades proinflamatorias y profibróticas. Bosentan, antagonista del receptor ET-1, se probó en dos ensayos aleatorizados fase III (BUILD-1 y BUILD-3), y no se observó diferencia en el tiempo de progresión de la FPI o muerte entre los grupos de bosentan y placebo. De manera similar, otros dos antagonistas del receptor ET-1, macitentan y ambrisentan, se probaron en dos estudios de fase II, aleatorizados, doble ciego, controlados con placebo (ARTEMIS-IPF y MUSIC), y ninguno mostró beneficio en los pacientes con FPI. Además, ambrisentan aumentó el riesgo de hospitalización respiratoria (13% versus 9%) (Raghu y col., 2013a; Raghu y col., 2013b).

Otros ejemplos de fracasos en la FPI fueron el TNFR2 soluble: IgG1 Fc TNF $\alpha$  quimérico que captura la proteína etanercept, que no mejoró los objetivos principales (cambios en la FVC, DLCO y gradiente alveolar-arterial en reposo) en pacientes con

FPI (Raghu y col., 2008; Antoniou y Well, 2013). El everolimus, inhibidor de la quinasa de la rapamicina de los mamíferos (mTOR), con resultados negativos en supervivencia libre de progresión frente a placebo en un ensayo fase III controlado, doble ciego, aleatorizado ( Malouf y col., 2011); y el mesilato de imatinib, inhibidor del receptor de PDGF / cAbl / cKit, que no mejoró la supervivencia ni la función pulmonar en pacientes con FPI en un ensayo fase III, multicéntrico, aleatorizado y controlado frente a placebo (Daniels y col., 2010).

Los anticoagulantes también se sugirieron como fármacos anti-FPI basados en estudios preclínicos en humanos y animales (Gunther y col., 2000). En este sentido, para probar la eficacia de la warfarina, se diseñó un ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo. Por desgracia, la warfarina aumentó la mortalidad en pacientes con FPI en comparación con el grupo placebo (Noth y col., 2012). Se pensó que la distorsión del parénquima en la FPI grave causó anomalías en la vasculatura pulmonar, incluida la producción deficiente de óxido nítrico, la vasoconstricción pulmonar y la remodelación, lo que podría contribuir a un intercambio de gases y PH perjudiciales. En este contexto, en el ensayo STEP-IPF, los investigadores trataron a pacientes con FPI grave (DLCO <35%) con el inhibidor de la fosfodiesterasa (PDE) Sildenafil, que mejora la señalización a través de la vía del óxido nítrico y promueve la vasodilatación arterial pulmonar en pulmón bien ventilado. Si bien Sildenafil no demostró beneficio en el objetivo principal, mejora de la distancia de 6 minutos a pie (6MWD) en comparación con el placebo en la población general del estudio, hubo mejoras pequeñas pero estadísticamente significativas en los objetivos secundarios, incluyendo DLCO, oxigenación arterial, síntomas de disnea y calidad de vida en comparación con placebo. Sildenafil mejoró significativamente la 6MWD (en 99.3m) en el subgrupo de pacientes con FPI y disfunción sistólica ventricular derecha que se asoció con una mejora en la calidad de vida. En base a estos resultados sildenafil no se recomienda de forma rutinaria para el tratamiento de la FPI (Zisman y col., 2010).

#### *4.11.1.2. Terapias farmacológicas aprobadas.*

Aunque la mayoría de los estudios realizados en FPI han resultado negativos, dos nuevas terapias han sido aprobadas recientemente, la pirfenidona y el nintedanib, lo que marca el comienzo de la FPI como una enfermedad tratable.

- **Pirfenidona**

De acuerdo con los tratamientos antioxidantes probados en la FPI, la pirfenidona se consideró inicialmente como una terapia antioxidante, ya que demostró una actividad de captación de O<sub>2</sub>. De hecho, la NAC oral se ha utilizado junto con pirfenidona para tratar la FPI, pero no ha alterado sustancialmente el perfil de tolerabilidad de la pirfenidona y es poco probable que sea beneficiosa en la FPI. Más allá de su actividad antioxidante, la pirfenidona es una molécula pleiotrópica que inhibe el TGF-β, la síntesis de colágeno y la proliferación de fibroblastos, y también media la reparación de tejidos (Oku y col., 2008). Además, se ha publicado recientemente que la pirfenidona induce efectos antifibróticos en la EPID asociada a la esclerosis sistémica al interferir la vía de señalización de SHH (Xiao y col., 2018). A pesar de estos hallazgos, la diana molecular de la pirfenidona todavía no está bien definida.

Inicialmente, dos ensayos fase III en Japón con 275 pacientes encontraron que la pirfenidona aumentaba la supervivencia libre de progresión (SLP), disminuía la tasa de disminución de la FVC y disminuía las exacerbaciones agudas de la FPI en la semana 52 (Azuma y col., 2005; Taniguchi y col., 2010) . Estos resultados llevaron a la aprobación regulatoria de la pirfenidona como tratamiento de la FPI en Japón en 2008. Para confirmar estos hallazgos, se realizaron dos ensayos fase III paralelos, multinacionales y aleatorizados de pirfenidona versus placebo, en 110 centros en Europa, Australia y América del Norte (CAPACIDAD I y II) con resultados contradictorios (Noble y col., 2011). Pese a esto, la pirfenidona fue aprobada en Europa en 2011 y en Canadá en 2012. La agencia reguladora americana (FDA) requirió mas datos para su aprobación. Este estudio adicional, el estudio ASCEND, analizó la eficacia y seguridad de la pirfenidona frente a placebo en la FPI en 555 pacientes incluidos en Nueva Zelanda, Norte, Centro y Sudamérica, y Australia. Se observó un beneficio significativo en términos de retraso en el deterioro de la FVC, mejora de la SLP y también una disminución del numero de muertes en la semana 52 (análisis conjunto preespecificado de los 3 estudios) (King y col., 2014). Recientemente, se ha observado un aumento de la tasa de supervivencia a 3 años del 73% en una cohorte de FPI de la vida real (sin incluir las restricciones de un ensayo clínico) en comparación con los medicamentos utilizados anteriormente (Margaritapoulos y col., 2018)

- **Nintedanib**

Nintedanib, anteriormente conocido como BIBF 1120, fue aprobado por la FDA en 2014 y en la UE, Canadá, Japón, Suiza y otros países en 2015. Nintedanib es un inhibidor de la tirosina quinasa que bloquea la señalización de la tirosina quinasa al inhibir la activación del VEGF, FGF, y receptores de PDGF. En primer lugar, en un modelo de ratón, nintedanib mejoró notablemente la FPI en un modelo preventivo y terapéutico (Chaudhary y col., 2007). En el ensayo TOMORROW, fase II aleatorizado frente a placebo, nintedanib redujo la tasa de disminución de FVC en un 68% en comparación con placebo después de 12 meses, con preservación de la calidad de vida. Además, nintedanib redujo significativamente la aparición de exacerbaciones agudas (Richeldi y col., 2011). Después de este ensayo, se realizaron dos ensayos fase III (INPULSIS-1 e INPULSIS-2) para evaluar la seguridad y la eficacia del tratamiento con nintedanib en pacientes con FPI. Los estudios INPULSIS fueron ensayos multicéntricos, aleatorios, de grupos paralelos, controlados con placebo, realizados en 205 centros de 24 países de Europa, América, Asia y Australia. En ambos ensayos, después de 52 semanas de tratamiento, nintedanib redujo significativamente la tasa de disminución de la FVC y se asoció frecuentemente con diarrea, llevando a la interrupción de la medicación del estudio en menos del 5% de los pacientes. En un estudio reciente, se ha demostrado que la tasa de disminución en FVC y el efecto del tratamiento con nintedanib es el mismo en pacientes con volumen pulmonar preservado (FVC > 90%) que en pacientes con mayor deterioro en FVC, lo que respalda el valor del tratamiento precoz de la FPI (Kolb y col., 2017).

#### 4.11.1.3. Ensayos clínicos actuales

A pesar de la aprobación de pirfenidona y nintedanib, todavía no existe una terapia que mejore definitivamente la calidad de vida o la supervivencia de los pacientes con FPI. Por lo tanto, se siguen investigando nuevas terapias dirigidas en numerosos ensayos clínicos (Tabla 3).

- **Zileuton**

Los leucotrienos, mediadores lipídicos de la inflamación derivados de la vía 5-LO del metabolismo araquidónico, están elevados en pacientes con FPI y se ha demostrado que inducen la síntesis de proteínas de la matriz además de promover la migración y proliferación de fibroblastos (Peters-Golden y col., 2002).

Se completó un ensayo clínico aleatorizado de fase II (ClinicalTrials.gov identifier NCT00262405) que comparó zileuton (inhibidor de 5-lipoxigenasa (5-LO)) con

azatioprina / prednisona en pacientes con FPI, pero aún no se han publicado resultados tras la finalización del estudio en mayo de 2007.

- **QAX576 y lebrikizumab**

QAX576 y lebrikizumab son medicamentos anti-interleucina 13 (IL-13). Lebrikizumab, ha sido probado en un estudio multicéntrico, aleatorizado, controlado con placebo, doble ciego en fase II (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01872689) y se ha demostrado que, a pesar de ser bien tolerado, la monoterapia con lebrikizumab no se asocia con ningún beneficio sobre la función pulmonar o la mortalidad a las 52 semanas de tratamiento en pacientes con FPI. Posteriormente, se diseñó un ensayo de fase II, aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, controlado con placebo, de grupos paralelos para evaluar la eficacia y seguridad de lebrikizumab como terapia de combinación con pirfenidona en pacientes con FPI. A pesar de no observarse beneficio en el cambio de FVC a las 52 semanas de tratamiento, el estudio sugería un posible beneficio sobre la mortalidad y las exacerbaciones agudas (Maher y col., 2018). Mas recientemente se ha completado un ensayo no aleatorizado de fase II (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00532233) y un ensayo doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo de fase II (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01266135) con QAX576, pero los resultados no están disponibles.

- **Carlumab (CNTO888)**

Se llevó a cabo un ensayo aleatorizado de fase II controlado de CNTO-888, un anticuerpo monoclonal anti-CCL2, frente a placebo. No se han observado eventos adversos graves inesperados y, aunque la administración se suspendió prematuramente, es poco probable que el carlumab beneficie a los pacientes con FPI (Raghu y col., 2015).

- **Fresolimumab (GC1008)**

Un estudio pionero en fase I ha evaluado la seguridad de fresolimumab (GC1008), un anticuerpo monoclonal humano que neutraliza el TGF- $\beta$ 1, en el tratamiento de pacientes con FPI. Este estudio (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00125385) se ha completado, aunque los resultados aún no han sido publicados. Sin embargo, se ha publicado que el fresolimumab invierte los marcadores de fibrosis de la piel (Rice y col., 2015) pendiente de los resultados en FPI.

- **BG0011 (STX-100) y GSK3008348**

Dado que actuar directamente sobre TGF- $\beta$ 1 puede alterar la homeostasis fisiológica y provocar efectos secundarios indeseables, su cascada de activación podría ser un objetivo terapéutico más atractivo. Con este objetivo, se ha diseñado un estudio de fase I (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02612051) para examinar una dosis nebulizada única de GSK3008348 (un antagonista de integrina  $\alpha\beta$ 6) y un estudio fase II de dosis crecientes con STX 100 (anticuerpo monoclonal humanizado anti- $\alpha\beta$ 6 integrina BG0011) (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01371305). Ambos estudios se han completado, pero solo se han publicado los resultados del ensayo clínico de fase I GSK3008348, con resultados de seguridad y farmacocinética alentadores, lo que respalda su desarrollo como una nueva opción de tratamiento inhalado para la FPI (Maden y cols., 2018).

- **Pamrevlumab (FG-3019)**

Se ha publicado un ensayo aleatorizado de fase II (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01262001) para evaluar pamrevlumab (FG-3019), un anticuerpo anti-CTGF en la FPI. Pamrevlumab ha presentado un buen perfil de seguridad y resultados alentadores con respecto a los cambios en la función pulmonar y extensión de la fibrosis pulmonar por imagen (TCAR) (Raghu y col., 2016). Actualmente está en marcha un estudio fase III para confirmar el posible beneficio de este fármaco frente a placebo (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03955146)

- **Losartan**

La angiotensina II (ANGII) es un vasoconstrictor que se sobreexpresa en los pulmones de los pacientes con FPI. Se ha demostrado que la ANGII actúa in vitro como un factor proapoptótico en las AEC, induce la proliferación de fibroblastos de pulmón humano e induce la producción de procolágeno pulmonar a través del receptor de angiotensina tipo 1 (AT1). Losartan, un antagonista del receptor AT1, se ha investigado en un proyecto piloto de fase II (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00879879). Este estudio ha sido terminado, pero no todos los resultados han sido publicados. Sin embargo, el único informe sobre este estudio ha descrito una respuesta de FVC estable o mejorada y un perfil de toxicidad bajo (Ballester y col., 2019b).

- **BMS-986020**

El LPA es un mediador profibrótico con actividad proinflamatoria regulada a través de una familia de al menos cinco receptores acoplados a proteína G, designado LPA1-5. BMS-986020 (anteriormente AM152), un antagonista específico de LPA1, demostró

ser seguro y bien tolerado en un estudio clínico de fase I. El fármaco demostró una reducción significativamente mas lenta de la FVC frente a placebo en un ensayo fase II con 2 dosis del fármaco., por desgracia el estudio se interrumpió precozmente por toxicidad hepática relacionada con el mismo independientemente de la dosis. Un estudio mas reciente fase II con BMS-986020 (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01766817), observó también un beneficio en la disminución de la FVC a costa de la toxicidad hepática ya conocida (Palmer y col., 2018).

- **Tetratiomolibdato y clorhidrato de minociclina**

Se ha completado un ensayo de fase I/II (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00189176) para evaluar el tetratiomolibdato, un agente con propiedades angiostáticas. Se ha demostrado que atenúa la fibrosis, con una reducción concomitante de la angiogénesis en un modelo de bleomicina de fibrosis pulmonar (Burdick y col., 2005). Además, el clorhidrato de minociclina, un derivado semisintético de la tetraciclina con propiedades antiangiogénicas, también se ha probado en un estudio clínico de fase III randomizado y doble ciego asociado al tratamiento estándar (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00203697). Ambos estudios están pendientes de resultados.

- **TD139**

TD139 inhalado es un nuevo inhibidor de la galectina 3, altamente expresada en pacientes con FPI. Los resultados iniciales de un ensayo clínico de fase I/II controlado con placebo indican que TD139 es seguro y bien tolerado (Hirani y col., 2017). Actualmente esta abierto un estudio fase IIb de TD139 frente a placebo que intenta confirmar la eficacia de este fármaco (ClinicalTrials identifier: NCT03832946) .

- **GSK-2126458**

La vía dependiente de la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) / proteína quinasa B (AKT) / mTOR está desregulada en enfermedades fibroproliferativas como la fibrosis pulmonar. Recientemente se ha completado un estudio doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo, (ClinicalTrials identifier: NCT01725139) para evaluar GSK-2126458, un inhibidor de la piridilsulfonamida altamente selectivo de las isozimas clase I de PI3K y mTOR en sujetos con FPI con resultados iniciales de seguridad y farmacocinética favorables (Lukey y col., 2019).

- **Decanoato de nandrolona**

Actualmente esta abierto un fase I/II (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02055456) con decanoato de nandrolona, un esteroide androgénico anabólico para inducir la expresión del gen TERT, en enfermedades caracterizadas por acortamiento anómalo del telómero, incluido la FPI. Los resultados de este estudio todavía no están disponibles.

- **IW001**

Se ha observado que entre un 40-60% de los pacientes con FPI pueden mostrar una respuesta autoinmune contra el colágeno tipo V (Col V), un colágeno menor que se encuentra principalmente en las fibrillas del colágeno pulmonar principal, el colágeno tipo I. Se han publicado los resultados de un estudio multicéntrico fase I con IW001, inmunoterapia oral frente al Col V. IW001 parece ser seguro y bien tolerado, y puede tener un impacto beneficioso en la progresión de la enfermedad en función de las tendencias en la estabilización de la FVC (Wilkes y col., 2015).

- **PRM-151**

La proteína del plasma sanguíneo endógeno, pentraxina-2, se ha demostrado que se acumula en sitios de fibrosis en modelos animales. Además, la pentaxina-2 inhibe la diferenciación de monocitos en macrófagos y fibrocitos proinflamatorios y fibróticos, al tiempo que promueve su diferenciación en macrófagos reguladores. Esto a su vez promueve la curación epitelial y la resolución de la inflamación y la cicatrización. Actualmente se encuentra activo un estudio con PRM-151, un ac frente a la pentraxina-2. Se trata de un estudio piloto de fase II, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo (Clinicaltrials.gov identifier: NCT02550873), diseñado para evaluar la eficacia y seguridad de la administración de PRM-151. Los resultados preliminares muestran que el PRM-151 es bien tolerado en todos los niveles de dosis, sin reacciones adversas graves. Además, las pruebas de FVC y 6MWD muestran tendencias hacia la mejora en los distintos grupos tratados con PRM-151. (Raghu y col., 2018).

- **Octreotide**

Octreotide es un análogo de la somatostatina, hormona inhibidora de la hormona del crecimiento, con una larga vida media in vivo. Los receptores de somatostatina y la captación de octreotide aumentan en los pulmones con FPI. Se diseñó un ensayo clínico fase I / II (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00463983) con pacientes de FPI que recibieron una inyección intramuscular de octreotide de liberación lenta. Se ha observado que es bien tolerado y proporciona una prueba de concepto de que el

tratamiento con octreotide disminuye la progresión de la fibrosis pulmonar. Sin embargo, estos resultados deben ser confirmados por un estudio ~~más grande~~ controlado con placebo (Crestani y col., 2012).

- **KD025**

El ensamblaje del filamento de actina y la contracción de actomiosina están dirigidos por la familia de serina / treonina quinasas de la proteína quinasa formadora de bobina en espiral (ROCK) asociada con Rho. En la actualidad, se está realizando un estudio clínico de fase II (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00463983) para evaluar la seguridad, la tolerabilidad y la actividad de KD025, inhibidor de ROCK2, en comparación con la atención estándar en pacientes con FPI. Los resultados preliminares han demostrado que KD025 reduce la disminución de pacientes en la FVC en la semana 24 en un 73 por ciento, en comparación con los pacientes que recibieron atención de apoyo (Ballester B y col., 2019b).

- **Tipelukast (MN-001)**

Tipelukast es un antagonista del receptor de leucotrienos, inhibidor de PDE (principalmente 3 y 4) e inhibidor de 5-LO. También regula a la baja los genes que promueven la fibrosis (como el colágeno tipo 1) y los genes responsables de promover la inflamación (como el receptor de quimiocinas C-C tipo 2 y la proteína quimioatrayente de monocitos 1). En la actualidad esta abierto un estudio de fase II, aleatorizado, controlado con placebo, doble ciego con MN-001 en pacientes con FPI de moderada a grave (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02503657). ~~está en curso~~.

- **GLPG1690**

La autotaxina es una lisofosfolipasa D secretada en gran parte responsable de la producción extracelular de LPA. En la fibrosis pulmonar, los niveles de ATX aumentan en el líquido del LBA y estimulan la producción de LPA. Recientemente, se ha completado un estudio fase II multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, de grupos paralelos, controlado con placebo, con GLPG1690, un inhibidor selectivo de la autotaxina (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02738801). Ha sido bien tolerado, con la mayoría de los efectos secundarios leves a moderados y, los resultados en particular para la FVC, son alentadores y respaldan la evaluación clínica adicional de GLPG1690 como tratamiento para la FPI ( Maher y col., 2018).

- **Sirolimus**

Sirolimus es un análogo de la rapamicina e inhibidor de mTOR. En la actualidad, esta en curso un estudio piloto a corto plazo (ClinicalTrials.gov identifier NCT01462006) es. En comparación con el placebo, el tratamiento corto con sirolimus redujo las concentraciones de fibrocitos circulantes en pacientes con FPI y se asoció con un perfil de seguridad aceptable. Estudios futuros para evaluar el efecto del tratamiento con sirolimus a largo plazo en la historia natural de la FPI están justificados (Axell-House y col., 2018).

- **PBI 4050**

Estudios recientes han determinado que el PBI-4050 actúa como agonista de GPR40 y como antagonista de GPR84, ambos receptores de ácidos grasos libres. Se ha demostrado que inhibe la fibrosis en varios modelos de fibrosis tisular y reduce la producción de TGF $\beta$ -1, CTGF e IL-6. Recientemente se ha completado un estudio fase II con 17 pacientes con PBI-4050. Los resultados de la FVC son alentadores para PBI-4050, solo o en combinación con nintedanib, a pesar de las limitaciones en el tamaño de la muestra y diseño del estudio (Khalil y col., 2018).

- **Rituximab**

El rituximab es un anticuerpo monoclonal anti CD20 quimérico que actúa destruyendo las células B, que producen autoanticuerpos. Está aprobado por la FDA para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide. Se ha diseñado un ensayo doble ciego, fase II (Clinicaltrials.gov identifier NCT01969409) en pacientes con FPI para determinar si el rituximab reduce los niveles de autoanticuerpos que podrían estar contribuyendo al daño pulmonar en la FPI. Este estudio está actualmente activo y los resultados aún no se han publicado. Sin embargo, se ha observado una respuesta positiva al rituximab con pocas complicaciones de tratamiento en la enfermedad inflamatoria del tejido conectivo relacionada con la FPI (Fitzgerald y col., 2015).

- **CC-90001**

La evidencia preclínica sugiere que la función de la enzima quinasa N-terminal de Jun (JNK) es necesaria para los pasos clave en el proceso fibrótico pulmonar. A este respecto, se encuentra actualmente activo, un estudio fase II, multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo de dos dosis de tratamiento de CC-90001, un inhibidor de JNK de segunda generación, en sujetos con FPI (ClinicalTrials.gov identifier: NCT03142191).

- **Vismodegib más pirfenidona**

Vismodegib es un inhibidor de la ruta de SHH que se ha probado en un estudio fase Ib, multicéntrico, de un solo brazo que evalúa el vismodegib en combinación con pirfenidona en pacientes con FPI (Clinicaltrials.gov identifier: NCT02648048). Este estudio se ha publicado recientemente con resultados negativos (Prasse y cols., 2019).

- **Pirfenidona más nintedanib**

Debido a la falta de ensayos comparativos de pirfenidona y nintedanib en la misma población de pacientes con FPI o marcadores predictivos eficaces de respuesta al tratamiento, la elección del tratamiento se deja al criterio de los médicos y la preferencia de los pacientes. Curiosamente, se han completado recientemente dos estudios de fase IV para evaluar la tolerabilidad y seguridad de un tratamiento combinado de nintedanib y pirfenidona en participantes con FPI (ClinicalTrials.gov identifiers: NCT02598193 y NCT02579603). Esta combinación fue bien tolerada por la mayoría de los pacientes con FPI y se asoció con ~~de~~ similares de eventos adversos y tasas de interrupción esperadas con cualquiera de los dos tratamientos solo. Los resultados de estos ensayos alientan un estudio adicional para determinar la eficacia y seguridad de la pirfenidona y nintedanib como tratamiento combinado versus monoterapia en pacientes con FPI (Vancheri, Failla, Crimi y Raghu, 2018).

- **Terapia de células madre mesenquimales**

El uso de células madre mesenquimales (MSC) se ha propuesto como un posible agente terapéutico para la FPI debido a su papel en la reparación tisular y la cicatrización de heridas combinadas con sus propiedades inmunomoduladoras y su estado inmuno-privilegiado. Luego, varios ensayos clínicos se han centrado en el uso de MSC como terapia de la FPI (ClinicalTrials.gov identifiers: NCT01385644, NCT01919827 y NCT02013700). Los resultados publicados hasta el momento no han reportado complicaciones ni efectos tóxicos. Sin embargo, no hay cambios significativos en la función pulmonar ni en la 6 MWD (Mora y col., 2017).

Terapia	Estado	Mecanismo de acción	ID Ensayo
<b>Pirfenidone</b>	Aprobado	Inhibidor de TGF-β y de la Vía Shh . Antioxidante	
<b>Nintedanib</b>	Aprobado	Inhibidor de VEGFR, PDGFR y FGFR	
<b>Pirfenidone + Nintedanib</b>	Fase IV (completada)		NCT02598193 NCT02579603
<b>Zileuton</b>	Fase II (completada)	5-LO inhibidor	NCT00262405
<b>QAX576</b>	Fase II (completada)	Anti-IL-13	NCT00532233 NCT01266135
<b>Lebrikizumab</b>	Fase II (completada)	Anti-IL-13	NCT01872689
<b>Carlumab (CNTO-888)</b>	Fase II (completada)	Anti-CCL2	NCT00786201
<b>Fresolimumab</b>	Fase II (completada)	TGF-β Anticuerpo	NCT00125385
<b>BG0011 (STX-100)</b>	Fase II (completada)	Anti-αβ6 integrina	NCT01371305
<b>GSK3008348</b>	Fase I (completada)	αβ6 antagonista	NCT02612051
<b>Pamrevlumab</b>	Fase II (completada)	Anti-CTGF	NCT01262001
<b>Losartan</b>	Fase II (completada)	AT1 receptor antagonista	NCT00879879
<b>BMS-986020</b>	Fase II (completada)	LPA receptor 1 antagonista	NCT01766817
<b>Tetrathiomolybdate</b>	Fase II (completada)	Agente antiangiogénico	NCT00189176
<b>Minocycline hydrochloride</b>	Fase II (completada)	Agente antiangiogénico	NCT00203697
<b>TD139</b>	Fase I/II (completada)	Inhibidor de Galectina 3	NCT02257177
<b>GSK-2126458</b>	Fase I (completada)	Inhibidor PI3K y mTOR	NCT01725139
<b>Nandrolone decanoate</b>	Fase I/II (completada)	<i>Inducción de los genes TERT</i>	NCT02055456
<b>IW001</b>	Fase I (completada)	Inmunoterapia oral	NCT01199887
<b>PRM-151</b>	Fase I (completada)	Recombinante humano PTX-2	NCT02550873
<b>Ocreotide</b>	Fase I/II (completada)	Somatostatina analoga	NCT00463983
<b>KD025</b>	Fase II (reclutando)	Inhibidor de ROCK2 i	NCT02688647
<b>Tipelukast (MN-001)</b>	Fase II (reclutando)	Antagonista del receptor del LT. Inhibidor PDEs y 5-LO	NCT02503657
<b>GLPG1690</b>	Fase II (completada)	Anti-autotaxina	NCT02738801
<b>Sirolimus</b>	Fase II (no reclutando)	Anti-mTOR	NCT01462006
<b>PBI 4050</b>	Fase II (completada)	GPR40 agonista GPR84 antagonista	NCT02538536
<b>Rituximab</b>	Fase II (completada)	Anti-CD20	NCT01969409
<b>CC-90001</b>	Fase II (reclutando)	JNK inhibidor	NCT03142191
<b>Vismodegib y Pirfenidona</b>	Fase I (completada)	Inhibidor de la vía Shh + Pirfenidona	NCT02648048
<b>Terapia MSC</b>	Fase I (completada)	Reparador tisular	NCT02013700

**Tabla 4. Nuevos fármacos para el tratamiento de la fibrosis pulmonar.**

#### 4.11.1.4. Manejo no farmacológico.

Las estrategias de manejo no farmacológico ayudan a los pacientes con FPI a vivir de manera más saludable y con vidas más normales. Dejar de fumar debe ser una prioridad para los pacientes que usan activamente productos de tabaco. Además, deben administrarse vacunas contra la influenza, la neumococa y otras vacunas apropiadas para la edad. Otras opciones son:

- Oxígeno suplementario: las guías de práctica clínica recomiendan encarecidamente el oxígeno suplementario para pacientes con FPI. La administración de oxígeno reduce la disnea de esfuerzo y mejora la tolerancia al ejercicio. Esta en marcha un ensayo clínico de fase no aplicable (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02551068) para determinar si los pacientes con FPI que toman nintedanib tendrán una mejor resistencia al ejercicio, falta de aire y calidad de vida si respiran 60% de O<sub>2</sub> en comparación con la atención estándar durante un entrenamiento de 8 semanas.
- Rehabilitación pulmonar: la limitación del ejercicio, la hipoxia inducida por el ejercicio y la HP son comunes en pacientes con FPI. La rehabilitación pulmonar es una intervención integral para mejorar la condición física y psicológica del paciente y también promover la adherencia a largo plazo a comportamientos que mejoran la salud. Esta intervención implica: acondicionamiento aeróbico, entrenamiento de fuerza y flexibilidad, conferencias educativas, intervenciones nutricionales y apoyo psicosocial.
- Trasplante de pulmón: dada la naturaleza progresiva e incurable de la FPI, el trasplante de pulmón se considera comúnmente en pacientes con enfermedad de moderada a grave. El momento ideal para la derivación y el listado para el trasplante de pulmón sigue siendo un reto debido a la gran variabilidad en el curso clínico y la esperanza de vida, así como el rápido y a menudo catastrófico deterioro clínico asociado con las exacerbaciones agudas. Solo el 66% de los receptores de trasplantes con FPI sobreviven más de 3 años después del trasplante y solo el 53% sobrevive durante más de 5 años (Lederer y Martinez, 2018).

## 5. MODELOS ANIMALES IPF

Dados los desafíos asociados con la realización de ensayos clínicos en pacientes con FPI, es imperativo que los paquetes de datos preclínicos sean sólidos en sus análisis e interpretaciones para una correcta selección de las moléculas con mayores probabilidades para avanzar a los ensayos clínicos. Los modelos animales no recapitulan completamente los hallazgos fisiológicos de la FPI o el patrón histopatológico de la FPI. Sin embargo, sí permiten investigaciones mecanicistas relevantes para la fibrogénesis (Jenkins y col., 2017).

Actualmente, teniendo en cuenta que los modelos animales alternativos pueden no ofrecer una mejor discriminación para la evaluación farmacológica, los ratones se consideran el modelo animal de primera línea para las pruebas preclínicas. A pesar de la edad avanzada en la FPI, dados los importantes obstáculos prácticos asociados con la generación de ratones envejecidos (por ejemplo, tiempo y costo), actualmente no hay una razón convincente para recomendar el uso estándar o prioritario de ratones envejecidos para pruebas farmacológicas, a menos que exista un objetivo particular relacionado con la edad que justifique tales investigaciones. Finalmente, la FPI es más común en hombres que en mujeres. Luego, la ATS recomienda en primer lugar el uso de animales machos y, en segundo lugar, el uso de ratones hembras para confirmar hallazgos clave.

El análisis más preciso para la fibrosis pulmonar en los modelos de FPI incluye varios objetivos principales, como son: la evaluación histológica de la distribución fibrótica mediante tinción tricrómica de Masson, y otros parámetros opcionales, como las medidas de expresión génica generalmente por reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (PCR), función pulmonar evaluada mediante métodos no invasivos (pletismografía de cuerpo entero) o métodos invasivos (maniobras pulmonares de Buxco-force y FlexiVent) e imágenes por TC o TC de emisión de fotón único.

Los modelos animales de FPI se pueden dividir aproximadamente en aquellos que tienen un fuerte componente inflamatorio y modelos de menos lesiones inflamatorias. El uso de bleomicina, radiación, aerosolización de sílice, asbesto, fluoresceína y muchos sistemas de sobreexpresión de citoquinas conducen a la fibrogénesis después de una respuesta inflamatoria robusta, mientras que la liberación transgénica de TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , TNF $\alpha$  o IL-1 $\beta$  por vectores de adenovirus y lentivirus, promueven la eliminación selectiva del epitelio.

El modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina representa el modelo animal de FPI más barato, más fácil, más rápido, más reproducible y, por lo tanto, más ampliamente utilizado. La bleomicina es un antibiótico quimioterapéutico que se ha identificado como un agente pro-fibrótico cuando los pacientes con linfoma desarrollaron fibrosis pulmonar después de la administración intravenosa de bleomicina. Hasta ahora, la bleomicina se ha administrado por múltiples métodos, incluidos los intratraqueales (IT), intraperitoneal, subcutáneo, intravenoso e inhalatorio. Sin embargo, la IT es la vía de administración más frecuente. Se cree que la administración IT recapitula mejor el fenotipo humano que se limita a los pulmones. Otro problema identificado en los estudios que utilizan el modelo de ratón bleomicina es la amplia gama de regímenes de dosificación utilizados. En estudios con ratones, la dosis basada en el peso es más común, comenzando a 1.25 U / kg y hasta un máximo de 4 U / kg. Finalmente, la cepa C57BL / 6J es la predominante, ya que esta cepa en particular es altamente susceptible a la lesión pulmonar después de la administración de bleomicina IT.

El modelo de bleomicina se caracteriza por períodos de lesión pulmonar aguda e inflamación (días 0 a 7), fibroproliferación (días 3 a 14) y fibrosis establecida (generalmente días 14 a 28) que se resuelve en un período de tiempo variable. Durante la primera semana (días 0-7), después de una única instilación IT con bleomicina, la respuesta se caracteriza por la inflamación pulmonar. Durante los días siguientes (días 7 a 21), la fibrosis alveolar e intersticial se hace progresivamente más prominente con la eliminación parcial o completa de los alvéolos. Estos cambios patológicos en el tejido pulmonar, como el aumento de los niveles de mediadores pro-fibróticos (proteínas y lípidos) y el consiguiente aumento de la deposición de la matriz, explican la rápida pérdida de ventilación en el día 7 debido a la presencia de células inflamatorias y de líquido en el espacio alveolar, seguida de una disminución más pronunciada de la ventilación en el día 14 debido a la fibrosis intersticial.

# HIPOTESIS Y OBJETIVOS

## 1. HIPOTESIS

Basados en los antecedentes anteriormente descritos el presente proyecto de investigación preclínica y traslacional establece la siguiente hipótesis :

*Las mucinas MUC4 ancladas a membrana se encuentran involucradas en la activación de fibroblastos (proliferación y migración) de pacientes con FPI, además de en las transformaciones celulares como son la EMT, EndoMT, así como en la formación de miofibroblastos a partir de fibroblastos, fibrocitos, células musculares de arteria pulmonar, pericitos o células mesoteliales pulmonares, participando así en el desarrollo y progresión de la FPI.*

*Una terapia dirigida a bloquear la activación y señalización intracelular de la mucina MUC4 ancladas a membrana podría mejorar de forma significativa la evolución de la FPI por medio de un abordaje múltiple de los procesos moleculares y celulares participantes en esta devastadora enfermedad.*

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto de investigación es evaluar la posible participación de la mucina MUC4 ancladas a membrana (MUC4) en la activación y transformaciones celulares que participan en la FPI, así como en los aspectos funcionales característicos como base preclínica y traslacional de futuros tratamientos. Para ello se establecerán los siguientes subobjetivos específicos:

1) Analizar la expresión y distribución de la mucina MUC4 anclada a membrana (MUC4) en tejido pulmonar de pacientes con FPI y pacientes sin enfermedad pulmonar (como control) así como la correlación con diferentes parámetros clínicos de la enfermedad.

2) Analizar la participación de la mucina MUC4 anclada a membrana en los procesos de activación y transformación celular de fibroblastos (proliferación y migración), además de en las transformaciones celulares como son la EMT, EnMT y formación de miofibroblastos a partir de fibroblastos.

3) Analizar el potencial papel terapéutico de la supresión de la mucina MUC4 anclada a membrana mediante modelos KO/siRNA/CRISPR-cas o mediante inhibidores farmacológicos de las porciones citoplasmáticas, sobre las activaciones/transformaciones celulares descritas anteriormente, así como en modelos animales de fibrosis pulmonar KO para las diferentes mucinas ancladas a membrana.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. MATERIALES

### 1.1. Reactivos utilizados

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Ácido acético glacial	Panreac	Ref. 361008
Ácido cítrico anhidro	Panreac	Ref. 141808
Ácido clorhídrico (HCl)	Panreac	Ref. 131020
Ácido fosfomolibdico	VWR Prolabo	Ref. 20616184
Ácido tricloroacético (cloroformo)	Panreac	Ref. 151067
Acrilamida	Sigma-Aldrich	Ref. A3574
Agua dietilpirocarbonato (DEPC)	Applied Biosystems	Ref. AM9906
Albúmina sérica bovina (BSA)	Sigma-Aldrich	Ref. A7906
Amonio persulfato	Sigma-Aldrich	Ref. A3678
Anfotericina B	Lonza Group LTD	Ref. 17-836E
ARN interferente control negativo	Ambion	Ref. AM4611
ARN interferente de MUC4	Ambion	Ref. s9073
Azul de anilina	VWR Prolabo	Ref. 21999183
Azul de tripano	Molecular Probes, Invitrogen	Ref. T10282
BEGM™ (Medio de cultivo de células epiteliales bronquiales)	Lonza	Ref. CC-2540B
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> )	Panreac	Ref. 141396
Cloruro de sodio (NaCl)	Panreac	Ref. 141659
Cóctel inhibidor de proteasa	Sigma	Ref. P8340
Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent	Thermo Fisher Scientific	Ref. 1856210
Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM)	Lonza	Ref. BE12-614F
Dextrano	Sigma-Aldrich	Ref. 9004-54-0
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Sigma-Aldrich	Ref. L3771
DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)	Thermo Fisher Scientific	Ref. 17-513F

<b>DPX medio de montaje</b>	Panreac	Ref. 255254
<b>ECL plus</b>	Amersham GE Healthcare	Ref. RPN2132
<b>EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)</b>	Sigma	Ref. ED2SC
<b>EGTA (ácido etilenglicol tetraacético)</b>	Sigma	Ref. E3889
<b>Eosina amarillenta</b>	Panreac	Ref. 251299
<b>Etanol absoluto</b>	Panreac	Ref. 361086
<b>Formaldehido 3.7-4%</b>	Panreac	Ref. 143091
<b>Glicerol</b>	Sigma-Aldrich	Ref. G5516
<b>Glicógeno</b>	Calbiochem	Ref. 361507
<b>Hematoxilina de Ehrlich</b>	Sigma-Aldrich	Ref. GHS322
<b>HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazino etanosulfónico)</b>	Sigma-Aldrich	Ref. H4034
<b>Hidróxido sódico (NaOH)</b>	Panreac	Ref. 131687
<b>Isoflurano</b>	Baxter SL.	ARREANE
<b>Isopropranol</b>	Sigma	Ref. I9516
<b>Ketamina</b>	(Imalgene®) Merial	904886
<b>Kit "Taq Man para la transcripción reversa"</b>	Applied Biosystems	Ref. N8080234
<b>Kit BCA Protein Assay</b>	Thermo Fisher Scientific	Ref. 23225
<b>Lipofectamina 2000</b>	Thermo Fisher Scientific	Cat. 11668027
<b>Marcador de peso molecular Amersham High-Range Rainbow</b>	GE Healthcare	Ref. RPN756E
<b>Medetomidina</b>	(Domtor®) Esteve	Cat. 135089-1
<b>Medio de montaje rápido para microscopía óptica</b>	FLUOPREP Biomerieux	Cat. 75521
<b>Metanol</b>	Sharlab	Ref. ME03262500
<b>Nonidet P 40</b>	Sigma	Ref. 74385
<b>Opti-MEM</b>	Thermo Scientific	Cat. 11058021
<b>Parafina</b>	Sigma-Aldrich	Ref.P3683
<b>Paraformaldehído 4%</b>	Panreac	Ref.252931
<b>Percoll</b>	GE Healthcare Life Science	Cat. 17-0891-01
<b>Ponceau de silidina</b>	Merk	Ref. 1159270025
<b>Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI)</b>	Lonza	Ref. BE12-167F

<b>Tampón de lisis para la purificación de ácidos nucleicos</b>	Applied Biosystems	Ref. 4305895
<b>Tampón salino fosfato (PBS)</b>	Sigma-Aldrich	Ref. P4417
<b>TaqMan® Gene Expression Master Mix</b>	Applied Biosystems	Ref. 4369016
<b>Tetramethylethylenediamine para electroforesis (TEMED)</b>	Sigma-Aldrich	Ref. T9281
<b>Triton X-100</b>	Panreac	Ref. 142314
<b>Trizol</b>	Roche Diagnostics	Ref. 1667157001
<b>Tween20</b>	Sigma-Aldrich	Ref. P1379
<b>Xileno</b>	Merck	Ref. 481769

*Tabla 5. Reactivos utilizados*

## **1.2. Pacientes**

El tejido pulmonar humano se obtuvo de los Servicios de Cirugía Torácica y Patología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (Valencia, España) y del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia (Valencia, España). Se han utilizado dos tipos de muestras: A) pulmones de pacientes con FPI sometidos a cirugía para el programa de trasplante de órganos y B) Muestras de control de explante de pulmón de donantes con función pulmonar normal que no se usaron para fines de trasplante (representa tejido pulmonar sin FPI y se usaron como controles), sin ninguna enfermedad pulmonar.

La FPI se diagnosticó de acuerdo con los criterios de consenso ATS / ERS. En el adulto inmunocompetente, la presencia de todos los criterios diagnóstico mayores y de al menos 3 de los 4 criterios menores incrementa la probabilidad de un correcto diagnóstico clínico de FPI:

### Criterios Mayores

- Exclusión de otras causas conocidas de enfermedad pulmonar intersticial (EPI) como ser toxicidad confirmada de ciertas drogas, exposición ambiental, y enfermedades del tejido conectivo
- Estudios de función pulmonar alterados que incluyen evidencia de restricción (CV reducida, a menudo con relación VEF1/FVC incrementada) y alteración en el intercambio de gases [ $P(A-a)O_2$  incrementada,  $PaO_2$  disminuida con el reposo o ejercicio o DLCO disminuida]

- Anormalidades bibasales reticulares con mínima opacidad tipo vidrio esmerilado en TC de alta resolución
- Biopsia pulmonar transbronquial o LBA mostrando ausencia de características que soporten un diagnóstico alternativo

Criterios Menores:

- Edad >50 años
- Comienzo insidioso de disnea inexplicada de esfuerzo
- Duración de la enfermedad >3 meses
- Rales inspiratorios bibasales (secos, tipo “Velcro”).
- Exclusión de causas conocidas de EPID.

Todas las pruebas de función pulmonar se realizaron dentro de los 3 meses anteriores a la cirugía. Después de la selección basada en los criterios de diagnóstico, todas las muestras de tejido pulmonar utilizadas para el estudio se verificaron histológicamente utilizando los siguientes criterios de exclusión: (1) presencia de tumor, (2) presencia de infección del tracto respiratorio.

Los pulmones tomados de los controles de los donantes mostraron una arquitectura normal con pocos macrófagos intraalveolares y edema.

El protocolo fue aprobado por el comité local de investigación y ética independiente del Hospital del Consorcio General Universitario de Valencia (CEI CHGUV / 052016) (**anexo 1**). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada participante.

### **1.3. Animales de experimentación.**

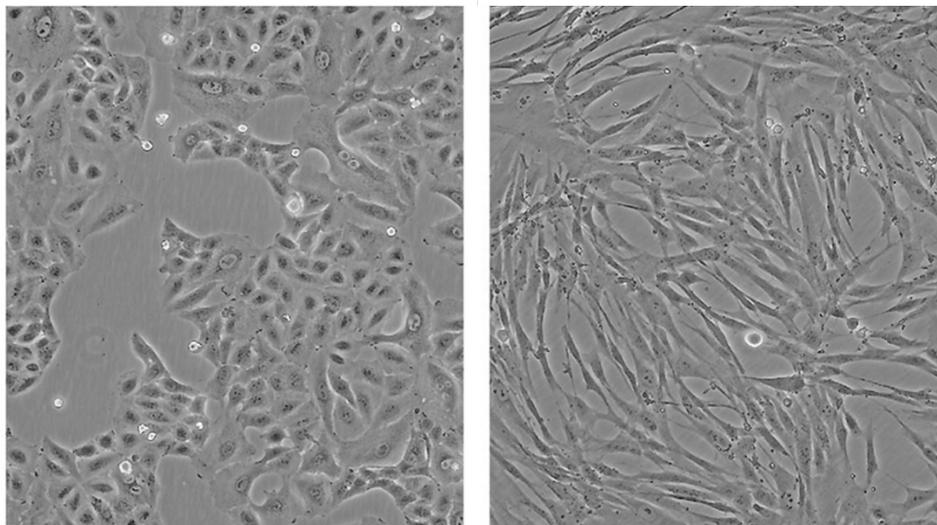
Todos los procedimientos realizados con animales de experimentación fueron previamente evaluados por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad de València, que aprobó la realización del procedimiento animal (**Anexo 2**).

### **1.4. Cultivos celulares**

#### 1.4.1. Cultivos de células inmortales

Para el presente trabajo se emplearon diferentes líneas celulares inmortalizadas de origen comercial :

- **Línea celular de epitelio renal embrionario 293 (HEK293).** La línea celular HEK293 fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC® CRL-1573™) y cultivada en placa con Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con 10% de FBS (suero bobino fetal), G418 0.4 mg/ml (Geneticina®, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) y puomicina 0.8 µg/ml (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado.
- **Línea celular epitelial basal alveolar humana adenocarcinómica (A549).** Se adquirió de American Type Culture Collection (ATCC® CCL-185™; Rockville, EE. UU.) Y se cultivó en DMEM complementado con 10% de FBS, 100 U / ml de penicilina / estreptomycin y 2,5 µg / ml de anfotericina B a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub> en el aire. Estas células se han utilizado ampliamente para modelar células ATI (figura 16).
- **Línea celular de fibroblastos de pulmón humano (MRC5).** Se adquirió de ATCC (ATCC® CCL-171™; Rockville, EE. UU.) Y se cultivó en DMEM complementado con 10% de FBS, 100 U / ml de penicilina / estreptomycin y 2,5 µg / ml de anfotericina B a 37°C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5% en aire (figura 16).



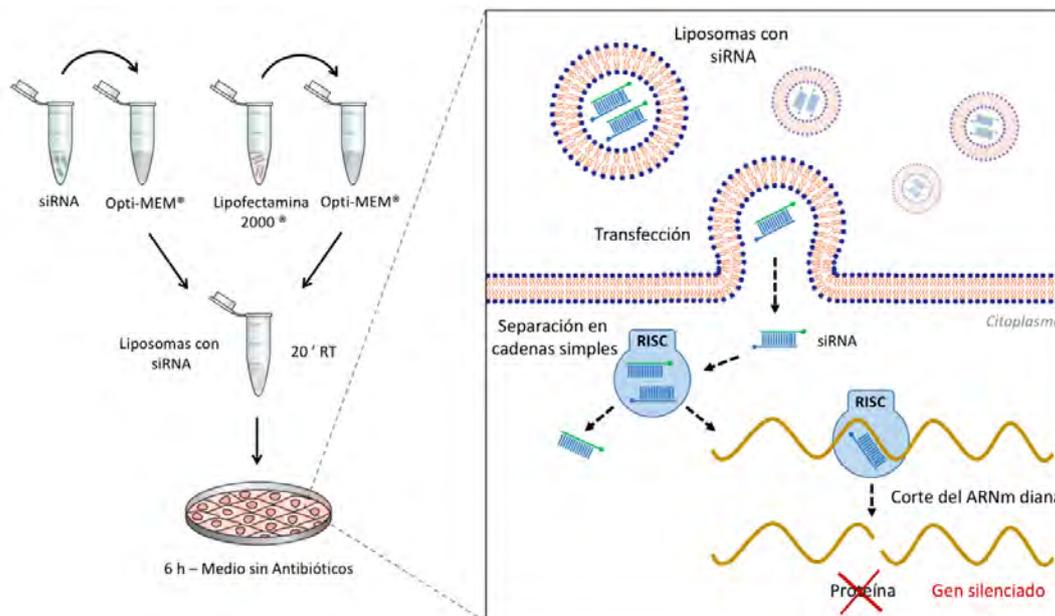
**Figura 16. Morfología de células inmortales A549 (izquierda) y MRC5 (derecha).** Las fotos muestran cultivos con alta densidad de células. Barra = 100 µm.

## 2. METODOS

### 2.1. *Silenciamiento génico mediante ARN interferente*

El small interfering RNA (siRNA) o ARN de interferencia es un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes específicos, de modo que pequeñas moléculas de ARN complementarias a un ARNm conducen a la degradación de éste, impidiendo su traducción en proteínas (**Figura 17**)

Para transfectar los siRNA al interior celular es necesario cargarlos dentro de liposomas capaces de fusionarse con la membrana celular. Así pues, se prepararon dos soluciones por separado: una solución que contenía el siRNA diluido en medio Opti-MEM® (las proporciones se pueden consultar en la **Tabla 6**); y una solución de Lipofectamina 2000® (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) diluida en medio Opti-MEM® e incubada 5 minutos a temperatura ambiente. Ambas soluciones se mezclaron suavemente y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió sobre las células a una confluencia del 90% y en medio libre de antibióticos, puesto que estos pueden interferir en la transfección. Se incubó a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado durante 6 horas (**Figura 17**). Pasado este tiempo se renovó el medio de cultivo y se incubaron 24 horas hasta el inicio del procedimiento experimental.



**Figura 17. Silenciamiento génico mediante ARN interferente.** En el lado izquierdo se ilustra el protocolo para generar liposomas con siRNA mediante Lipofectamina 2000®. Cuando se cultivan las células en presencia de estos liposomas (cuadro derecho) sus cubiertas lipídicas se fusionan con la membrana celular e introducen su contenido al citoplasma. Entonces el complejo RISC (RNA-induced silencing complex) provoca el desapareamiento de las dos hebras del siRNA y utiliza la hebra antisentido como guía para seleccionar el ARNm complementario de la hebra de siRNA presente en el complejo. Finalmente, RISC promueve el corte y posterior destrucción del ARNm diana, provocando la supresión de la expresión del gen.

En este trabajo se realizó silenciamiento génico para el gen de MUC4 (nº Ref. s9073) y con un ARN control negativo o siRNA(-) (nº Ref. AM4611); todos ellos fueron obtenidos de Ambion® (Huntingdon, Cambridge, UK).

En la siguiente tabla se concretan las proporciones de los compuestos descritos en el protocolo de silenciamiento, optimizadas según el tipo celular empleado. Los volúmenes se escalaron en función de la superficie de cultivo y el número de experimentos.

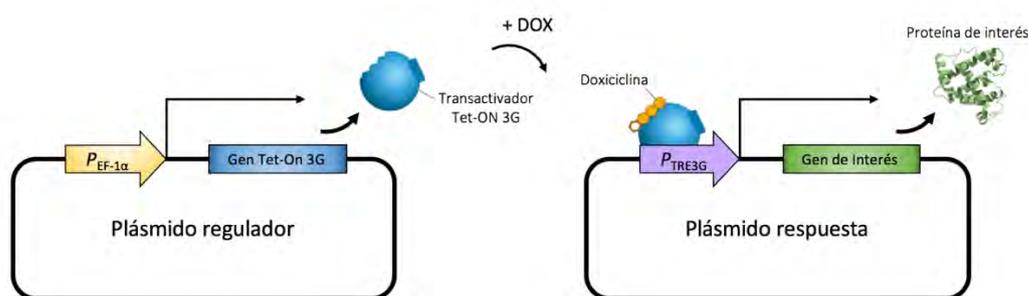
Línea celular	Área de cultivo	Células sembradas	Medio de cultivo	siRNA en Opti-MEM®	Lipofectamina 2000® en Opti-MEM®
A549	5 cm <sup>2</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>	DMEM (2 ml)	100 pmol / 200 µl	14 µl / 200 µl
MRC5	5 cm <sup>2</sup>	2 x 10 <sup>5</sup>	DMEM (2ml)	100 pmol / 200 µl	14 µl / 200 µl

**Tabla 6. Indicaciones del protocolo de silenciamiento según línea celular.**

## 2.2. Transformación de células HEK293 para la expresión inducible de MUC4 (HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4)

Con el fin de sobre-expresar la proteína MUC4 de una manera controlada y cuantificable se generó una línea estable de HEK293 que contenía un sistema de expresión génica inducible por Doxiciclina. Este sistema se denomina Tet-On® 3G Inducible Expression System y está comercializado por Clontech® Laboratories Inc. (cat. nº PT5148-1 010814).

El sistema consiste en un plásmido regulador y otro de respuesta. El plásmido regulador expresa de manera constitutiva la proteína transactivadora Tet-ON 3G, que sólo es activa en presencia de una tetraciclina. Cuando se activa se une a su promotor TRE3G presente en el plásmido de respuesta e induce la transcripción del transgen insertado en dirección 3' (**Figura 18**).

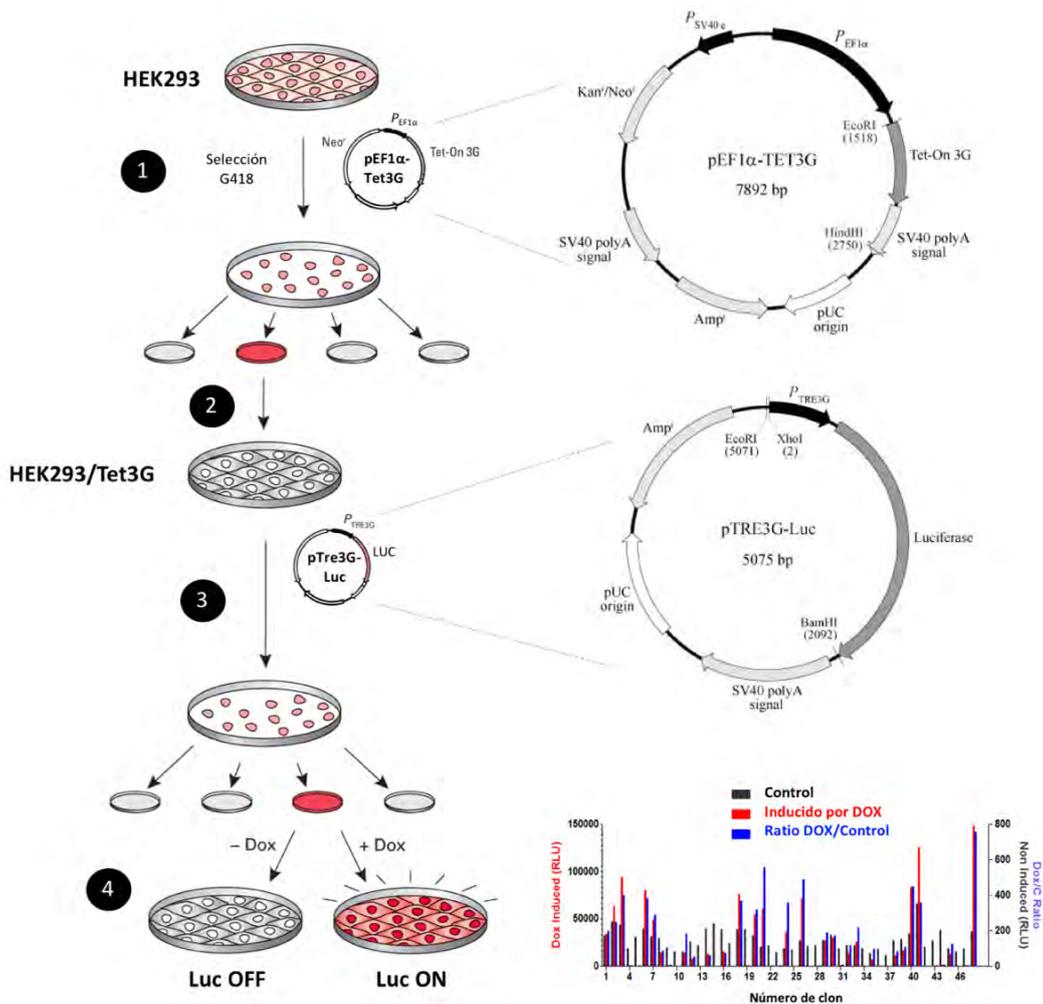


**Figura 18. Tet-On® 3G Inducible Expression System.** El plásmido regulador contiene un promotor que induce la expresión constitutiva de la proteína transactivadora Tet-On 3G, pero esta es incapaz de unirse al promotor TRE3G del plásmido respuesta en ausencia de doxiciclina (DOX). Cuando se une a doxiciclina (aportada en el medio de cultivo), el transactivador sufre un cambio conformacional que le permite unirse al promotor TRE3G y activar la transcripción del gen de interés.

Así pues, el primer paso para la transformación de las células HEK293 consistió en transfectar el plásmido regulador en varias colonias celulares y detectar las que tuvieran una inducción estable mediante un sistema reportero (**Figura 19**). En nuestro caso el plásmido regulador es el pEF-1 $\alpha$ -Tet3G, que contiene un promotor EF1-alfa derivado del gen humano EEF1A1 que expresa la subunidad alfa del factor de elongación eucariótico 1. Para transfectar este plásmido se prepararon dos soluciones por separado; una solución que contenía 2.4  $\mu$ g del plásmido pEF-1 $\alpha$ -Tet3G diluidos en 125  $\mu$ l de medio Opti-MEM®. Y una solución con 5  $\mu$ l de Lipofectamina 2000® (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) diluida en 125  $\mu$ l de medio Opti-MEM® e

incubada 5 minutos a temperatura ambiente. Ambas soluciones se mezclaron suavemente y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió en un pocillo de placa de seis con células HEK293 a una confluencia del 90% y 2 ml de medio DMEM + 10% FBS; se incubó a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado durante 40 horas.

Tras este periodo, las células fueron tripsinizadas y diluidas de forma seriada para cultivar en placas de 10 cm con medio selectivo durante 2 semanas. Este medio consistió en DMEM 10% FBS y 0.4 mg/ml de G418 (Geneticina®, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), un análogo de la Neomicina sulfato, que interfiere con la subunidad 80S de los ribosomas inhibiendo la síntesis proteica en células eucariotas. Puesto que el plásmido pEF-1 $\alpha$ -Tet3G contiene el gen de resistencia a Neomicina (Neo<sup>r</sup>) aquellas colonias celulares que proliferaron habían sido correctamente transfectadas. De estas colonias se seleccionaron 80 clones con un cilindro de clonaje. Cada clon se repartió en tres siembras en placas de 96 pocillos; una siembra se mantuvo en cultivo, mientras que las otras dos se transfectaron con el plásmido reportero pTRE3G-Luc. Este sistema reportero contiene el promotor pTRE3G, inducible por la proteína Tet-On 3G, seguido del gen de la Luciferasa en 3'. 24 horas tras la transfección, una siembra se incubó con 1  $\mu$ g/ml de doxíciclina (inducida) y la otra sin (no inducida) durante otras 24 horas. Entonces se midió la emisión fluorescente de la Luciferasa mediante el kit Genecopoeia Firefly Luciferase (Luc-Pair™ Firefly Luciferase HS Assay Kit, cat. nºLF007, Genecopoeia, Inc.). El clon que mostró la mayor actividad Luciferasa inducida por doxíciclina se seleccionó como línea celular HEK293/Tet3G.



**Figura 19. Generación y comprobación de la línea HEK293/Tet3G.** 1, las células HEK293 se transfectan con el plásmido regulador pEF1 $\alpha$ -Tet3G y se cultivan con G418. El plásmido contiene un gen de resistencia a Neomicina (Neo<sup>r</sup>) y el promotor pEF1 $\alpha$  que transcribe de manera constitutiva el gen Tet-On 3G. 2, los clones resistentes a G418 se seleccionan y expanden como línea HEK293-Tet3G. 3, las células HEK293-Tet3G se transfectan con un sistema reportero pTRE3G-Luc que induce la expresión de Luciferasa por el promotor Tre3G. 4, se comprueba la capacidad inductora del sistema Tet-On 3G; en presencia de doxiciclina se induce la expresión de Luciferasa, cuya actividad genera fluorescencia medible mediante un kit comercial. En la gráfica se observan las fluorescencias emitidas por cada clon en presencia y ausencia de doxiciclina, de manera que el mayor ratio de fluorescencia entre ambas condiciones corresponde al clon con una mayor efectividad del sistema de inducción Tet-On 3G.

Seguidamente se volvió a la siembra restante (sin pTRE3G-Luc) del clon HEK293/Tet3G seleccionado y se expandió. Después se co-transfectaron, con el mismo método descrito previamente, 2.4  $\mu$ g de el plásmido CS-H2247-pTRE3G y 0.12  $\mu$ g de un marcador lineal SV40 de Puromicina. El plásmido CS-H2247-pTRE3G



### **2.3. Ensayo de proliferación**

La proliferación de fibroblastos se midió mediante un inmunoensayo colorimétrico basado en la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN utilizando un kit BrdU de ensayo de inmunoabsorción celular (ELISA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, las células se sembraron en placas de 96 pocillos en 200  $\mu$ l de medio FBS al 10% (sin antibióticos) y se incubaron durante 24 horas. La placa se incubó a 37 ° C en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5%. Al día siguiente, las células se transfectaron con un control negativo siRNA(-) o siRNA-MUC4 $\beta$  y se incubaron a 37 ° C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% durante 48 horas. Después de este tiempo, las células se incubaron con pirfenidona / GO-201 durante 30 minutos, seguido de TGF- $\beta$ 1 y un 10% de estimulación con FBS durante 24 horas. Después de la estimulación, se añadió BrdU a las células y las células se volvieron a incubar durante 24 horas. Durante este tiempo, el análogo de pirimidina BrdU se incorpora en lugar de timidina en el ADN de las células en proliferación. Después de esto, las células se fijaron y el ADN se desnaturalizó agregando FixDenat del kit, las células se incubaron con anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y finalmente se usó tetrametilbencidina (TMB) como sustrato de reacción. La absorbancia a 490 nm se cuantificó utilizando un espectrofotómetro de microplacas Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer). Los datos de proliferación se refieren a los valores de absorbancia del contenido de ADN celular marcado con BrdU por pozo.

### **2.4. Senescencia celular**

Células epiteliales basales alveolares humanas adenocarcinómicas (A549) y células de fibroblastos de pulmón humano (MRC5) silenciadas para MUC4 $\beta$ , se trataron con pirfenidona durante 30 minutos y se estimularon con TGF $\beta$ -1 durante 48 h. Después de eso, se usó el kit de tinción histoquímica de células de senescencia siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, este kit es una herramienta de detección preliminar del comportamiento senescente basado en una tinción histoquímica para la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa a pH 6. En estas condiciones, la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa es fácilmente detectable en las células senescentes, pero no es detectable en células quiescentes, inmortales o tumorales. En primer lugar, las células se lavaron con PBS, proporcionado por el kit, y se fijaron con el tampón de fijación proporcionado por el kit (20% de formaldehído; 2% de glutaraldehído; 70,4 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 14,7 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,37 M de NaCl y 26,8 mM de KCl ) Durante 6–7

minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se tiñeron con la mezcla de tinción proporcionada por el kit y se incubaron a 37 ° C sin CO<sub>2</sub> durante la noche. Finalmente, se observaron células bajo un microscopio Leica DM6000B para contar las células teñidas de azul y el número total de células en cada campo. Los resultados se expresaron como % de células senescentes (células positivas para β-galactosidasa azul) / número total de células en cada campo.

## **2.5. Inmunofluorescencia celular**

Después de los experimentos in vitro correspondientes, las células A549 y las MRC5 se fijaron con metanol durante 5 minutos a -20°C. Después de eso, las células se permeabilizaron con 0,1% de Triton X-100 / PBS durante 8 minutos y se bloquearon (3% de BSA / PBS) durante 1 hora. Después de esto, las células se incubaron con los anticuerpos primarios durante la noche a 4 ° C, seguidos de las etapas de lavado con PBS y los anticuerpos FITC (Isotiocianato de fluoresceína) o rodamina conjugados anti-ratón / conejo / cabra inmunoglobulina G, incubación durante dos Horas a 4°C. Después de lavar los pasos con PBS, se usaron 2 µg / ml de 4', 6-Diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI) para marcar los núcleos durante 3 minutos. Finalmente, las preparaciones celulares se montaron con medio de montaje de inmunofluorescencia.

La colocalización de MUC4β / fosfo (p) -Smad2 / 3 y MUC4β / activo (act) -β-catenina se realizó utilizando un microscopio Leica TCS SP2 espectral confocal con x 1000 aumentos y 3 x zoom. Se utilizaron láseres rojo (HeNe 543 nm), verde (HeNe 488 nm) y azul (Ar 351 nm, 364 nm). Los estudios de colocalización se realizaron con el software confocal Leica v2.61. Las imágenes celulares con puntos colocalizados de los dos canales láser se transformaron en un color blanco en la imagen celular.

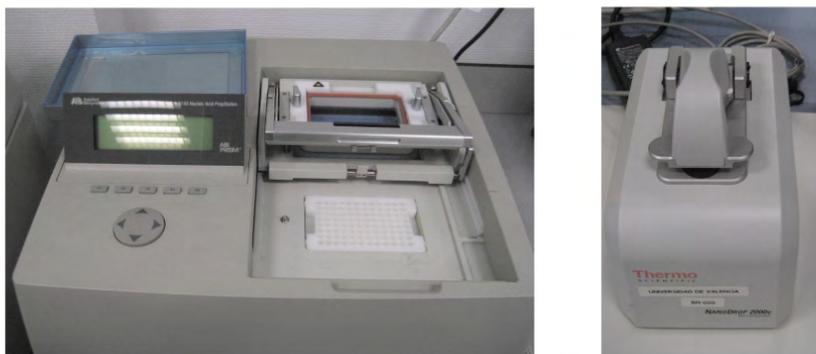
## **2.6. Estudio de la expresión génica**

### **2.6.1. Extracción de ARN total y cuantificación**

Para aislar el ARN total de células en cultivo 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) (**Figura 21**), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para aislar el ARN total de las muestras de tejido 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. Las muestras conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en 0.5 ml de Trizol se descongelaron y se disgregaron con el sistema Tissuelyser II (Qiagen) empleando bolas de hierro. En la suspensión con Trizol 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  $\mu\text{l}$  de glicógeno. Tras una centrifugación de 5 minutos a 7500 rpm, se resuspendió el ARN en 20  $\mu\text{l}$  de agua DEPC en un Termobloque seco a  $60^{\circ}\text{C}$ , 10 minutos.

Una vez resuspendido, se determinó la concentración del ARN extraído mediante el espectrofotómetro *NanoDrop 2000C* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), (**Figura 21**) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema permitió determinar la concentración del ARN total ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) mediante medidas de absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) y 280 nm ( $A_{280}$ ), a partir del espectro de absorción de las muestras. También se obtuvo el valor de la pureza de las muestras, determinado por el ratio  $A_{260}/A_{280}$ .



**Figura 21- Extracción de ARN total y cuantificación.** izquierda: Sistema ABI Prism TM 6100 Nucleic Acid Prep Station para la extracción de ácidos nucleicos. Derecha: Espectrofotómetro NanoDrop 2000C para la cuantificación de ácidos nucleicos.

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  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### 2.6.2. Transcripción reversa (RT)

En la reacción de transcripción reversa o retrotranscripción (RT), la enzima transcriptasa inversa sintetiza ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) a partir de un ARN mensajero molde (**Figura 22**). Este paso fue necesario para realizar la cuantificación de la expresión génica por PCR a tiempo real.

Tomando en consideración la cuantificación del ARN extraído, se transformó un total de 300 ng de ARN en ADNc utilizando el kit TaqMan® para la transcripción inversa. Se realizó este proceso en un termociclador *9800 Fast Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, EEUU) (**Figura 22**) 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.



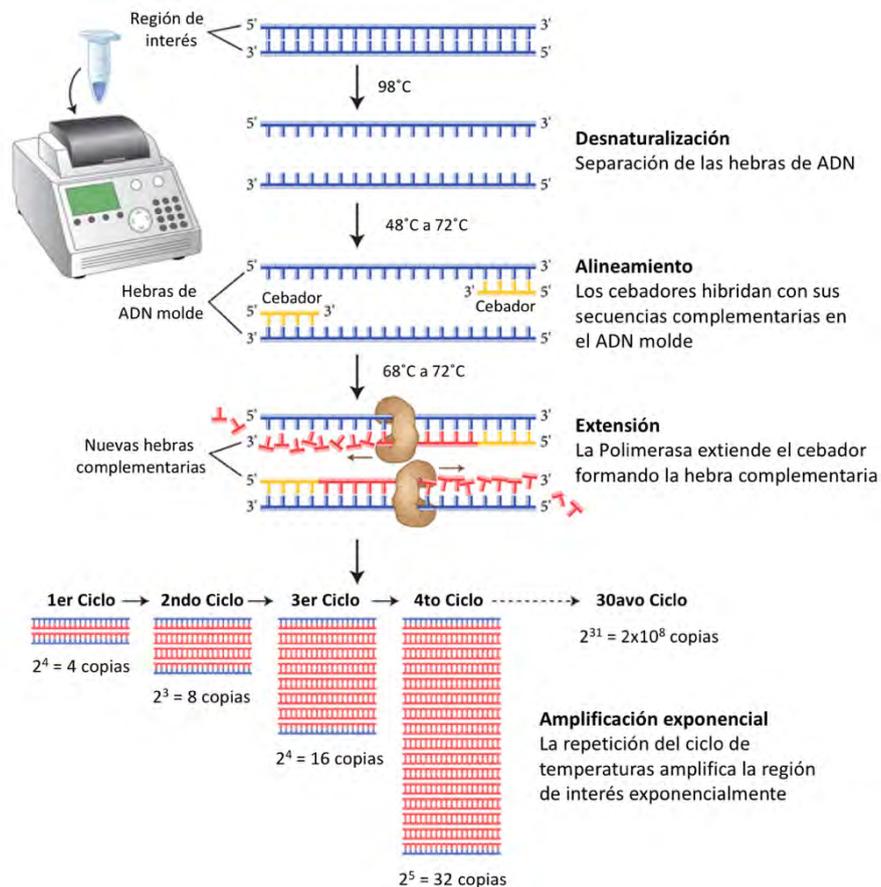
**Figura 22. Transcripción reversa.** La fotografía de la izquierda muestra el Termociclador 9800 Fast Thermal Cycler empleado para la reacción de transcripción reversa. La figura de la derecha muestra las etapas de la reacción.

### 2.6.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

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 a diferentes temperaturas:

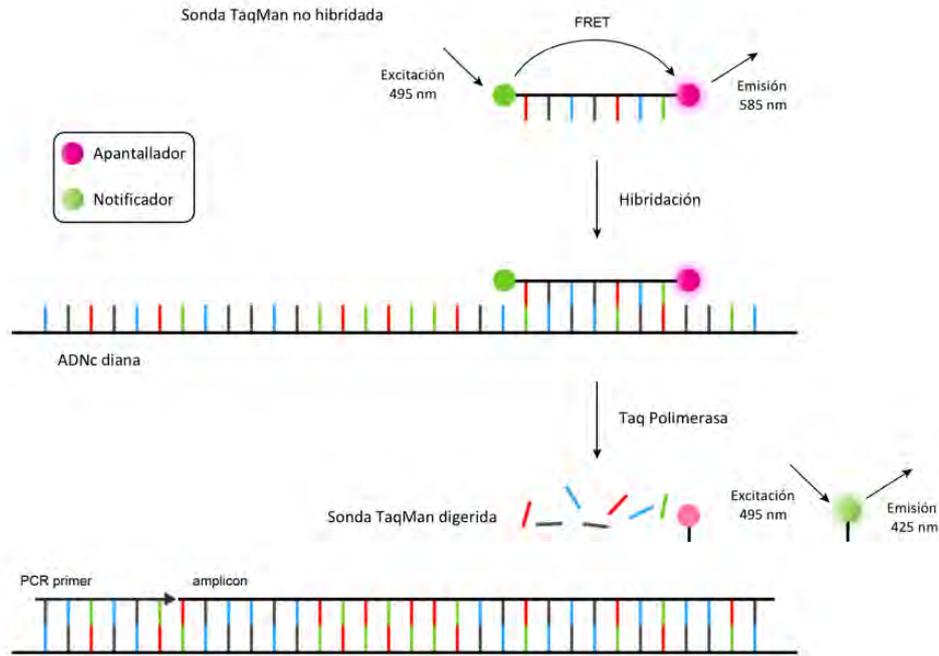
- Desnaturalización del ADN molde (98°C)
- Hibridación de cebadores (48°C a 72°C)
- Extensión (68°C a 72°C)

Cada repetición del ciclo produce un aumento exponencial en el número de copias de ADN de la región de interés (**Figura 23**).



**Figura 23. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

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 TaqMan®*, 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 siguiente figura (**Figura 24**):



**Figura 24. Sistema TaqMan® de cuantificación fluorométrica de la expresión génica.** La sonda TaqMan® no hibridada contiene una molécula notificadora en 5' y una apantalladora en 3'. El equipo de PCR excita la muestra con una longitud de onda de 495 nm, que genera una emisión en el notificador que mediante el fenómeno de transmisión de energía de resonancia (FRET) es absorbido por el apantallador. Una vez hibridada con su ADNc diana, la Taq Polimerasa digiere la sonda durante la polimerización de la hebra complementaria, liberando la molécula notificadora y permitiendo que emita fluorescencia a una longitud de onda de 425 nm, detectable por la PCR. De este modo, la fluorescencia detectada será proporcional al número de copias de ADNc presentes en la muestra e hibridadas con la sonda TaqMan®.

La existencia de estas sondas fluorogénicas permite la detección en tiempo real únicamente de los productos de amplificación específicos. En la siguiente tabla (**tabla 7**), se enumeran las *Sondas de Expresión Génica TaqMan®* utilizadas para el estudio de la expresión de los genes de interés en este trabajo.

Gen	Referencia	Longitud del amplicón pares de bases (pb)
<b>MUC4</b>	Hs00366414_m1	55
<b>Colágeno tipo I</b>	Hs00164004_m1	85
<b>Slug</b>	Hs00161904_m1	102
<b>Snail</b>	Hs00195591_m1	65
<b>E-cadherina</b>	Hs01023894_m1	95
<b>A-SMA</b>	Hs00559403_m1	75
<b>p16</b>	Hs00923894_m1	76
<b>p21</b>	Hs01040810_m1	89
<b>TGFβRI</b>	Hs00610320_m1	105
<b>TGFβRII</b>	Hs00234253_m1	111
<b>CTGF</b>	Mm01192933_g1	94
<b>TGFβ1</b>	Mm01178820_m1	73
<b>IL-13</b>	Mm00434204_m1	79
<b>MUC5B</b>	Mm00466391_m1	85
<b>NOX4</b>	Mm00479246_m1	93
<b>Nrf2</b>	Mm00477784_m1	86
<b>GAPDH</b>	4352339E	107

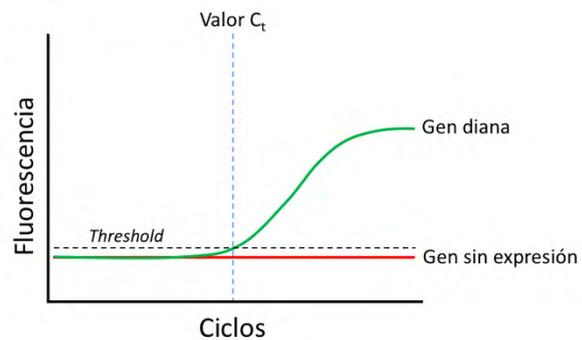
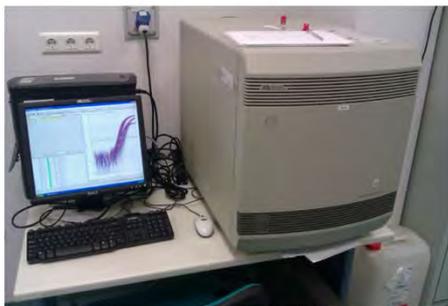
**Tabla 7. Sondas de Expresión Génica TaqMan® utilizados en la PCR a tiempo real.**

Cada reacción de PCR contenía los siguientes componentes:

- 1 µL de ADNc sintetizado en la transcripción reversa
- 5 µL de *TaqMan® Gene Expression Master Mix*
- 0,5 µL de la sonda *TaqMan®* del gen a analizar
- 3,5 µL de agua DEPC.

El proceso de PCR-RT 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 y 45 ciclos formados por las siguientes etapas: 10 minutos a 95°C (desnaturalización), 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C (Hibridación y extensión).

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 (**Figura 25**). Para medir la expresión de un determinado gen se utilizó el ciclo umbral (Ct), ciclo en el que la fluorescencia supera el umbral o threshold. El threshold es el nivel determinado automáticamente o manualmente y fijado en la región exponencial de la gráfica de amplificación; por encima de esta línea el nivel de fluorescencia se considera significativamente superior a la fluorescencia basal. Cuantas más copias haya de ARNm de partida del gen estudiado, más ADNc se obtendrá en la transcripción reversa y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.



**Figura 25. PCR a tiempo real.** En la fotografía de la izquierda se observa el Termociclador 7900HT Fast Real-Time PCR System utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR). La figura de la derecha corresponde a la gráfica obtenida tras el proceso de RT-PCR, en la que el gen diana ha sido amplificado. Mediante el Software RQ Manager se determina la posición del Threshold, que corta la curva de amplificación por el valor  $C_t$ , proporcionando un dato numérico de la expresión génica.

La cuantificación relativa de los distintos genes se realizó con el método de comparación de Ct, utilizando el gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen housekeeping y el grupo control como calibrador.

En este método se utiliza la siguiente ecuación:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{experimental}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$$

Siendo:

$$\Delta Ct_{\text{experimental}} = (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ housekeeping}) \text{ de la muestra}$$

$$\Delta Ct_{\text{calibrador}} = \frac{\sum Ct \text{ Housekeeping}}{n} \text{ del grupo control}$$

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 housekeeping sea aproximadamente igual. Para comprobarlo se estudió cada muestra por duplicado, obteniendo dos valores Ct (ciclo umbral), cuya media se consideró válida cuando su desviación estándar fue  $\leq 1$ . En las gráficas de expresión génica se expresó como valor  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  que equivale a la expresión relativa del ARNm de un determinado gen.

#### 2.6.4. Estudio de la expresión proteica

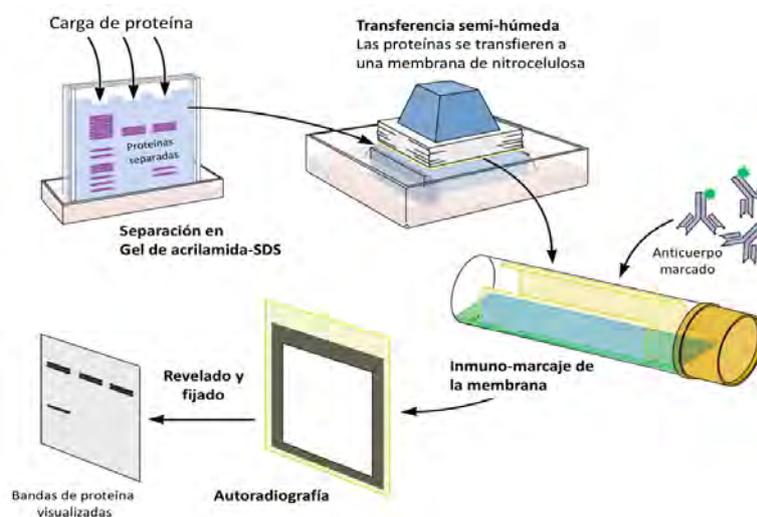
##### 2.6.4.1. Western Blot

La técnica de Western Blotting permite detectar y cuantificar una proteína específica en una mezcla compleja de proteínas; en el presente trabajo fue utilizada para detectar cambios en la expresión proteica tanto en células como en tejido.

En células en cultivo, el aislamiento de la proteína total se realizó lisando y homogeneizando la muestra en hielo con el Buffer C (20 mM Tris base, 0.9% NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM Ditiotretitol, 1 mg/ml Pepstatina A, 1 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)) complementado con un cóctel de Inhibidores de proteasas (n° Cat. P8340, Sigma Aldrich) y Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (n° Cat. 36978, Thermo Fisher). En otros casos se extrajo por separado la proteína nuclear y citoplasmática con el kit de extracción *Nuclear active motif kit* (Active Motif, Europa, Rixensart, Bélgica) de acuerdo al protocolo del fabricante.

En el caso de las muestras de pulmón de ratón, que habían sido congeladas previamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  en seco, se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de Buffer C. Seguidamente se disgregaron en el sistema Tissuelyser II (Qiagen®) con bolas de hierro a una frecuencia de 30 Hz durante 3 minutos. Los disgregados se pasaron a nuevos eppendorfs y se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 min. Se descartó el sedimento, mientras que el sobrenadante se sometió a tres ciclos de choque térmico por congelación-descongelación con  $\text{N}_2$  líquido y con agitación a  $37^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. A continuación, se le adicionó el detergente NP40 al 1% y durante 15 minutos se mantuvo en hielo con agitación enérgica cada 5 minutos. Finalmente se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se recogió el sobrenadante para determinar la concentración de proteína total mediante el kit del método de ácido bicinconínico (BCA). El ensayo BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU) fue utilizado, siguiendo las instrucciones del fabricante, para cuantificar el nivel de proteína y así garantizar una cantidad equivalente de proteína cargada para cada muestra.

Para detectar la presencia del epítipo deseado se separaron las proteínas de acuerdo a su peso molecular mediante electroforesis en gel de acrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS). Para ello primero se desnaturalizaron las proteínas en presencia de buffer de carga SDS-PAGE (1:1 en volumen) a 95°C, 10 minutos. 15 o 20 µg de la proteína desnaturalizada y del marcador de peso molecular *Amersham High-Range Rainbow* se cargaron en los pocillos de un gel de poliacrilamida (**Figura 26**), formado por un gel de apilamiento (acrilamida al 5%) situado encima de un gel de resolución (acrilamida al 10%). Se aplicó al gel una corriente eléctrica de 100V durante 1 hora, provocando que las proteínas migrasen a su través. Posteriormente, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa *Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane (Amersham GE Healthcare)* utilizando un método de transferencia semi-húmeda (Figura). La membrana con las proteínas fue bloqueada con BSA o Leche al 5% en PBS o TBS (solución salina tamponada) con 0,1% de TWEEN®20 durante 2 horas e incubada con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación, se lavó la membrana y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 8**), conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora. Las proteínas marcadas se detectaron realizando autoradiografías (**Figura 26**) en cámara oscura con película fotográfica (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), que recoge la emisión de quimioluminiscencia inducida por el kit ECL plus (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). La densitometría de las películas se midió mediante Image J 1.42q software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, USA). Los resultados se expresaron como ratios respecto a controles endógenos de  $\beta$ -Actina, ERK1/2 total o p38 según corresponda, y normalizados respecto al grupo control.



**Figura 26. Esquema de la técnica de Western Blotting.**

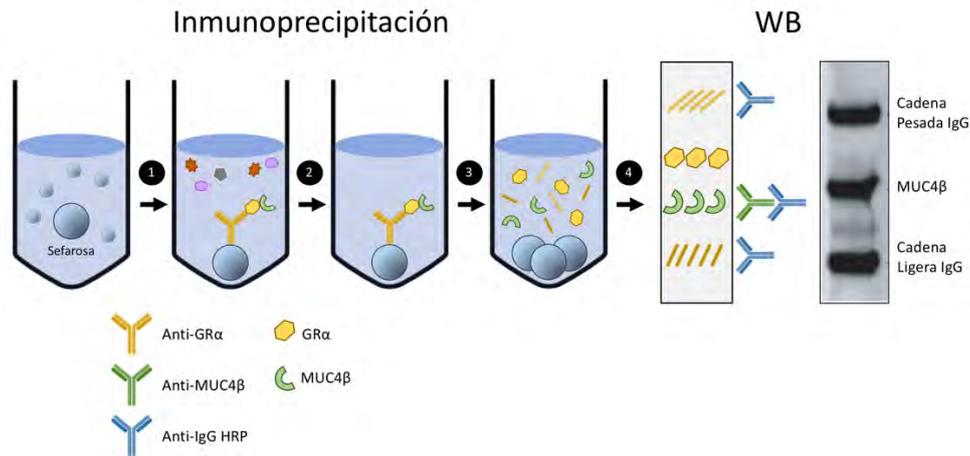
Epítopo	Origen	Referencia	Dilución	Buffer
<b>α-SMA</b>	Conejo	Sigma (A5228)	1:1000	BSA 5% / PBST
<b>Colágeno tipo I</b>	Conejo	Calbiochem (234167)	1:1000	BSA 5% / PBST
<b>MUC4β</b>	Conejo	Novus (NBP1-52193)	1:1000	BSA 5% / PBST
<b>fosfo-ERK1/2</b>	Ratón	Sigma Aldrich (M9692)	1:1000	BSA 5% / TBST
<b>ERK1/2</b>	Conejo	Cell Signaling (4695)	1:1000	BSA 5% / PBST
<b>E-cadherina</b>	Ratón	ECM BioScience (CM1681)	1:1000	BSA 5% / PBST
<b>phospho-TGFβRI</b>	Ratón	Invitrogen (PA5-40298)	1:1000	BSA 5% / PBST
<b>phospho(p)-SMAD2/3</b>	Conejo	Millipore (PS1023)	1:1000	BSA 5% / PBST
<b>SMAD2/3</b>	Conejo	Calbiochem (566414)	1:1000	BSA 5% / PBST
<b>TGFβ</b>	Ratón	Cell signalling (3709S)	1:1000	BSA 5% / PBST
<b>CTGF</b>	Ratón	Santa cruz (SC-34772)	1:1000	BSA 5% / PBST
<b>P21</b>	Conejo	Novus biologicals (NB100-1941)	1:1000	BSA 5% / PBST
<b>β-catenina (Ser33/37/Thr41)</b>	Ratón	Cell signalling (8814S)	1:1000	BSA 5% / PBST
<b>IL-6</b>	Ratón	Novus Biologicals (NBP1-77894)	1:1000	BSA 5% / PBST
<b>NOX4</b>	Conejo	Novus Biologicals (NB110-58849)	1:1000	BSA 5% / PBST
<b>IL-13</b>	Cabra	R&D (AB-413-NA)	1:500	Leche 5% / PBST
<b>β-Actina</b>	Ratón	Sigma Aldrich (A1978)	1:10000	Leche 5% / PBST
<b>HRP - IgG (H+L) Conejo</b>	Burro	Thermo Sci. (SA1-100)	1:10000	BSA 5% / PBST
<b>HRP - IgG (H+L) Ratón</b>	Burro	Thermo Sci. (SA1-200)	1:10000	BSA 5% / PBST
<b>HRP - IgG (H+L) Cabra</b>	Conejo	Thermo Sci. (31402)	1:10000	BSA 5% / PBST

**Tabla 8:** Anticuerpos primarios y secundarios para Western Blotting. HRP: peroxidasa de rábano.

#### 2.6.4.2. Inmunoprecipitación

Una cantidad similar (200µg) de proteína total, citoplasmática o nuclear fue incubada con 2 µg de los anticuerpos anti-GRα, anti-MUC4β o el isotipo control IgG. Los inmunocomplejos se precipitaron con proteína G en microesferas de *Sepharose 4B fast*

*flow* (Sigma (P-3296)) toda la noche a 4°C. Tras 3 lavados con NET buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, y 0.1% Nonidet P-40) (Figura 26), el material unido se aisló de los inmunoprecipitados en buffer de carga SDS-PAGE (10% SDS, 1 M Tris-HCl, pH 6.8, 50% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 2% bromophenol blue) a 100°C durante 10 minutos. Los complejos proteicos inmunoprecipitados fueron analizados por western blot como se ha descrito previamente y expuestos a los anticuerpos anti-GR $\alpha$  o anti-MUC4 $\beta$  según correspondiera (**Figura 27**).



**Figura 27. Esquema de la técnica de Inmunoprecipitación de complejos GR $\alpha$ -MUC4 $\beta$**

## 2.7. Estimulación *in vitro*

Todos los estudios *in vitro* tuvieron por objetivo determinar la efectividad antifibrótica de perfenidona sobre estímulo de TFG $\beta$ .

## 2.8. Modelo animal de fibrosis

El modelo animal de fibrosis se generó mediante la instilación única IT de una dosis de 1,5 U / kg de bleomicina en ratones C57BL/6 de tipo salvaje (WT) y ratones MUC4-KO. Este protocolo, replica efectivamente varios de los cambios moleculares patógenos específicos asociados con la FPI, y puede ser el mejor utilizado como modelo para pacientes con enfermedad activa. Se ha observado que esta dosis de bleomicina generó reproduciblemente fibrosis pulmonar en experimentos previos. El objetivo de este protocolo fue comparar la diferencia entre los ratones WT C57BL/6 y los ratones MUC4-KO en la progresión de la fibrosis pulmonar. Se han utilizado varias técnicas

para lograrlo: análisis, histología, cuantificación de citoquinas y análisis de expresión de genes y proteínas.

Se utilizarán 28 ratones macho C57BL/6 de 12 semanas de edad divididos en 4 grupos homogéneos (n=7):

1. Wild type control
2. Wild type FPI
3. siRNA MUC4 control
4. siRNA MUC4 FPI

Los animales permanecieron siete días en cuarentena previamente al inicio del experimento (periodo de aclimatación). Además, fueron estabulados a lo largo de todo el estudio con comida (dieta Harlan® Ref. 2014) y agua *ad libitum*. Se repartieron de forma aleatoria en jaulas y éstas a su vez en grupos experimentales distintos. Para realizar un seguimiento individualizado de cada ratón, se identificó al animal mediante crotales insertados en la oreja numerados consecutivamente. Las condiciones estándar del animalario fueron:

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

El procedimiento de “Inducción de fibrosis pulmonar por bleomicina en ratón en un modelo de silenciamiento génico transitorio de MUC4”, se llevará a cabo a día 0 el silenciamiento transitorio del gen muc4 mediante inyección simultánea intravenosa e intranasal de un siRNA dirigido al gen muc4 (siRNA-muc4) (**Tabla 9**).

Producto*	Vía	Volumen (ml)	Diámetro de aguja o de la sonda (G)	Concentración (mg/ml)
Bleomicina	Intratraqueal	0,2	Catéter flexible	15 UI/ml
<sup>18</sup> F-FDG	Intraperitoneal	0,2	25	
siRNA(-)/glucosa	Intravenoso	0,2	25	0,2 mg/ml
siRNAmuc4/glucosa	Intravenoso	0,2	25	0,2 mg/ml
siRNA-control/PBS	Intranasal	0,02	Pipeta automática	2,5 mg/ml
siRNA-muc4/PBS	Intranasal	0,02	Pipeta automática	2,5 mg/ml

**Tabla 9. Inducción de fibrosis pulmonar por bleomicina en ratón en un modelo de silenciamiento génico transitorio de MUC4**

En el caso de la inyección intravenosa, tanto el siRNA-muc4 como el siRNA inespecífico empleado como control, se administrarán en forma de complejo lipídico siRNA/polietilenimina (PEI) acompañado de glucosa 5%. Dicha inyección tendrá lugar a nivel de la vena lateral de la cola. Por contra, en el caso de la administración nasal, el siRNA será diluido en PBS. Este paso se repetirá de manera reiterada cada 72h a lo largo del procedimiento. En el día 1, se inducirá la fibrosis pulmonar mediante administración intratraqueal de Bleomicina (dosis en función del peso). Para ello se anestesiara al animal mediante anestesia inhalatoria con Isoflurano (Aerrane®) y manteniendo la misma se procederá a la intubación de la tráquea. El animal será colocado en posición decúbito esternal, se abrirá la boca y separando la lengua hacia un lado, se introducirá un otoscopio (Riestar®) para facilitar la visualización de la entrada de la tráquea. Una vez localizada, se introducirá una guía (pelo metálico), que facilitara la entrada de cánula de 16G a través de la cual se instilará un volumen de solución salina de sulfato de bleomicina en dosis única de 0,975 UI/Kg. La administración de Bleomicina se realizará mediante jeringas estériles de insulina (BD Plastipak® 1 mL). Tras la administración se insuflará 1 mL de aire para facilitar el arrastre del producto y asegurar la correcta administración del producto. Los animales del grupo control recibirán el mismo volumen de solución salina libre de bleomicina. Para el seguimiento animal se medirá la Enhanced Pause (Penh) utilizando un pletismógrafo de cuerpo entero (no invasivo) del Departamento de Farmacología de la UV. A día 21 se realizarán las necropsias y el LBA para valorar la fórmula leucocitaria.

La función pulmonar se midió como la pausa respiratoria mejorada al inicio (Penh) al comienzo (día 0) y al final (día 14) del procedimiento. A lo largo del procedimiento, se anotó el número de muertes y el porcentaje de supervivencia de cada grupo se representó mediante el gráfico de Kaplan-Meier.

### *2.8.1. Función pulmonar*

La función pulmonar se midió como la línea de base de Penh en ratones conscientes no restringidos utilizando pletismografía de cuerpo entero (**Figura 28**) (Pletismografía de cuerpo entero de animales pequeños de Buxco, aparato de Harvard, Minnessota, EE. UU.). Los ratones se colocaron en la cámara y se dejaron equilibrar durante aproximadamente 30 minutos. Penh se calculó mediante la fórmula:  $Penh = (Te / Rt-1) \times (PEF / PIF)$ , donde Te es el tiempo espiratorio (segundos); Rt es el tiempo de relajación (segundos), definido como el tiempo de caída del "volumen" hasta el 35% de

la señal de presión espiratoria total (área debajo de la señal de presión de la caja al vencimiento); PEF es el flujo espiratorio máximo (ml / segundo); y PIF es el flujo inspiratorio máximo (ml / segundo), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Penh refleja los cambios en la forma de onda de la señal de presión de la caja durante la inspiración y la espiración, y combina estos cambios con la comparación de tiempo de la espiración temprana y tardía durante la respiración espontánea del animal. Penh se midió durante 10 minutos para cada experimento y se muestra el valor medio.



*Figura 28. Pletismografo BUXCO para animal pequeño.*

## **2.9. Histología**

### **2.9.1. Fijación tisular y deshidratación.**

Los tejidos pulmonares humanos y de ratón se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 48 h. A continuación, se deshidrataron las muestras (**Tabla 10**) y se insertaron en bloques de parafina utilizando el embebedor de parafina My3 EC150-1 (Leica Geosystems). Finalmente, los bloques de parafina se cortaron en secciones de 5  $\mu$ m de espesor utilizando un microtomo HM 340 E (Leica Geosystems).

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de repeticiones</b>
<b>Paraformaldeido 4%</b>	48 horas	x1
<b>Etanol 70%</b>	60 minutos	x1
<b>Etanol 95%</b>	60 minutos	x2
<b>Etanol 100%</b>	60 minutos	x3
<b>Xileno</b>	60 minutos	x2
<b>Parafina</b>	24 horas	x1

*Tabla 10. Protocolo de fijación y deshidratación de tejido pulmonar.*

### 2.9.2. Análisis inmunohistoquímico

Para el análisis inmunohistoquímico de pulmones humanos y de ratón, las secciones de tejido se desparafinaron e hidrataron en primer lugar. Después de eso, para evitar la actividad endógena de la peroxidasa, se incubaron secciones de pulmón en agua destilada al 3% / metanol durante 20 minutos y se lavaron con Tween 20 al 0,1% / solución salina tamponada con Tris (Tris 0,05 M; cloruro de sodio 0,15 M, pH 7,6 a 25°C. ° C) (TBST). Se realizó una recuperación de antígeno inducida por calor utilizando un tampón de citrato de sodio 0,01 M (citrato de sodio 10 mM dihidratado, 0,1% de Nonidet™ P 40, pH = 6, 100°C, 20 minutos). Las membranas celulares se permeabilizaron utilizando Triton X 100 / PBS al 0,1% durante 10 minutos, y los sitios de unión no específicos en la muestra de tejido se bloquearon con FBS / PBS al 5% durante 1 hora después del lavado con tampón TBST. A continuación, las secciones de pulmón se incubaron con anticuerpos primarios (**Tabla 11**) durante la noche a 4 ° C. Después del lavado con TBST, se utilizó un kit Master Polymer Plus HRP del sistema de detección Master Polymer Plus para la inmunohistoquímica durante 30 minutos. El sustrato utilizado, después del lavado con TBST, fue 3'-diaminobenzidina (DAB) durante unos segundos. Finalmente, las secciones se tiñeron con hematoxilina durante 15 segundos y se deshidrataron para montar con DPX. El control de isotipo IgG no inmune se utilizó como control negativo y dio negativo para todas las muestras. Se observaron muestras en el microscopio Nikon Eclipse TE200 y se muestra una imagen representativa de cada condición.

Epítipo	Referencia	Dilución	Tampón
<b>MUC4β</b>	Novus biologicals (NBP1-52193)	1:100	BSA 0.1%/TBST
<b>p-Smad3</b>	Millipore (PS1023)	1:100	BSA 0.1%/TBST
<b>p-TGFβR1</b>	Invitrogen(PA5-40298)	1:100	BSA 0.1%/TBST
<b>CTGF</b>	Santa Cruz Biotechnology (SC-34772)	1:100	BSA 0.1%/TBST

**Tabla 11. Anticuerpos primarios utilizados en el análisis inmunohistoquímico.** TGFβR1: receptor 1 del factor de crecimiento transformante β1; CTGF: factor de crecimiento del tejido conectivo; BSA: albúmina de suero bovino; TBST: solución salina tamponada con Tween 20 / Tris al 0,1% (TBS, Tris 0,05 M; cloruro de sodio 0,15 M, pH 7,6, a 25 ° C).

### 2.9.3. La tinción tricrómica de Masson

Las secciones de tejido pulmonar de ratón se tiñeron con el kit de tinción tricrómica de Masson para detectar la deposición de colágeno y para evaluar la lesión fibrótica y la

remodelación de la arteria pulmonar. Brevemente, las secciones de tejido pulmonar se desparafinaron e hidrataron. A continuación, las muestras se volvieron a fijar en la solución de Bouin precalentada (esta solución mejoró la calidad de la tinción tricrómica de Masson) a 56 ° C durante 15 minutos. Después de eso, se utilizaron dos soluciones de tinción: solución de trabajo de hematoxilina de hierro de Weigert (tinción de núcleos - negro) y solución de fucsina de ácido escarlata de Biebrich (citoplasma y tinción de músculos - roja). Después de eso, se realizó una etapa de diferenciación utilizando solución fosfomolibd / ácido fosfotústico y se demostró el colágeno mediante tinción azul con solución azul de anilina. El enjuague con ácido acético después de la tinción hizo que los tonos de color fueran más delicados y transparentes. Finalmente, las secciones de pulmón se deshidrataron para montar con DPX.

La gravedad de la fibrosis pulmonar se puntuó en una escala de 0 (pulmón normal) a 8 (obliteración fibrótica total de campos) según la puntuación de Ashcroft (**Tabla 12**). Se observaron muestras en el microscopio Nikon Eclipse TE200 y se calificaron 10 imágenes representativas de cada condición. Se muestra una imagen representativa de cada condición.

Grado de fibrosis	Cambios histológicos
0	Pulmón normal
1	Engrosamiento fibroso mínimo de las paredes alveolares o bronquiolares.
2 – 3	Engrosamiento moderado de las paredes sin daños evidentes en la arquitectura pulmonar.
4-5	Fibrosis aumentada con daño definitivo a la estructura pulmonar y formación de bandas fibrosas o pequeñas masas fibrosas
6-7	Distorsión severa de la estructura y grandes áreas fibrosas; "Pulmón de panal de abeja".
8	Obliteración fibrosa total del campo.

**Tabla 14. Criterios para clasificación grado de fibrosis.**

#### 2.9.4. Análisis de coimmunofluorescencia

*En primer lugar, las secciones de pulmón humano y de ratón se desparafinaron e hidrataron. A continuación, se realizó la recuperación del antígeno, la permeabilización y el bloqueo de la membrana celular. Los anticuerpos primarios se incubaron durante 1 hora a 37°C y después del lavado con TBST, se utilizaron anticuerpos IgG anti-ratón / conejo / cabra conjugados con rodina, FITC o rodamina, y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de volver a lavar el TBST, se usó DAPI (2 µg / ml) para marcar los núcleos durante 3 minutos. El medio de montaje utilizado fue Fluorep.*

*La colocación de MUC4β / p-Smad2 / 3 y MUC4β / act-β-catenina se realizó de la misma manera que en el análisis de inmunofluorescencia celular. Sin embargo, las imágenes de tejido con puntos colocados de los dos canales láser se transformaron en un color naranja.*

## **2.10. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados se resolvió mediante análisis paramétricos (en el caso de los estudios celulares y en animales) o no paramétricos (en los estudios en humanos), según el caso.  $P < 0.05$  fue considerada estadísticamente significativa. Se utilizaron pruebas no paramétricas para comparar los resultados de muestras humanas de pacientes con FPI y pacientes control. En este caso, los datos se muestran como medianas, rango intercuartil y valores mínimos y máximos. Cuando las comparaciones se referían solo a 2 grupos, las diferencias entre grupos se analizaron mediante la prueba de Mann Whitney.

En los experimentos in vitro e in vivo los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar de la media (SEM) de n experimentos hasta que se confirmó la distribución normal para cada grupo de datos mediante análisis de histogramas y el test de Kolmogorov-Smirnov. En este caso, el análisis estadístico se resolvió por análisis paramétrico. Las comparaciones entre dos grupos fueron analizadas empleando una prueba bilateral t de Student apareada para muestras dependientes, o un t-test no apareado para muestras independientes. Las comparaciones múltiples fueron analizadas mediante test ANOVA de una o dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni.

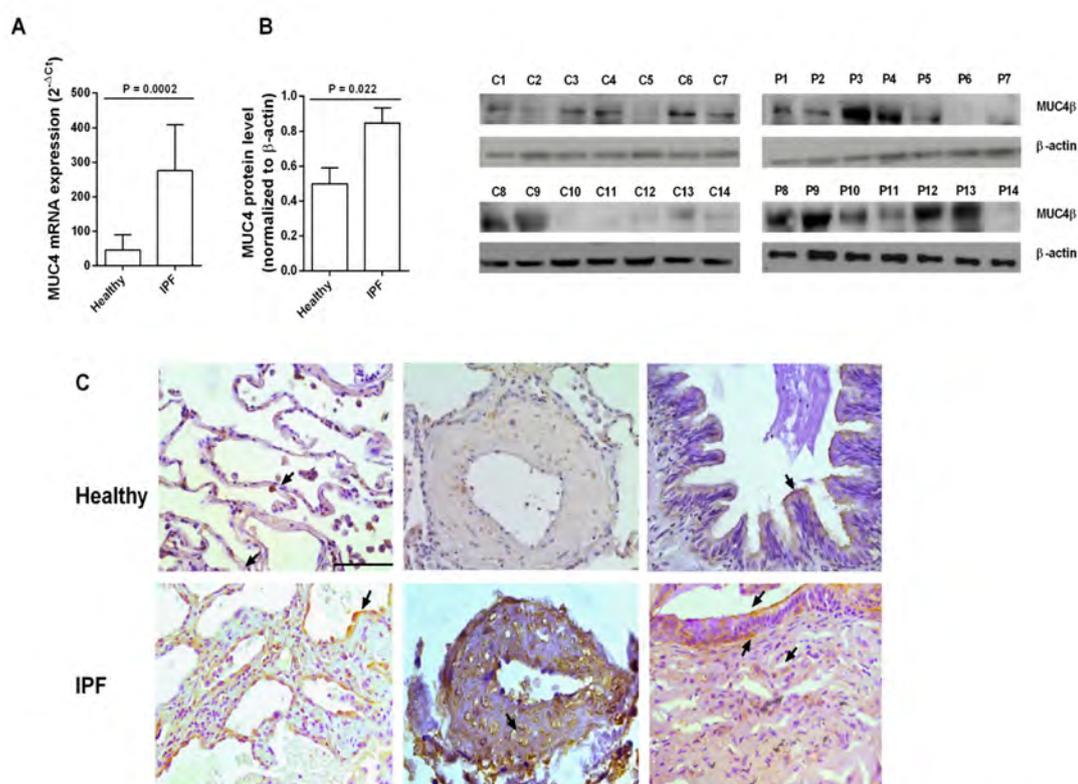
## RESULTADOS

### 1. EXPRESIÓN DE MUC4

Los datos clínicos de los sujetos sanos controles y de los pacientes con FPI están recogidos en la **tabla 13**. La media de edad ha sido de 60,8 años y de ellos el 77 % fueron fumadores. El nivel de transcripción del ARNm de MUC4 se midió en tejido pulmonar homogeneizado de ambos grupos de tejidos humanos, y fue significativamente mayor en el de pacientes con FPI que en el de los controles ( $p = 0,0002$ ; **Figura 29 A**). Lo mismo sucede, para la expresión de la proteína MUC4 $\beta$  que también fue significativamente mayor en los pacientes con FPI que en los sujetos de control ( $P < 0,022$ ; **Figura 29 B**). El estudio inmunohistoquímico de las secciones de pulmón de los sujetos controles mostró una captación débil de MUC4 $\beta$  que se localizó principalmente en las células ATII, la superficie del epitelio bronquial y los macrófagos alveolares (**Figura 29 C**). En cambio en los pacientes con FPI se observó una captación fuerte de MUC4 $\beta$  en las células hiperplásicas ATII, células epiteliales bronquiales superficiales y basales y en los fibroblastos, localizada principalmente en la membrana/citoplasma (**Figura 29 C, flechas negras**).

	Control donante sano (n = 21)	FPI pacientes (n = 22)	P Valor
Edad (años), media (SD)	57.4 (6.7)	60.8 (8)	NS
Sexo (Varon/Mujer)	15/6	17/5	
Habito fumar			
<i>Nunca/Fumador</i>	4/17	5/17	NS
<i>Paquetes/año (rango)</i>	22 (0–30)	22.5 (0–40)	NS
FEV1, pred, media (SD)	ND	63.5 (14.5)	NS
FVC, % pred, media (SD)	ND	60.1 (12)	NS
DLco, % pred, media (SD)	ND	38 (21)	NS
PaO <sub>2</sub> , mmHg, media (SD)	93.5 (4.2)	53 (10.5)	<0.001*
NAC (s/n)	0	16/6	
Pirfenidona (s/n)	0	6/16	
Nintedanib (s/n)	0	0	

**Tabla 13. Características clínicas de los sujetos donantes de control y pacientes con FPI.** % pred: % predicho; DLCO: capacidad de difusión del pulmón para el monóxido de carbono; FEV1: volumen espiratorio forzado en 1 s; FVC: capacidad vital forzada; ND: no determinado; Paquete por año: 1 año de fumar 20 cigarrillos por día; PaO<sub>2</sub>: tensión arterial de oxígeno en sangre. Los datos son medios (SD). N-acetil-l-cisteína (NAC)/pirfenidona/nintedanib se refiere a los pacientes que recibieron este tratamiento en el momento de la muestra pulmonar. NS: no significación entre grupos ( $p > 0.05$ ). \* En comparación con los donantes de control.



**Figura 29: Niveles de expresión de MUC4 en tejido de parénquima pulmonar procedente de sujetos sanos y pacientes FPI.** A) Niveles de expresión medidos por Real-time PCR. B) Niveles de expresión medidos por Western Blot y normalizados respecto a los valores de expresión de beta-actina. C) Expresión de MUC4 en cortes histológicos conteniendo parénquima, arteria y bronquio. Scale bar: 100  $\mu$ m. Datos presentados como media  $\pm$  SD. Valores exactos de p-value obtenidos mediante Mann–Whitney test. La flechas negras indican expresión de MUC4.

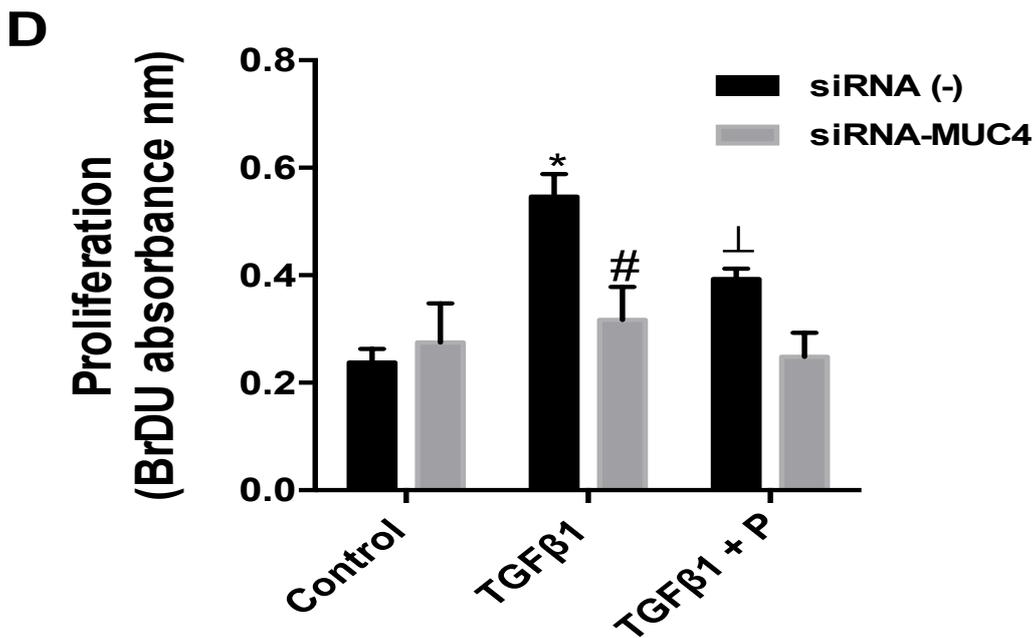
## 2. MUC4 $\beta$ PARTICIPA EN LA SENESCENCIA CELULAR Y LA PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR TGF- $\beta$ 1 EN CÉLULAS ALVEOLARES II (A549) Y FIBROBLASTOS PULMONARES (MRC5)

La senescencia y proliferación celular son dos puntos claves en el proceso de la fibrosis pulmonar idiopática. TGF- $\beta$ 1 a una dosis de 10 mg /ml aumentó la proliferación celular después de 48 horas de estimulación en fibroblastos MRC5 [Figura 30 D; siRNA(-)]. Después de 72h de exposición a TGF- $\beta$ 1 observamos

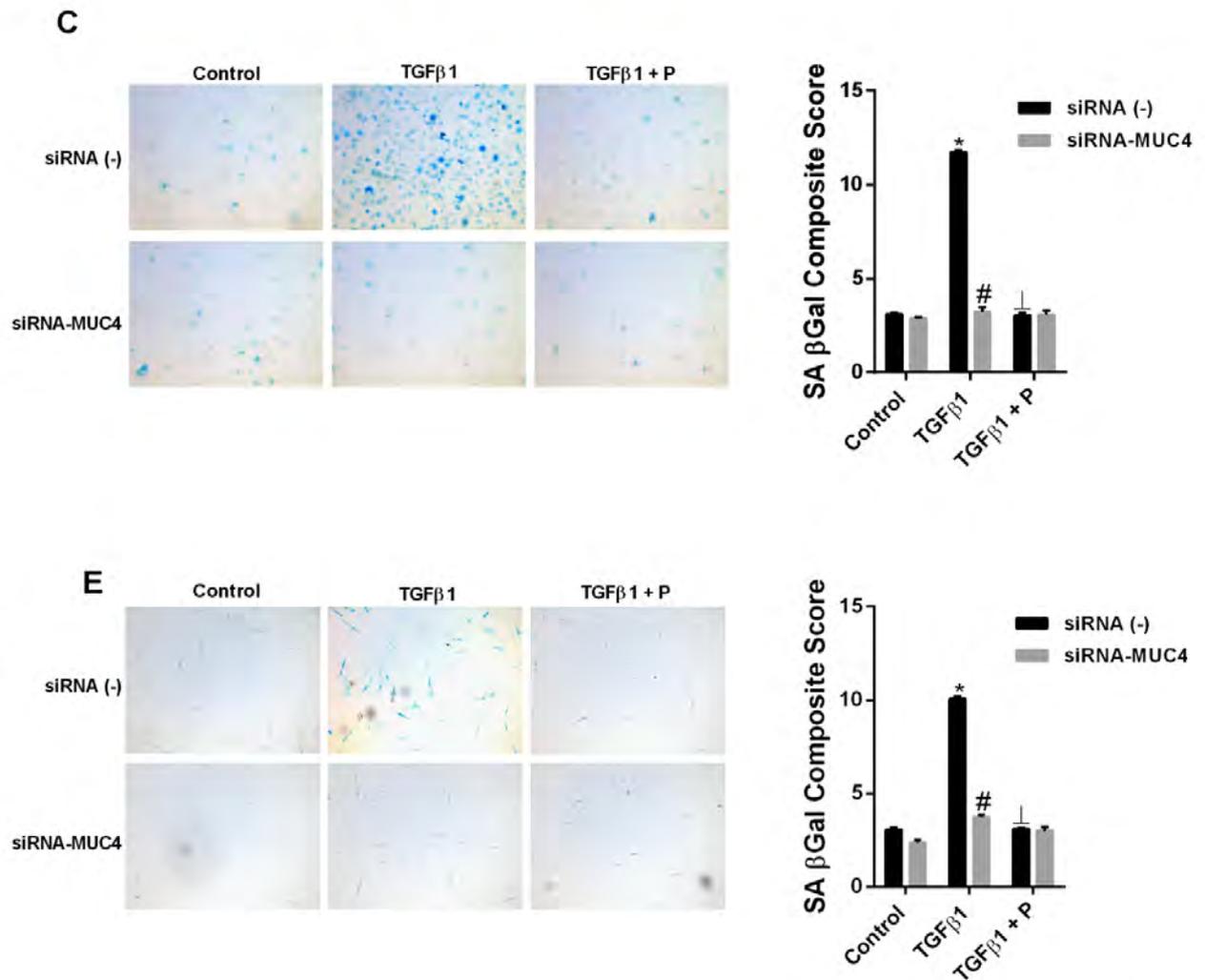
un aumento de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en ambos tipos celulares, indicativo de senescencia [Figura 31 C; siRNA(-), y E; siRNA(-)].

Ambos efectos fueron inhibidos por el tratamiento con pirfenidona 200  $\mu$ M) [Figura 30 D; siRNA(-) TGF $\beta$ 1+P; Figuras 31 C; siRNA(-) TGF $\beta$ 1+P, y E; siRNA(-) TGF $\beta$ 1+P] y atenuados en la células con silenciamiento transitorio mediante siRNA (small interfering RNA) dirigido a MUC4 (siRNA-MUC4), de forma estadísticamente significativa [Figura 30 D; siRNA-MUC4; Figuras 31 C; siRNA-MUC4 y E; siRNA-MUC4).

Estos resultados confirman la relación entre TGF- $\beta$ 1 y MUC4 en la inducción de dos procesos claves en la fibrosis pulmonar como son la senescencia y la proliferación celular. La adición de pirfenidona en células alveolares tipo II y fibroblastos de pulmón siRNA-MUC4 transfectadas no produce ninguna sinergia.



**Figura 30: MUC4 media la proliferación de fibroblastos de pulmón inducida por TGF- $\beta$ 1 (D)** Fibroblastos pulmonares MRC5 transfectados con siRNA-MUC4 or siRNA(-) 48h antes del tratamiento con pirfenidona 200uM (añadida 30 minutos antes que el estímulo: 10% suero bovino fetal + 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 durante 24h en siRNA-MUC4 o siRNA(-) TGF- $\beta$ 1. La proliferación de los fibroblastos durante 48h fue evaluada por el ensayo de Bromodeoxiuridina (BrdU). Los resultados son expresados como media  $\pm$  SE de n = 3 experimentos independientes por condición. One-way ANOVA seguido por post-hoc bonferroni tests. \*P <0.05 vs. Control / siRNA(-) control / siRNA-MUC4 control; \* P < 0.05 vs. TGF- $\beta$ 1.



**Figura 31: MUC4 media en la senescencia inducida por TGF-β1 de células alveolares epiteliales y fibroblastos.** (C) Células epiteliales alveolares A549 y (E) pulmonares MRC5 transfectadas con siRNA-MUC4 or siRNA(-) 48h antes del tratamiento con pirfenidona 200uM (añadida 30 minutos antes que el estímulo TGF-β1 y mantenida a lo largo del tiempo de estimulación) y estimulación con 10ng/ml de TGF-β1 durante 72h. En ambos casos las células fueron teñidas para actividad de B-galactosidasa asociada a senescencia y fueron tomadas imágenes en el microscopio (Objetivo 40x).

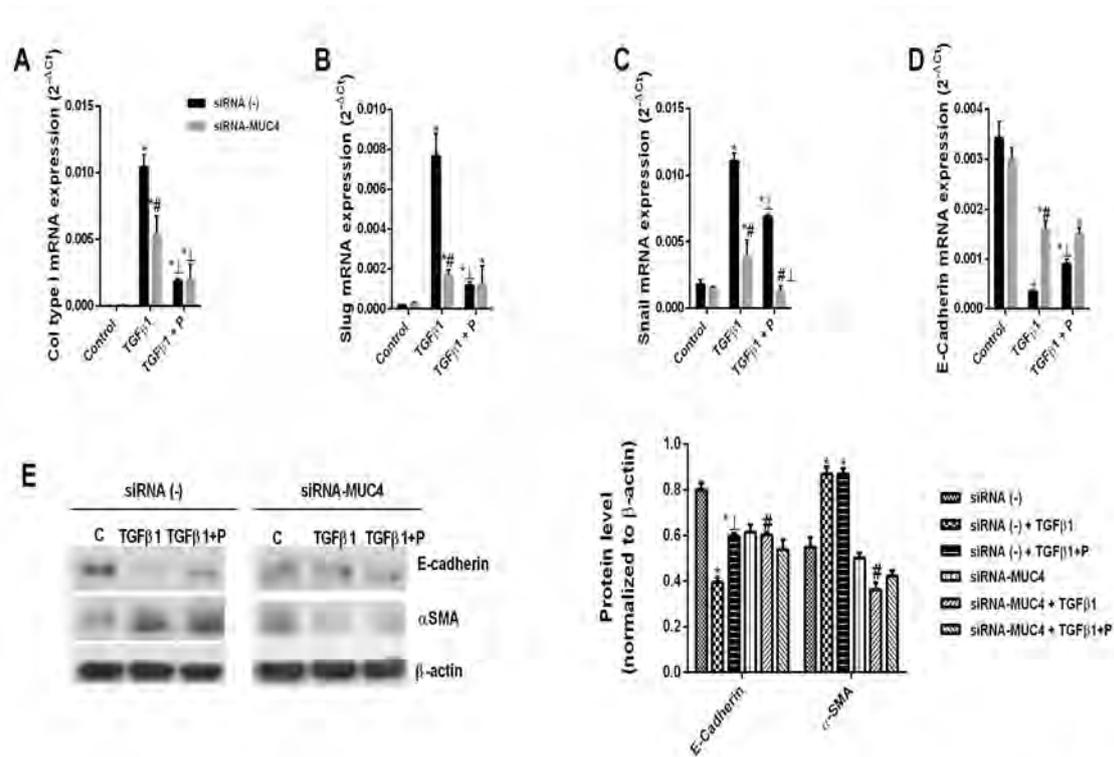
### **3. TGF- $\beta$ 1 COLABORA CON MUC4 $\beta$ EN EL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES ALVEOLARES Y DE FIBROBLASTOS A MIOFIBROBLASTOS**

TGF- $\beta$ 1 promovió la transición mesenquimatosa en las células epiteliales alveolares A549, aumentando la expresión génica de los marcadores mesenquimales  $\alpha$ -SMA, colágeno tipo I, Slug y Snail, y disminuyendo la expresión del marcador epitelial E-cadherina en la línea celular alveolar A549 después de 72 horas de estimulación **[Figuras 32 A,B,C,D; siRNA(-)]**. En el análisis de la expresión de E-cadherina y  $\alpha$ -SMA mediante western Blot, el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 generó un incremento de la proteína  $\alpha$ SMA y una disminución de la proteína E-Cadherina **[Figuras 32 E; siRNA(-)]**.

El silenciamiento transitorio de la línea celular A549 mediante siRNA dirigido a MUC4, originó que TGF- $\beta$ 1 produjera una menor incremento de la proteína y la expresión génica de los marcadores mesenquimales  $\alpha$ -SMA, colágeno tipo I, Slug y Snail y un aumento de la expresión del marcador epitelial E-cadherina, todo ello de forma estadísticamente significativa **(Figuras 32 A,B,C,D,E; siRNA-MUC4)**.

El pretratamiento de la células A549 con pirfenidona 200uM (añadida en los 30 minutos previos a la adición de TGF- $\beta$ 1 y mantenida durante las 48h de estimulación con TGF- $\beta$ 1 abolió los efectos del TGF- $\beta$ 1, produciéndose una disminución de los marcadores mesenquimales  $\alpha$ -SMA, colágeno tipo I, Slug y Snail, y un aumento de la expresión del marcador epitelial E-cadherina. Similares resultados se observaron en los niveles de proteínas **(Figura 32 A,B,C,D,E; siRNA(-) TGF $\beta$ 1 versus TGF $\beta$ 1+P)**.

En las cel A549 transfectadas de forma transitoria con siRNA-MUC4, el pretratamiento con pirfenidona 200uM (añadida en los 30 minutos previos a la adición de TGF- $\beta$ 1 y mantenida durante las 48h de estimulación con TGF- $\beta$ 1), abolió los efectos del TGF- $\beta$ 1, produciéndose una disminución de los marcadores mesenquimales  $\alpha$ -SMA, colágeno tipo I, Slug y Snail, y un aumento de la expresión del marcador epitelial E-cadherina. Similares resultados se observaron en los niveles de proteínas **(Figura 32 A,B,C,D,E; siRNA-MUC4 TGF $\beta$ 1 versus siRNA-MUC4 TGF $\beta$ 1+P)**. La pirfenidona no tuvo efecto antifibrótico adicional.



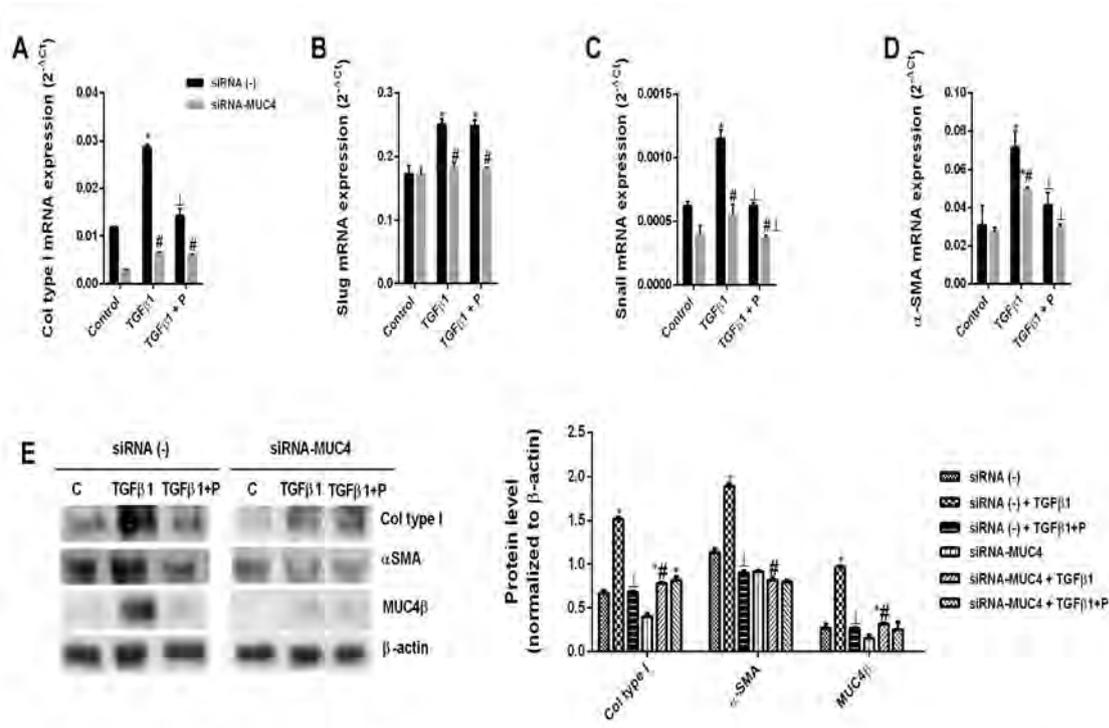
**Figura 32. TGF- $\beta$ 1 y MUC4 colaboran para inducir la transición alveolar epitelial a mesenquimal.** Silenciamiento transitorio de la línea celular A549 mediante siRNA (small interfering RNA) dirigido a MUC4 o siRNA control durante 48h y posterior estimulación con TGF $\beta$ 1 10ng/ml durante 48h en presencia o ausencia de pirfenidona 200uM (añadida en los 30 minutos previos a la adición de TGF $\beta$ 1 y mantenida durante las 48h de estimulación). Análisis de la expresión de colágeno tipo I (A), Slug (B), Snail (C) y E-Cadherina (D) mediante Real time PCR. E) Análisis de la expresión de E-cadherina y  $\alpha$ -SMA mediante western Blot, valores normalizados respecto a los valores de expresión de beta-actina. Los resultados son expresados como media  $\pm$  SE de n = 3 experimentos independientes por condición. One-way ANOVA seguido por post-hoc bonferroni tests. \*P < 0.05 vs. siRNA (-) control/siRNA-MUC4 control; #P < 0.05 vs. siRNA (-) TGF $\beta$ 1; □ P < 0.05 vs. siRNA (-) TGF $\beta$ 1/siRNA-MUC4 TGF $\beta$ 1.

En la línea celular de fibroblastos MRC5, TGF- $\beta$ 1 produjo resultados similares, incrementando la proteína y la expresión génica de los marcadores mesenquimales  $\alpha$ -SMA, colágeno tipo I, Slug y Snail **[Figura 33 A,B,C,D,E; siRNA(-)]**. En el análisis de la expresión de colágeno tipo I y  $\alpha$ -SMA mediante western Blot, el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 generó un incremento de la proteína  $\alpha$ -SMA y del colágeno tipo I **[Figura 33 E; siRNA(-)]**. El pretratamiento de la células MRC5 con pirfenidona 200uM (añadida en los 30 minutos previos a la adición de TGF- $\beta$ 1 y mantenida durante las 48h de estimulación con TGF- $\beta$ 1 abolió los efectos del TGB  $\beta$ 1, produciéndose una disminución de los marcadores mesenquimales  $\alpha$ -SMA, colágeno tipo I, Slug y Snail. Similares resultados se observaron en los niveles de proteínas **(Figura 33 A,B,C,D,E; siRNA(-) TGF $\beta$ 1 versus TGF $\beta$ 1+P)**.

El silenciamiento transitorio de la línea celular MRC5 mediante siRNA-MUC4 originó que TGF- $\beta$ 1 produjera un menor incremento de la proteína y la expresión génica de los marcadores mesenquimales  $\alpha$ -SMA, colágeno tipo I, Slug y Snail, en comparación a las células sin silenciamiento transitorio de MUC4, estadísticamente significativo **(Figura 33 A,B,C,D,E ; siRNA-MUC4)**.

El pretratamiento de la células MRC5 con pirfenidona 200uM (añadida en los 30 minutos previos a la adición de TGF- $\beta$ 1 y mantenida durante las 48h de estimulación con TGF- $\beta$ 1) abolió los efectos del TGF- $\beta$ 1, produciéndose una disminución de los marcadores mesenquimales  $\alpha$ -SMA, colágeno tipo I, Slug y Snail. Similares resultados se observaron en los niveles de proteínas **(Figura 33 A,B,C,D,E; siRNA-MUC4 TGF $\beta$ 1 versus siRNA-MUC4 TGF $\beta$ 1+P)**. La pirfenidona no tuvo efecto antifibrótico adicional.

El silenciamiento de MUC4 se confirmó mediante western blot **(Figura 33 E)**.



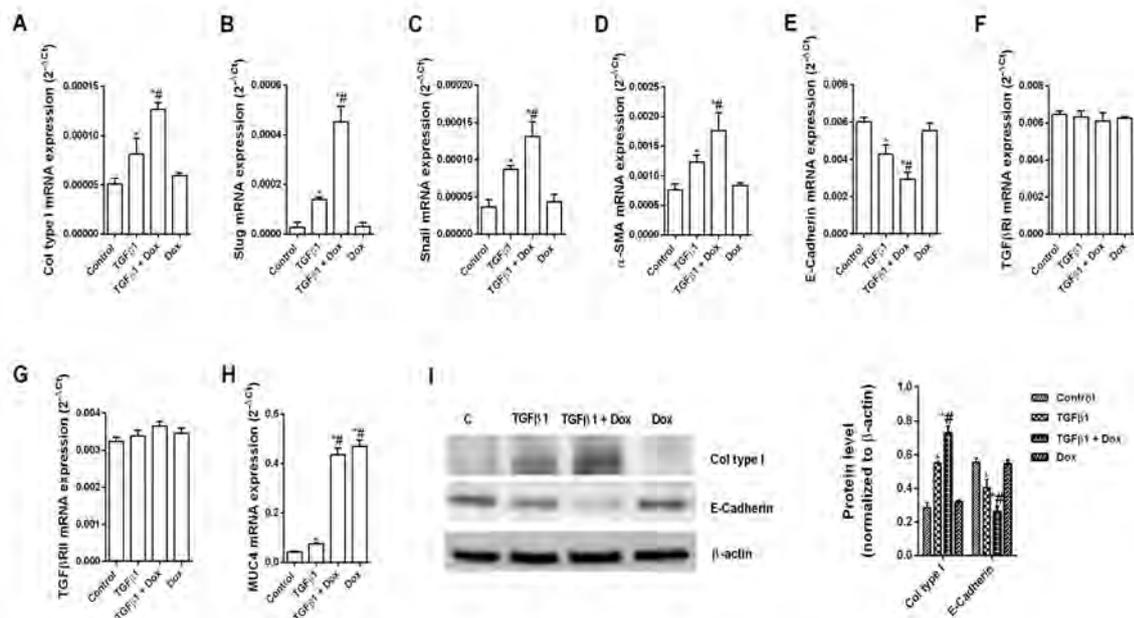
**Figura 33 TGF-β1 y MUC4 colaboran para inducir la transición de fibroblasto a miofibroblasto.** Silenciamiento transitorio de la línea celular MRC5 mediante siRNA (small interfering RNA) dirigido a MUC4 o siRNA control durante 48h y posterior estimulación con TGFβ1 10ng/ml durante 48h en presencia o ausencia de pirfenidona 200uM (añadida en los 30 minutos previos a la adición de TGFβ1 y mantenida durante las 48h de estimulación). Análisis de la expresión de colágeno tipo I (A), Slug (B), Snail (C) y α-SMA (D) mediante Real time PCR. E) Análisis de la expresión de colágeno, α-SMA y MUC4β mediante western Blot, valores normalizados respecto a los valores de expresión de β-actina. Los resultados son expresados como media ± SE de n = 3 experimentos independientes por condición. One-way ANOVA seguido por post-hoc bonferroni tests. \*P < 0.05 vs. siRNA (-) control/siRNA-MUC4 control; #P < 0.05 vs. siRNA (-); □ P < 0.05 vs. siRNA (-) TGFβ1/siRNA-MUC4 TGFβ1.

#### **4. LA SOBREEXPRESIÓN DE MUC4 AUMENTA EL EFECTO DEL TGF- $\beta$ 1 EN EL PROCESO TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES (EMT)**

En células de la línea celular HEK 293 transfectada con un vector de sobreexpresión de MUC4 inducible por doxiciclina (pretratamiento de las células durante 48h con doxiciclina 1 $\mu$ M), la estimulación con 10 mg/ml de TGF- $\beta$ 1 durante 48h incrementó la proteína y la expresión génica de los marcadores mesenquimales  $\alpha$ -SMA, colágeno tipo I, Slug y Snail, y disminuyó la expresión del marcador epitelial E-cadherina en las células tratadas con doxiciclina en mayor grado que en las células HEK 293 no tratadas con doxiciclina (**Figuras 34 A,B,C,D,E; TGF $\beta$ 1+doxiciclina versus TGF $\beta$ 1**). No se observó incremento de la expresión del TGF $\beta$ RI mRNA en ninguna de las situaciones experimentales estudiadas (**Figuras 34 F,G**).

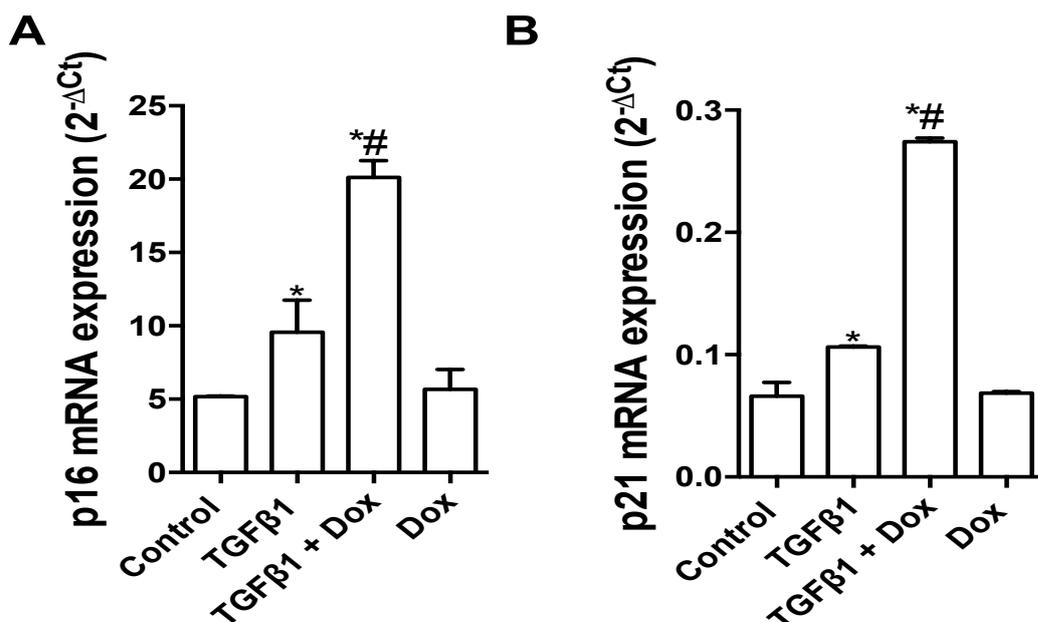
La expresión de ARNm de MUC4 aumentó  $1.8 \pm 0.4$  veces después de la estimulación con TGF- $\beta$ 1 y  $10.2 \pm 0.1$  veces en las células pretratadas con doxiciclina, confirmando la regulación positiva en el sistema celular. (**Figura 34 H**).

En el análisis mediante western-blot de la expresión de E-cadherina y colágeno tipo I, en células de la línea celular HEK 293, se observó que el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 genera un incremento de la proteína colágeno tipo I y una disminución de la proteína E-Cadherina (**Figuras 34 I; TGF $\beta$ 1+doxiciclina versus TGF $\beta$ 1**). Tanto el aumento de expresión proteica de colágeno como la disminución de E-Cadherina son más acusados cuando las células son pretratadas con doxiciclina.



**Figura 34: La sobreexpresión de MUC4 aumenta los efectos de TGF-β1 en la TEM de las células HEK293 transfectadas.** Línea celular HEK293 transfectada con un vector de sobreexpresión de MUC4 inducible por doxiciclina (Dox). Pretratamiento de las células durante 48h con doxiciclina 1μM. A continuación estimulación durante 48h con TGF-β1 10ng/ml (manteniendo presente la doxiciclina). Expresión de colágeno tipo I (A), Slug (B), Snail (C), alpha-SMA (D), E-Cadherina (E), TGFBR1 (F), TGFBR2 (G) y MUC4 (H) mediante RT-PCR. (I) Expresión de colágeno tipo I y E-Cadherina mediante western Blot, niveles de expresión normalizados con respecto a los valores de expresión de beta actina. Los resultados son expresados como media ± SE de n = 3 experimentos independientes por condición. One-way ANOVA seguido por post-hoc bonferroni tests. \*P < 0.05 vs. control; #P < 0.05 vs. TGF-β1.

Se observó además que la expresión de p16 y p21, marcadores de senescencia, en las células HEK 293 transfectada con un vector de sobreexpresión de MUC4 inducible por doxiciclina y tratadas con TGF-β1 (estimulación durante 48h con TGF-β1 10ng/ml) y doxiciclina esta aumentada con respecto a las células HEK 293 no tratadas con doxiciclina apoyando el papel de MUC4 en la senescencia celular (Figura 35 A,B; TGFβ1 versus TGFβ1+DOX).



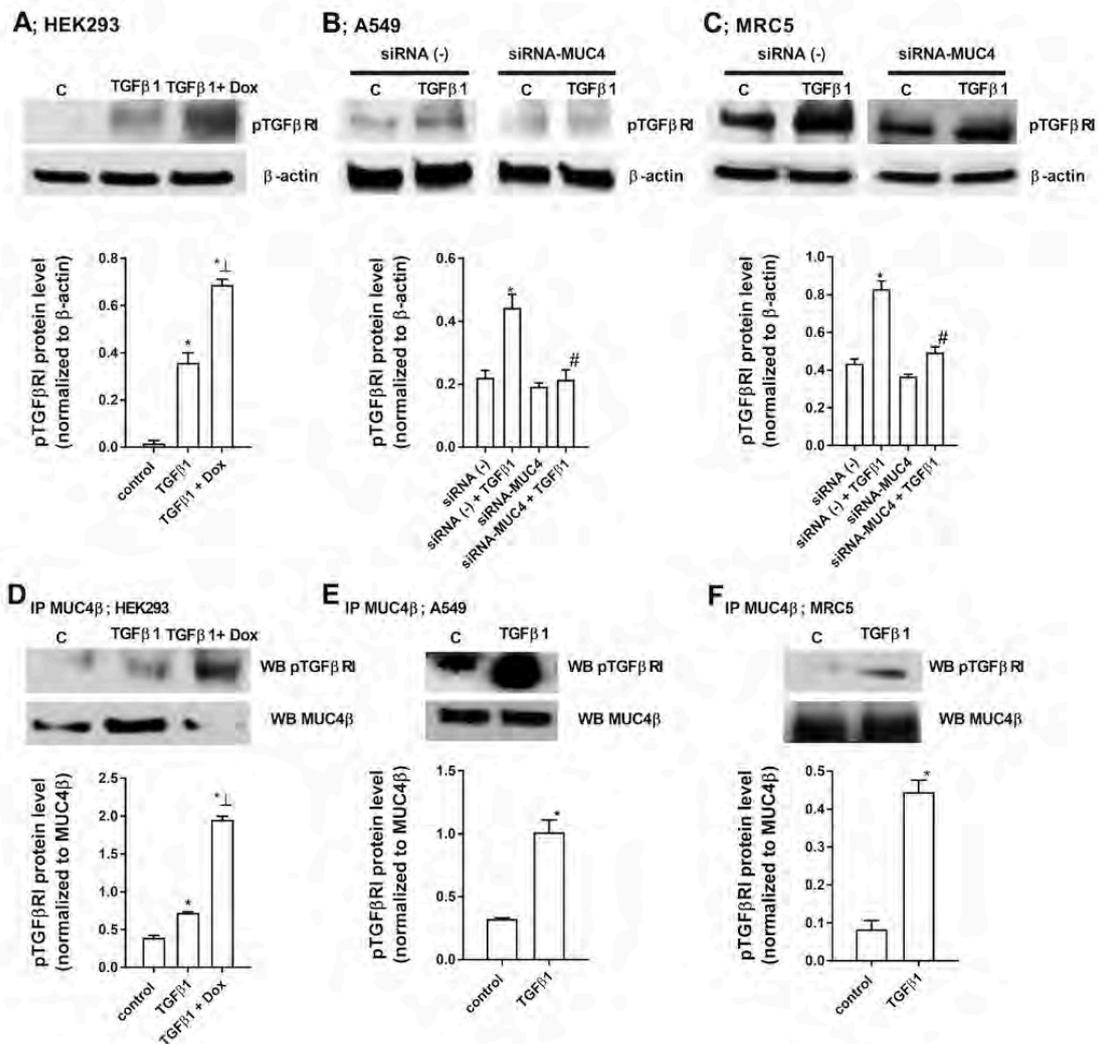
**Figura 35: La sobreexpresión de MUC4 aumenta los efectos de TGF-β1 en la senescencia.** Línea celular HEK293 transfectada con un vector de sobreexpresión de MUC4 inducible por doxyciclina (Dox). Pretratamiento de las células durante 48h con doxyciclina 1uM. A continuación estimulación durante 48h con TGF β1 10ng/ml (manteniendo presente la doxyciclina). Expresión de p16 (A) y p21 (B) mediante RT-PCR. (C). Los resultados son expresados como media ± SE de n = 3 experimentos independientes por condición. One-way ANOVA seguido por post-hoc bonferroni tests. \*P <0.05 vs. control; #P < 0.05 vs. TGFβ1.

#### 4.1. MUC4 media la fosforilación de tGFBR1 y smad3 inducida por tgf- β1

TGF-β1 indujo la fosforilación de TGFβR1 que se mejoró en las células HEK293 Tet3G / TRE3G-MUC4 pretratadas con doxyciclina [Figura 36 A (HEK293; TGFβ1+doxyciclina versus TGFβ1)]. En células epiteliales alveolares A549 y fibroblastos de pulmón MCR5, TGF-β1 aumentó la fosforilación de TGFβR1, que se inhibió en las células transfectadas transitoriamente con siRNA-MUC4 [Figuras 36 B (A549; siRNA(-) + TGFβ1 versus siRNA-MUC4 +TGFβ1) y C (MRC5; siRNA(-) +TGFβ1 versus siRNA-MUC4 TGFβ1)]

Las células HEK293 / Tet3G / TRE3G-MUC4 se pretrataron o no con doxyciclina para inducir la expresión de MUC4, y se estimularon con 5ng/ml de TGF-β1 durante 30 minutos para promover la fosforilación de TGFβR1. La proteína total fue extraída e inmunoprecipitada con MUC4β seguido de una inmunotransferencia con el anticuerpo p-TGFβR1 o la inmunotransferencia con MUC4β. TGF-β1 promovió la formación del complejo proteico MUC4β / p-TGFβR1 que se incrementó en presencia de doxorubicina lo que confirma la

interacción entre TGF- $\beta$ 1 y MUC4 $\beta$  (**Figura 36 D**). De manera similar, las células epiteliales alveolares A549 y los fibroblastos pulmonares MRC5 estimuladas con TGF- $\beta$ 1 promovieron la formación del complejo proteico MUC4 $\beta$  / p-TGF $\beta$ R1 (**Figura 36 E y F**)



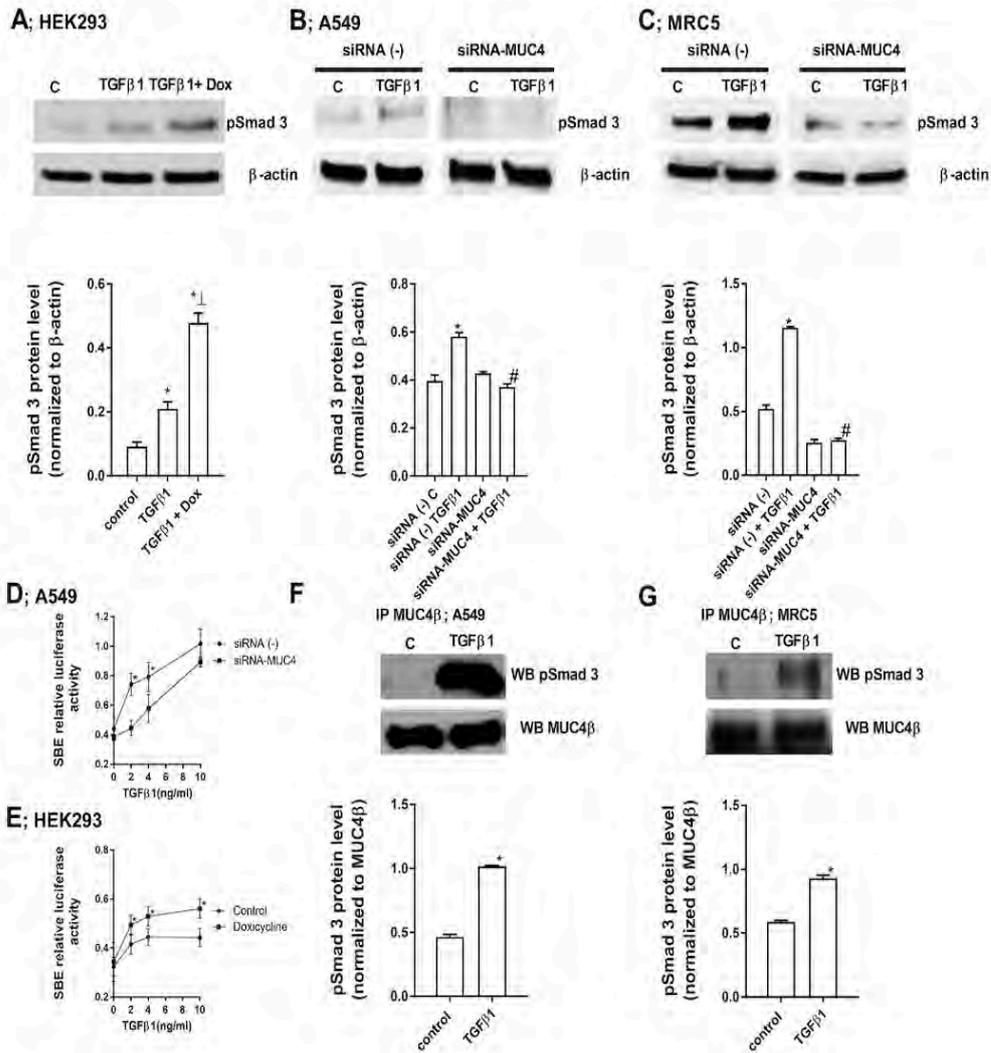
**Figura 36: MUC4 modula el efecto de TGF- $\beta$ 1 sobre la fosforilación de TGF $\beta$ R1.** (A) Línea celular HEK293 transfectada con un vector de sobreexpresión de MUC4 inducible por doxiciclina (Dox). Pretratamiento de las células durante 48h con doxiciclina 1 $\mu$ M. A continuación estimulación durante 48h con TGF $\beta$ 1 10ng/ml (manteniendo presente la doxiciclina). Expresión de pTGF $\beta$ R1 mediante western Blot. Valores de expresión normalizados respecto a los valores de expresión de beta actina. (B) Línea celular A549 y (C) línea celular MRC5 transfectadas con siRNA (-) o siRNA-MUC4 48h antes de la estimulación con 10ng/ml TGF $\beta$ 1 durante 48h. Expresión de pTGF $\beta$ R1 mediante western Blot. Valores de expresión normalizados respecto a los valores de expresión de beta actina. (D) Línea celular HEK293 estimulada con 5ng/ml TGF $\beta$ 1 durante 1h en presencia o ausencia de Doxiciclina 1 $\mu$ M durante las 48h previas. La proteína total fue extraída e inmunoprecipitada con MUC4beta. Western Blot contra pTGF $\beta$ R1, valores de expresión expresados como el ratio de expresión respecto a los valores de expresión de MUC4beta. (E) Línea celular A549 y (F) línea celular MRC5 estimuladas con 5ng/ml TGF $\beta$ 1

*durante 1h. La proteína total fue extraída e inmunoprecipitada con MUC4 $\beta$ . Western Blot contra pTGF $\beta$ R1, valores de expresión expresados como el ratio de expresión respecto a los valores de expresión de MUC4 $\beta$ .*

TGF- $\beta$ 1 indujo la fosforilación de Smad 2/3 en células HEK293 Tet3G / TRE3G-MUC4 que aumentó en el grupo pretratado con doxorubicina [**Figura 37 A: (HEK293; TGF $\beta$ 1+doxicilina versus TGF $\beta$ 1)**]. La fosforilación de SMAD 2-3 inducida por TGF- $\beta$ 1 se inhibió en las células A 549 y MRC4 transfectadas transitoriamente por siRNA-MUC4 [**Figura 37 B (A549; siRNA-MUC4 TGF $\beta$ 1 versus siRNA-MUC4 TGF $\beta$ 1), C (MRC5; siRNA-MUC4 TGF $\beta$ 1 versus siRNA-MUC4 TGF $\beta$ 1)**].

La línea celular A549 transfectada con siRNA- o siRNA MUC4 y la línea celular HEK293 pretratada o no pretratada con doxiciclina, al ser estimuladas con TGF- $\beta$ 1 durante 18h, presentan un aumento de la luminiscencia consecuencia de la expresión del gen luciferasa bajo la activación de un promotor inducible por Smad (SBE: Smad Binding Element). La sobreexpresión del MUC4 implica un aumento de la actividad luciferasa, mientras que el silenciamiento del MUC4 produce una disminución de la actividad luciferasa. [**Figuras 37 D (A549; siRNA-MUC4 TGF $\beta$ 1 versus siRNA-MUC4 TGF $\beta$ 1), E (HEK293; TGF $\beta$ 1+doxicilina versus TGF $\beta$ 1)**].

El análisis de inmunoprecipitación reveló una formación de complejo proteico entre MUC4 $\beta$  y p-SMAD3 después de la estimulación con TGF $\beta$ 1 en las líneas celulares A549 y MRC5 (**Figura 37 F y G**).

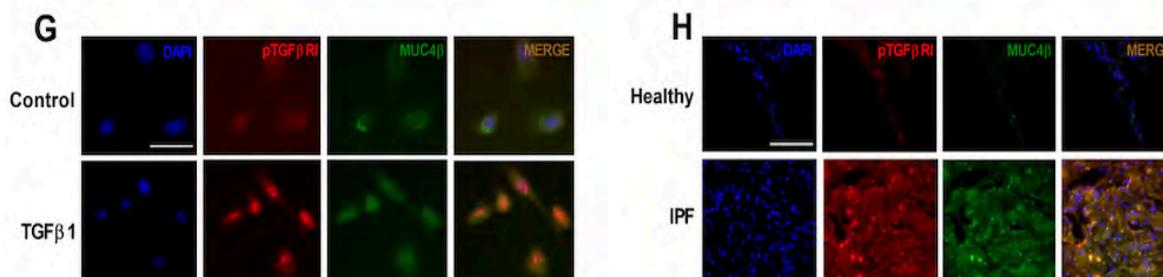


**Figura 37: MUC4 modula el efecto de TGF- $\beta$ 1 sobre la fosforilación de SMAD3.** (A) Línea celular HEK293 transfectada con un vector de sobreexpresión de MUC4 inducible por doxiciclina (Dox). Pretratamiento de las células durante 48h con doxiciclina 1 $\mu$ M. A continuación estimulación durante 48h con TGF $\beta$ 1 10ng/ml (manteniendo presente la doxiciclina). Expresión de pSmad2/3 mediante western Blot. Valores de expresión normalizados respecto a los valores de expresión de beta actina. (B) Línea celular A549 y (C) línea celular MRC5 transfectadas con siRNA (-) o siRNA-MUC4 48h antes de la estimulación con 10ng/ml TGF $\beta$ 1 durante 48h. Expresión de pSmad2/3 mediante western Blot. Valores de expresión normalizados respecto a los valores de expresión de beta actina. (D) Línea celular A549 transfectada con siRNA- o siRNA MUC4 y (E) Línea celular HEK293 pretratada o no pretratada con doxiciclina, estimuladas con TGF $\beta$ 1 durante 18h. Medida de luminiscencia consecuencia de la expresión del gen luciferasa bajo la activación de un promotor inducible por Smad. (F) Línea celular A549 y (G) línea celular MRC5 estimuladas con 5ng/ml TGF $\beta$ 1 durante 1h. La proteína total fue extraída e inmunoprecipitada con MUC4 $\beta$ . Western Blot contra pSmad2/3, valores de expresión expresados como el ratio de expresión respecto a los valores de expresión de  $\beta$ -actina.

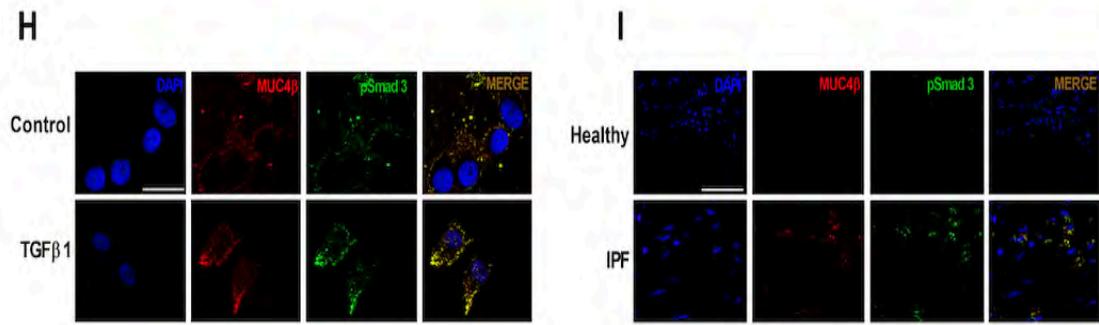
## 5. TGF- $\beta$ 1 NO INDUCE TRASLOCACIÓN NUCLEAR DEL MUC4 $\beta$

La co-localización de anti-MUC4 $\beta$  y anti-p-TGFBRI y anti-MUC4 $\beta$  y anti-p-Smad2/3. se estudió mediante microscopía confocal obteniendo imágenes de inmunofluorescencia de células epiteliales alveolares A549 estimuladas con 5ng/ml TGF- $\beta$ 1 durante 1h (**Figura 38 G**). La co-localización de anti-MUC4 $\beta$  y anti-p-TGF $\beta$ RI y anti-MUC4 $\beta$  y anti-p-Smad2/3 también se estudió mediante microscopía confocal obteniendo imágenes de inmunofluorescencia en secciones de pulmón de sujetos control y pacientes FPI (**Figura 38 H**). A diferencia del tejido pulmonar sano, MUC4 $\beta$  / p-TGF $\beta$ RI se co-localizaron en el tejido pulmonar de pacientes con FPI.

De igual manera mediante inmunofluorescencia confocal se observó que tanto las células epiteliales alveolares A549 estimuladas con TGF-  $\beta$ 1 como el tejido pulmonar de pacientes con FPI, mostraron una distribución citoplasmática y nuclear co-localizada de los complejos MUC4 $\beta$  / p-TGF $\beta$ RI y MUC4 $\beta$  /p-Smad2/3. (**Figura 39 H,I**).



**Figura 38: Co-localización de MUC4 $\beta$  y p-TGF $\beta$ RI** G) Células epiteliales alveolares A549 estimuladas con 5ng/ml TGF $\beta$ 1 durante 1h. Tinción de inmunofluorescencia con anti-MUC4 $\beta$  y anti-p-TGFR $\beta$ 1. La colocalización fue analizada usando un microscopio confocal que generó un citofluorograma bidimensional que seleccionó puntos comunes localizados de ambos anticuerpos (color naranja). Escala: 10 $\mu$ m. (H) Imágenes de colocalización obtenidas con microscopía confocal en secciones de pulmón de sujetos control y pacientes FPI teñidas contra MUC4 $\beta$ /pTGF $\beta$ R1. La colocalización fue analizada usando un microscopio confocal que generó un citofluorograma bidimensional representando los puntos comunes localizados de ambos anticuerpos (color naranja). Escala 10 $\mu$ m.



**Figura 39: Inmunofluorescencia con-focal de p-Smad3 y MUC4β:** (H) Células epiteliales alveolares A549 estimuladas con 5ng/ml TGFB1 durante 1h. Tinción de inmunofluorescencia con anti-MUC4β y anti-p-Smad2/3. La colocalización fue analizada usando un microscopio confocal que generó un citofluorograma bidimensional que seleccionó puntos comunes localizados de ambos anticuerpos (color naranja). Escala: 10um. (I) Imágenes de colocalización obtenidas con microscopia confocal en secciones de pulmón de sujetos control y pacientes FPI teñidas contra MUC4β/pSmad2/3. La colocalización fue analizada usando un microscopio confocal que generó un citofluorograma bidimensional representando los puntos comunes localizados de ambos anticuerpos (color naranja). Escala 10um.

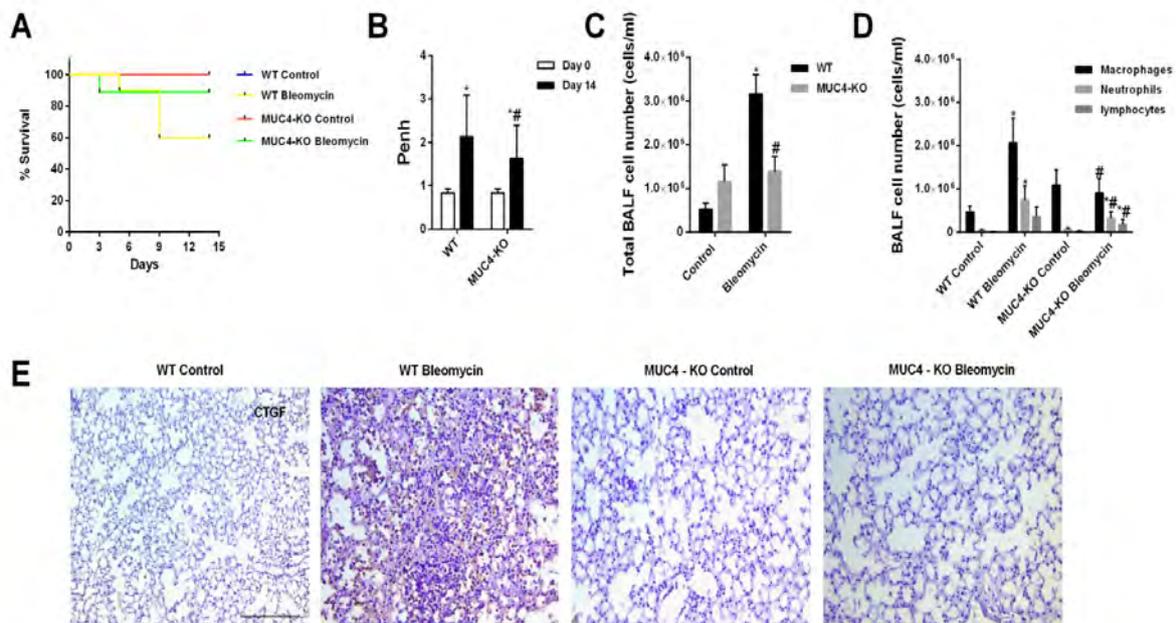
## 6. MODELO DE FIBROSIS PULMONAR IN VIVO

La fibrosis pulmonar se indujo mediante la administración de 1,5 U / kg de bleomicina IT en ratones WT C57BL/6 y ratones MUC4-KO C57BL/6 (con silenciamiento génico transitorio de MUC4). Como consecuencia de la fibrosis pulmonar inducida, la mortalidad de los ratones WT C57BL/6 se incrementó en aproximadamente un 40% después de 14 días de procedimiento experimental. Sin embargo, la mortalidad se redujo en ratones MUC4-KO a aproximadamente un 15%. Como se esperaba, ambos grupos de control tuvieron una supervivencia del 100% (**Figura 40 A**).

La función pulmonar se evaluó mediante la diferencia en el valor de Penh medido por pletismografía de cuerpo entero el día 0 y el día 14. Los animales control (WT C57BL/6) tratados con bleomicina mostraron una función respiratoria alterada, representada por el aumento de los valores de Penh después de 14 días del procedimiento experimental. Por el contrario, este aumento fue significativamente menor en el grupo de bleomicina MUC4-KO (**Figura 40 B**) lo que sugiere una mejoría de la función pulmonar en este grupo.

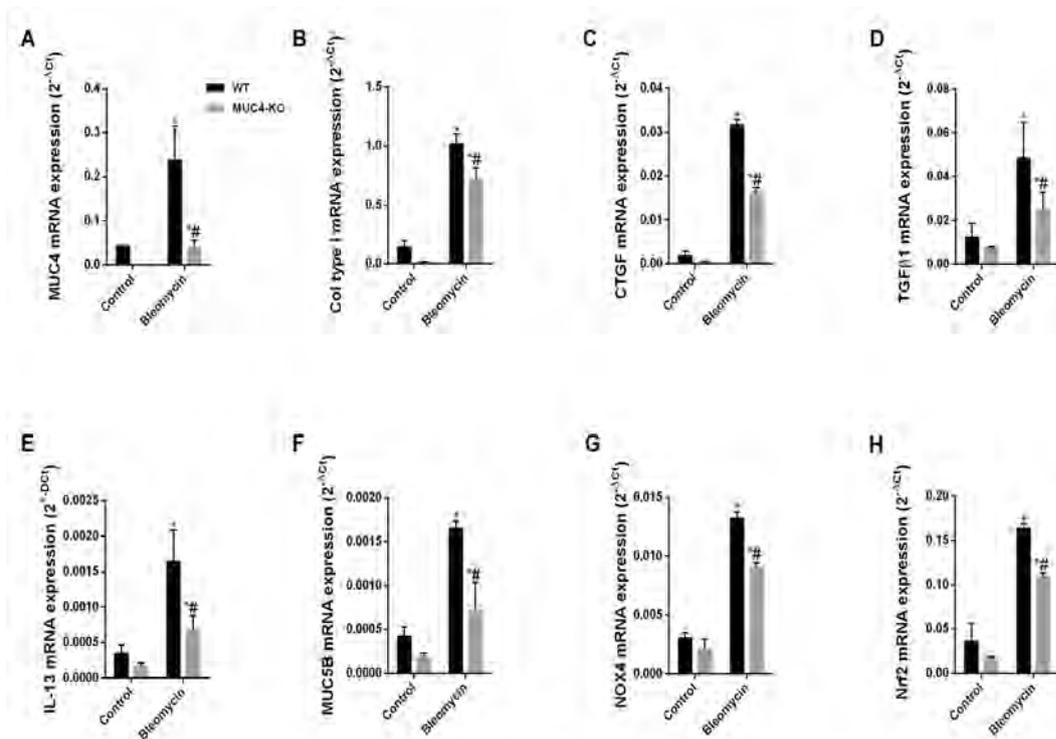
Para determinar la respuesta inflamatoria inducida por bleomicina, se realizó un LBA de cada ratón al final del procedimiento experimental. A través del LBA se obtienen todas las células y componentes biológicos en los espacios de las vías respiratorias, por lo que el LBA refleja la infiltración de células inflamatorias en el pulmón. En la **Figura 40 C**, se muestra que el número de células inflamatorias en el LBA aumentó debido a la administración de bleomicina IT, produciendo una mayor cantidad de células inflamatorias en el LBA en ratones WT que en ratones MUC4-KO. A diferencia de los grupos de control, los grupos de bleomicina tenían un perfil de células inflamatorias en el LBA formado por neutrófilos y linfocitos además de los macrófagos alveolares, el único tipo de célula en el LBA de los grupos de control (**Figura 40 D**). El número de células en el LBA después de la administración de bleomicina fue mayor en ratones WT que en ratones MUC4 - KO (**Figura 40 D**).

El tejido fibrótico pulmonar se evaluó mediante tinción inmunohistoquímica con *CTGF* (**Figura 40 E**). Los ratones tratados con bleomicina WT mostraron una mayor expresión de CTGF que los ratones MUC4-KO tratados con bleomicina. En ambos grupos control, la expresión de CTGF fue prácticamente indetectable.



**Figura 40: La eliminación de MUC4 (KO) mejora la supervivencia e inhibe la FP inducida por bleomicina.** Ratones Wild type (WT) C57BL/6 y ratones MUC4-KO C57BL/6 recibieron una dosis intratraqueal única de 1,5U/Kg de bleomicina en día 1 (n=10). A) Análisis de supervivencia Kaplan-Meier de cada grupo durante 14 días. (B) Función pulmonar evaluada por la diferencia en el valor Penh (enhanced respiratory pause) entre día 0 y día 14 después de la administración de bleomicina en cada uno de los grupos. La metodología empleada fue pletismografía de cuerpo entero y el valor Penh fue usado como un parámetro no invasivo de medida de la disfunción pulmonar. \* $P < 0.05$  vs. día 0; # $P < 0.05$  vs. WT día 14. (C y D) Número total de células inflamatorias en el lavado broncoalveolar de ratones Wildtype y ratones MUC4-KO 14 días después de la administración de bleomicina. (E) Inmunohistoquímica de CTGF en cortes de tejido pulmonar de ratones Wildtype y ratones MUC4-KO 14 días después de la administración de bleomicina. Los resultados son expresadas como media  $\pm$  SE. One-way ANOVA seguido por post hoc Bonferroni test.

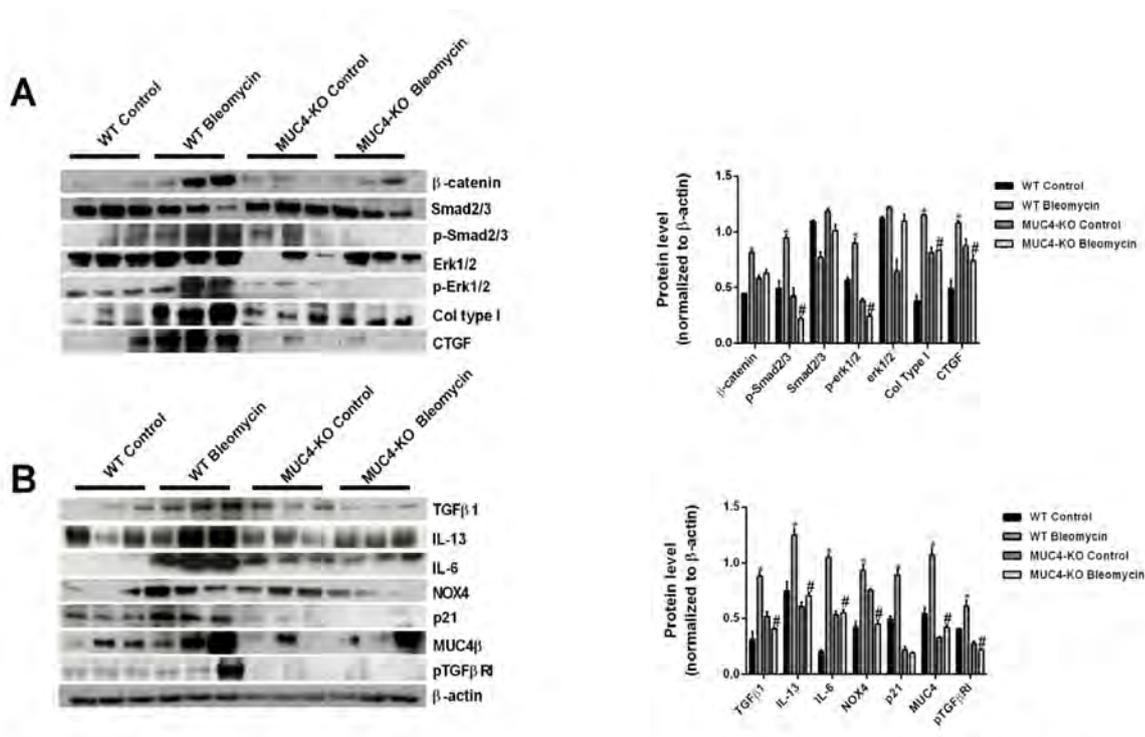
En las muestras de tejido pulmonar, se verificó la MUC4-KO mediante RT-PCR (Figura 41 A). La expresión de los genes de marcadores fibróticos reconocidos y mediadores como el colágeno tipo I (Col tipo I), el CTGF, el TGF- $\beta$ 1, la IL-13, las mucinas fibróticas MUC4 $\beta$  y MUC5 $\beta$ , NOX4 y el factor nuclear derivado de eritroide (Nrf2) fueron analizados mediante RT-PCR. La bleomicina indujo la expresión de todos ellos en el tejido pulmonar de ratones WT, mientras que los animales MUC4-KO mantuvieron una menor elevación (Figura 41 B-H).



**Figura 41: La eliminación de MUC4 (KO) inhibe la expresión de ARNm inducida por bleomicina de marcadores moleculares de FP.** Ratones WT C57BL/6 y ratones MUC4-KO C57BL/6 recibieron una dosis intratraqueal única de 1,5U/Kg de bleomicina en día 1 (n=10). Expresión de (A) MUC4, (B) colágeno tipo I, (C) CTGF, (D) TGF-β), (E) IL-13, (F) MUC5β, (G) NOX4 y (H) Nrf2 fueron analizadas mediante RT-PCR en tejido pulmonar. Los resultados son expresados como media ± SE. One-way ANOVA seguido por el post hoc Bonferroni test. \*P < 0.05 vs. control; #P < 0.05 vs. WT.

En el tejido pulmonar, también se evaluó mediante western blot la expresión de las proteínas: β-catenina, Smad 2/3, fosfo (p)-Smad 2/3, extracellular signal-regulated kinase (Erk)1/2, fosfo(p)-Erk1/2, col tipo I, CTGF, TGF-β1, IL-13, IL-6, NOX4, p21, MUC4β, pTGFBR1 (**Figura 42 A y B**).

La expresión de TGF-β1, NOX4, MUC4β y MUC5β estuvo elevada en ratones WT expuestos a bleomicina pero no en MUC4-KO. Además, la expresión de MUC5β, también aumentó en los ratones WT tratados con bleomycin pero no en los ratones MUC4-KO. La activación de la fosforilación de Smad3 y Erk1 / 2, así como la activación de β-catenina, aumentaron en ratones WT tratados con bleomicina mientras que los ratones MUC4-KO tratados con bleomicina mostraron niveles similares a los ratones no tratados. La expresión del marcador de senescencia p21 también aumentó en ratones WT tratados con bleomicina pero no en ratones MUC4-KO tratados con bleomicina (**Figura 42 A y B**).

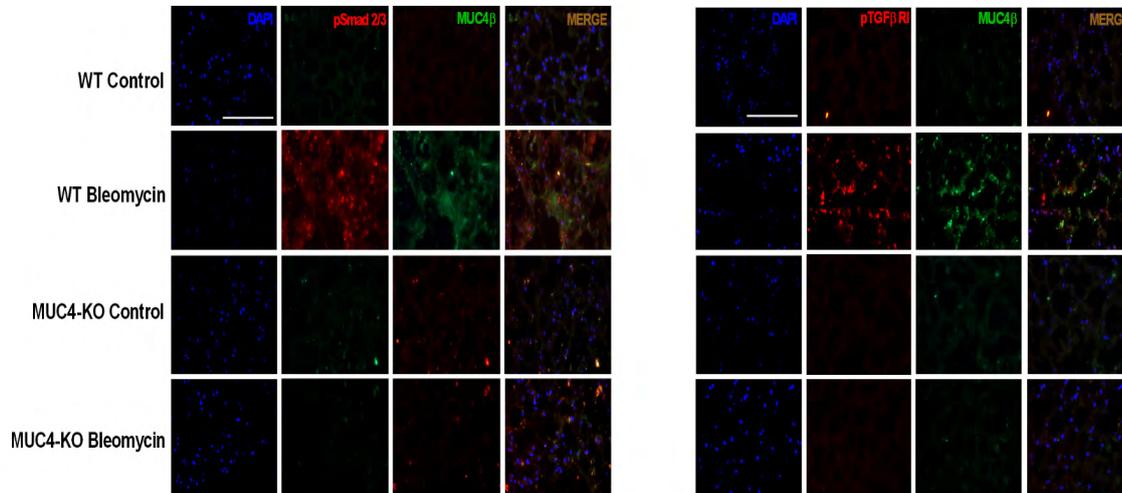


**Figura 42: La eliminación de MUC4 (KO) inhibe la expresión de ARNm inducida por bleomicina de marcadores moleculares de FP:** Ratones WT C57BL/6 y ratones MUC4-KO C57BL/6 recibieron una dosis intratraqueal única de 1,5U/Kg de bleomicina en día 1 (n=10). La proteína total fue analizada por western

blot en tejido pulmonar y cuantificada por densitometría. (A) Expresión de  $\beta$ -catenina, smad2/3, fosfo (p)-Smad2/3, Erk 1/2, fosfo(p)-Erk1/2, colágeno tipo I, CTGF. (B) TGF- $\beta$ 1, IL-13, IL-6, NOX4, p21, MUC4 y pTGF $\beta$ RI fueron medidas por western blot. Los datos son expresados como el ratio respecto a beta actina. Los resultados son expresados como media  $\pm$  SE. One-way ANOVA seguido por el post hoc Bonferroni test. \*P < 0.05 vs. control; #P < 0.05 vs. WT

También se estudió la co-localización de MUC4 $\beta$ /p-SMAD2/3 y MUC4 $\beta$ /pTGF $\beta$ RI mediante microscopía confocal obteniendo imágenes de inmunofluorescencia de cortes de pulmón de ratones con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. De la misma manera que en el tejido pulmonar de pacientes con FPI, las secciones de tejido pulmonar de ratón mostraron una distribución citoplasmática y nuclear co-localizada de los complejos MUC4 $\beta$ /p-SMAD2/3 y MUC4 $\beta$ /pTGF $\beta$ RI en áreas fibróticas de WT bleomicina ratones tratados. Sin embargo, en los ratones WT control la expresión de

estas proteínas fue prácticamente indetectable (**Figura 43**). Estos patrones de co-localización tampoco se observaron en ratones MUC4-KO debido a la ausencia de MUC4.



**Figura 43: Co-localización de MUC4β/p-SMAD2/3 y MUC4β/pTGFβRI en pulmón de ratones con FP inducida por bleomicina:** Ratones Wild type (WT) C57BL/6 y ratones MUC4-KO C57BL/6 recibieron una dosis intratraqueal única de 1,5U/Kg de bleomicina en día 1 (n=10). Imágenes representativas de tejido pulmonar de ratones WT control, WT bleomicina, MUC4-KO control y MUC4-KO bleomicina, fijado, permeabilizado e inmunoteñido para MUC4β/p-SMAD2/3 y MUC4β/pTGFβRI. Colocalización analizada usando un microscopio confocal que generó una superposición de ambos anticuerpos (color Amarillo). DAPI, nucleos azules. Escala: 10 μm.

## DISCUSIÓN

---

En este trabajo, se obtuvo tejido pulmonar de 21 sujetos sanos y 22 pacientes con FPI y analizamos la expresión de MUC4, en ambos grupos. Se observó que la MUC4 estaba sobreexpresada en tejido pulmonar de pacientes con FPI, y se localizaba principalmente en células ATII hiperplásicas y fibroblastos de áreas fibróticas, en las que se distribuía principalmente en el citoplasma celular y el núcleo.

El presente trabajo muestra la primera evidencia de la expresión y distribución de MUC4 $\beta$  en los pulmones de pacientes con FPI, así como de la interacción de la cadena MUC4 $\beta$  con la vía de señal canónica TGF- $\beta$ 1 que promueve los efectos celulares fibróticos.

Evidencias recientes han demostrado que MUC4 se sobreexpresa y participa en procesos celulares invasivos implicados en diferentes procesos malignos, incluidos tumores de pulmón, mama, páncreas, colon y ovario. Sin embargo, actualmente no hay evidencia sobre el papel de MUC4 en trastornos fibro-proliferativos como la fibrosis pulmonar. Datos recientes de la expresión del genoma completo de las arterias pulmonares de pacientes con FPI e HP mostraron una sobreexpresión significativa de MUC4 en comparación con las arterias pulmonares de pacientes sin FPI ni HP. Aunque el estudio posterior se centró en la remodelación de la arteria pulmonar de pacientes con FPI, los datos sugieren una sobreexpresión de MUC4 en el parénquima fibrótico pulmonar. En este estudio hemos confirmado esta hipótesis, que muestra que MUC4 se sobreexpresa en el tejido pulmonar de pacientes con FPI en comparación con donantes sanos, y que la expresión de MUC4 se encuentra en el parénquima, las arterias pulmonares y el epitelio bronquial. Aunque no disponemos de los datos de presión arterial pulmonar de los pacientes con FPI incluidos en este estudio, podemos suponer cierto grado de HP debido a la gravedad de los parámetros de la función pulmonar. La distribución celular de MUC4 en el tejido pulmonar de pacientes con FPI se localizó en células alveolares hiperplásicas patológicas tipo II, fibroblastos de pulmón de focos fibróticos y células epiteliales bronquiales apicales y basales que indican un posible papel de MUC4 en los procesos celulares de la FPI.

La mucina MUC4 se sintetiza como una cadena polipeptídica única de ~ 930 kDa, generando dos subunidades después de la escisión proteolítica en el sitio de GDPH, la subunidad extracelular de tipo mucina MUC4 $\alpha$  y una subunidad transmembrana

MUC4 $\beta$ . Las subunidades  $\alpha$  de MUC4 son responsables de su función como mucina, participando en la defensa de las células epiteliales, la lubricación y la adherencia celular, y la subunidad  $\beta$  parece contribuir a la señalización del crecimiento celular y la transformación celular. Por lo tanto, en este trabajo nos centramos en el análisis de la subunidad MUC4 $\beta$  tanto en su distribución tisular /celular como en su posible papel en los procesos celulares de la FPI.

La señalización de MUC4 $\beta$  parece estar mediada por la región extracelular de la subunidad MUC4 $\beta$ . La región extracelular de MUC4 $\beta$  contiene tres dominios similares al EGF. Se ha demostrado que MUC4 $\beta$  y HER2 se asocian cuando las dos proteínas se coexpresan en las mismas células. La expresión de MUC4 $\beta$  induce la fosforilación de HER2, activando así la vía MAPK y la internalización nuclear de  $\beta$ -catenina. Mientras que el complejo MUC4 $\beta$  / HER2 se asocia con la reparación epitelial tras la aparición de una lesión, la expresión aberrante de MUC4 $\beta$  se ha asociado con la proliferación celular, la transformación epitelial a mesenquimatosa y el desarrollo de metástasis en el cáncer.

La señalización aberrante de EGFR está asociada con la patogénesis en etapa temprana de la fibrosis pulmonar, sin embargo, su sobreexpresión y activación se limita a HER1 en lugar de HER2. Este hecho, orientó nuestra investigación a los efectos aislados de MUC4 $\beta$  ya que se ha informado que MUC4 eleva la supervivencia de las líneas celulares que carecen de expresión del receptor HER o de activación con la expresión de MUC4. Estas observaciones apuntan a la existencia de al menos otra vía a través del cual MUC4 influye en los efectos celulares.

TGF- $\beta$ 1 es un potente factor de crecimiento fibrótico que aumenta y se activa en la fibrosis pulmonar idiopática. Sin embargo, los esfuerzos para atacar la activación de TGF- $\beta$ 1 tienen efectos secundarios importantes y su desarrollo clínico ha sido decepcionante. En esta línea, la modulación de la vía TGF- $\beta$ 1 podría ser una opción atractiva. En este trabajo planteamos la hipótesis de que MUC4 $\beta$  podría interactuar con la vía TGF- $\beta$ 1 que modula la fibrosis pulmonar y los procesos celulares clave implicados en la fibrosis pulmonar, como la transición epitelial a mesenquimatosa, transición de fibroblastos a miofibroblastos, senescencia y proliferación celular. Observamos que los efectos de TGF- $\beta$ 1 en la transición de células epiteliales alveolares a mesenquimales, transición de fibroblastos a miofibroblastos, senescencia celular y proliferación de fibroblastos se inhibieron cuando la expresión de MUC4 fue reprimida por la transfección de células siRNA-MUC4. Por el contrario, la

sobreexpresión de MUC4 usando la línea celular estable HEK293 / Tet3G / TRE3G-MUC4 inducible aumentó los efectos de TGF- $\beta$ 1 sobre la transformación de miofibroblastos y la senescencia celular. Los miofibroblastos son componentes celulares clave de la fibrosis pulmonar que comparten características celulares de los fibroblastos, como la capacidad de secretar MEC y las fibras de las células musculares lisas que permiten que el miofibroblastos se contraiga y migre para invadir el tejido pulmonar. El origen de los miofibroblastos ha sido ampliamente discutido y posiblemente la transición mesenquimal de las células epiteliales alveolares aberrantes tipo II y la transformación de fibroblastos residentes en miofibroblastos pueden estar implicadas. Por lo tanto, el papel de MUC4 $\beta$  en las transformaciones celulares observadas en este trabajo, junto con las propiedades proliferativas de antiapoptóticos / senescencia y fibroblastos podría tener valor traslacional en la FPI.

El hecho de que utilizamos líneas celulares A549, MRC5 y HEK293 para explorar el papel de MUC4 $\beta$  en los efectos fibróticos de TGF- $\beta$ 1 podría interpretarse como una limitación de este estudio, ya que el uso de células primarias de pacientes con FPI habría sido más apropiado. Sin embargo, el elevado número de células y la estabilidad celular requerida para realizar el silenciamiento génico y los ensayos de transfección de plásmidos justifican el uso de líneas celulares en lugar de células primarias.

La siguiente aproximación fue investigar si MUC4 $\beta$  modula la señalización de TGF- $\beta$ 1. TGF- $\beta$ 1 ejerce su acción uniéndose e induciendo la formación de complejos receptores de la superficie celular que consisten en receptores de serina-treonina quinasa de tipo I (TGF $\beta$ RI) y de tipo II (TGF $\beta$ RII). Tras la unión del ligando, el TGF $\beta$ RII fosforila y activa el TGF $\beta$ RI. El complejo heteromérico resultante facilita la fosforilación y la posterior activación de la vía canónica SMAD intracelular. En el presente trabajo, las células HEK293 que sobreexpresan MUC4 mostraron un aumento de la fosforilación de TGF $\beta$ RI y SMAD3 en respuesta al ligando TGF- $\beta$ 1. Del mismo modo, las células epiteliales alveolares y los fibroblastos de pulmón transfectados de forma transitoria con siRNA-MUC4 con expresión reducida de MUC4 mostraron una inhibición de la fosforilación de TGF $\beta$ RI y SMAD3 en respuesta a TGF- $\beta$ 1. Estos resultados indican que puede haber algún tipo de interacción entre el sistema TGF- $\beta$ 1 y MUC4 $\beta$ . Los experimentos de inmunoprecipitación mostraron que TGF- $\beta$ 1 induce una formación de complejo proteico entre MUC4 $\beta$  / p-TGF $\beta$ RI / p-SMAD3 que aumenta cuando se sobreexpresa MUC4 $\beta$ . Del mismo modo, los complejos MUC4 $\beta$  / p-TGF $\beta$ RI y MUC4 $\beta$  / p-SMAD3 inducidos por TGF- $\beta$ 1 se localizaron en la membrana plasmática de las células epiteliales alveolares y también en las células del tejido

pulmonar con FPI y en el tejido pulmonar de animales tratados con bleomicina. La formación de los complejos proteicos activó el elemento de unión Smad que regula la expresión génica de los genes dependientes pro-fibróticos SMAD3. El papel pro-fibrótico de MUC4 se confirmó in vivo usando un modelo animal de fibrosis pulmonar inducido por instilación intratraqueal de bleomicina. El silenciamiento génico in vivo de MUC4 atenúa la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones, mejorando la supervivencia y reduciendo la expresión de proteínas y genes profibróticos. Estos resultados confirmaron los observados in vitro y pueden explicar los efectos de la sobreexpresión de MUC4 en el tejido pulmonar de los pacientes con FPI.

En resumen, los datos presentados en este trabajo muestran por primera vez la sobreexpresión y la distribución patológica de MUC4 $\beta$  en el tejido pulmonar de pacientes con FPI. La sobreexpresión de MUC4 $\beta$  coopera con la fosforilación de la señalización de TGF $\beta$ RI y SMAD3 que promueve trastornos celulares fibróticos que podrían ser dirigidos como terapia futura en la FPI.

## CONCLUSIONES

---

- MUC4 $\beta$  se sobreexpresa en las células hiperplásicas ATII, células epiteliales bronquiales superficiales y basales y en los fibroblastos de los pulmones de FPI..
- MUC4 $\beta$  participa en las transiciones de ATII a mesenquimales y de fibroblastos a miofibroblastos, y en la senescencia de fibroblastos de pulmón y proliferación de fibroblastos de pulmón inducida por TGF- $\beta$ 1 in vitro.
- MUC4 $\beta$  bioactivada forma complejos de proteínas con p-Smad3 y act- $\beta$ -catenina, que migran hacia el núcleo de ATII y los fibroblastos para promover la activación del ADN de la SBE y aumentar la transcripción del gen profibrótico
- La fibrosis pulmonar inducida por bleomicina se atenúa en ratones MUC4-KO
- El mecanismo de acción de la pirfenidona se explica, casi en parte, por la inhibición de la fosforilación de Smad3 inducida por TGF- $\beta$ 1 y la consiguiente inhibición de las fosforilaciones de MUC4 reduciendo así la acción- $\beta$ -catenina y la translocación nuclear. de p-Smad3 / MUC4 $\beta$  / act- $\beta$ -catenina.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Akhurst, R.J., Hata, A. (2012). Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov*, 11, 790-811. doi: 10.1038/nrd3810.
- Alder, J.K., Chen, J.J-L., Lancaster, L., Danoff, S., Su, S., Cogan, J.D., Vulto, I., Xie, M., Qi, X., Tudor, R.M., Phillips, J.A. 3rd, Lansdorp, P.M., Loyd, J.E., Armanios, M.Y.J.D. (2008). Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(35), 13051-13056. doi: 10.1073/pnas.0804280105.
- Ali, M., Lillehoj, E.P., Park, Y., Kyo, Y., Kim, K.C. (2011). Analysis of the proteome of human airway epithelial secretions. *Proteome Sci*, 9, 4. doi: 10.1186/1477-5956-9-4.
- 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 (2002). *Am J Respir Crit Care Med*, 165(2), 277-304. doi: 10.1164/ajrccm.165.2.ats01.
- Antoniou, K.M., Wells, A.U. (2013). Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration*, 86(4), 265-274. doi: 10.1159/000355485.
- Arancibia, S.A., Beltrán, C.J., Aguirre, I.M., Silva, P., Peralta, A.L., Malinarich, F., Hermoso, M.A (2007). Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res*, 40(2), 97-112. doi: 10.4067/s0716-97602007000200001.
- Armulik, A., Genove, G., Betsholtz, C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*, 21(2), 193-215. doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.001.
- Axell-House, D.B., Yu, V., Zhang, Z., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Mehrad, B. (2018) Fibrocytes in Pulmonary Fibrosis: Double-Blind Placebo-Controlled Crossover Pilot Study of Sildenafil in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 197, A4353.
- Azuma, A., Nukiwa, T., Tsuboi, E., Moritaka, S., Shosaku, A., Koichiro N., Yoshio, T., Sonoko, N., Harumi, I., Motoharu, O., Atsuhiko, S., Shoji K. (2005). Double-blind, placebo-controlled trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 171(9), 1040-1047. doi: 10.1164/rccm.200404-571OC.
- Bafna, S., Kaur, S., Batra, S.K. (2010). Membrane-bound mucins: The mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene*, 29(20), 2893-2904. doi: 10.1038/onc.2010.87.
- Bagnato, G., Harari, S. (2015). Cellular interactions in the pathogenesis of interstitial lung diseases. *European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society*, 24(135), 102-114. doi: 10.1183/09059180.00003214.
- Ballester, B., Milara, J., Cortijo, J. (2019a). Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lung Cancer: Mechanisms and Molecular Targets. *Int J Mol Sci*; 20(3), 593. doi: 10.3390/ijms20030593.
- Ballester, B., Milara, J., Cortijo, J. (2019b). Mucins as a New Frontier in Pulmonary Fibrosis. *J Clin Med*, 8(9), 1447. doi: 10.3390/jcm8091447.
- Ballester, B., Roger, I., Contreras, S., Montero, P., Milara, J. (2017). Role of MUC1 in idiopathic pulmonary fibrosis: Mechanistic insights. In *Proc Eur Respir Soc Congress*, Milan, Italy.
- Ballinger, M.N., Newstead, M.W., Zeng, X., Bhan, U., Mo, X.M., Kunkel, S.L., Moore, B.B., Flavell, R., Christman, J.W., Standiford, T.J. (2015). IRAK-M promotes alternative macrophage activation and fibroproliferation in bleomycin-induced lung injury. *J Immunol* 2015, 194(4), 1894-1904. doi: 10.4049/jimmunol.1402377.
- Bals, R., Hiemstra, P.S. (2004). Innate immunity in the lung: How epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*, 23(2), 327-333. doi: 10.1183/09031936.03.00098803.

- Battegay, E.J., Raines, E.W., Colbert, T., Ross, R. (1995). TNF-alpha stimulation of fibroblast proliferation. Dependence on platelet-derived growth factor (PDGF) secretion and alteration of PDGF receptor expression. *J Immunol*, 154, 6040-6047.
- Bennett, W.P., Colby, T.V., Travis, W.D., Borkowski, A., Jones, R.T., Lane, D.P., Metcalf, R.A., Samet, J.M., Takeshima, Y., Gu, J.R., Vähäkangas, K. H., Soini, Y., Pääkkö, P., Welsh, J.A., Trump B.F., Harris, C.C. (1993). p53 protein accumulates frequently in early bronchial neoplasia. *Cancer Res*, 53(20), 4817-4822.
- Bouros, D., Antoniou, K.M. (2005). Current and Future Therapeutic Approaches in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Eur Respir J*, 26(4):693-702. doi: 10.1183/09031936.05.00145004.
- Burdick, M.D., Murray, L.A., Keane, M.P., Xue, Y.Y., Zisman, D.A., Belperio, J.A., Strieter, R.M.(2005). CXCL11 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*, 171(3), 261-268. doi: 10.1164/rccm.200409-1164OC.
- Cesen-Cummings, K., Fernstrom, M.J., Malkinson, A.M., Ruch, R.J. (1998). Frequent reduction of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human and mouse lung carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 19(1), 61–67. doi: 10.1093/carcin/19.1.61.
- Chakraborty, S., Chopra, P., Ambi, S.V., Dastidar, S.G., Ray, A. (2014). Emerging therapeutic interventions for idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs*, 23(7), 893-910. doi: 10.1517/13543784.2014.913569.
- Chambers, R.C. (2008). Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention? *Br J Pharmacol*, 153 (Suppl 1); S367-378. doi: 10.1038/sj.bjp.0707603.
- Chang, C.C., Shih, J.Y., Jeng, Y.M., Su, J.L., Lin, B.Z., Chen, S.T., Chau, Y.P., Yang, P.C., Kuo, M.L. (2004). Connective tissue growth factor and its role in lung adenocarcinoma invasion and metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 96(5), 364-375. doi: 10.1093/jnci/djh059.
- Chaudhary, N.I., Roth, G.J., Hilberg, F., Müller-Quernheim, J., Prasse, A., Zissel, G., Schnapp, A., Parket, J.E. (2007). Inhibition of PDGF, VEGF and FGF signalling attenuates fibrosis. *Eur Respir J*, 29(5), 976-985.
- Chilosi, M., Poletti, V., Zamo, A., Lestani, M., Montagna, L., Piccoli, P., Pedron, S., Bertaso, M., Scarpa, A., Murer, B., Cancellieri, A., Maestro, R., Semenzato, G., Doglioni, C. (2003). Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*, 162(5), 1495-1502. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64282-4.
- Conte, E., Fruciano, M., Fagone, E., Gili, E., Caraci, F., Iemmolo, M., Crimi, N., Vancheri, C. (2011). Inhibition of PI3K prevents the proliferation and differentiation of human lung fibroblasts into myofibroblasts: The role of class I P110 isoforms. *PLoS ONE*, 6, e24663. doi: 10.1371/journal.pone.0024663.
- Conte, E., Gili, E., Fruciano, M., Korfei, M., Fagone E, Iemmolo M, Lo Furno D, Giuffrida R, Crimi N, Guenther A, Vancheri C. (2013). PI3K p110gamma overexpression in idiopathic pulmonary fibrosis lung tissue and fibroblast cells: In vitro effects of its inhibition. *Lab Invest*, 93(5), 566–576. doi: 10.1038/labinvest.2013.6.
- Coon, D.R., Roberts, D.J., Loscertales, M., Kradin, R. (2006). Differential epithelial expression of SHH and FOXF1 in usual and nonspecific interstitial pneumonia. *Exp Mol Pathol*, 80(2), 119–123. doi: 10.1016/j.yexmp.2005.12.003.
- Coyne, C.B. Vanhook, M.K., Gambling, T.M., Carson, J.M., Boucher, R.C., Johnson L.G. (2002). Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Mol Biol Cell*, 13(9), 3218–3234 doi: 10.1091/mbc.e02-03-0134.
- Crestani, B., Chapron, J., Wallaert, B., Bergot, E., Delaval, P., Israel-Biet, D., Lacronique, J., Monnet, I., Reynaud-Gaubert, M., Tazi, A., Lebtahi, R., Debray, MP., Brauner, M., Dehoux, M., Dornic, Q., Aubier, M., Mentré, F., Duval, X. (2012).

- Octreotide treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a proof-of-concept study. *Eur Respir J*, 39(3), 772-775. doi: 10.1183/09031936.00113011.
- Cronkhite, J.T., Xing, C., Raghu, G., Chin, K.M., Torres, F., Rosenblatt, R.L., Garcia, C.K. (2008). Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 178(7), 729-737. doi: 10.1164/rccm.200804-550OC
  - Daniels, C.E., Lasky, J.A., Limper, A.H., Mieras, K., Gabor, E., Schroeder, D.R. (2010). Imatinib treatment for idiopathic pulmonary fibrosis: Randomized placebo-controlled trial results. Imatinib-IPF Study Investigators. *Am J Respir Crit Care Med*, 181, 604-610. doi: 10.1164/rccm.200906-096.
  - Dela Cruz, C.S., Tanoue, L.T., Matthay, R.A. (2011). Lung cancer: Epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med*, 32(4), 605-644. doi: 10.1016/j.ccm.2011.09.001.
  - Demedts, M., Behr, J., Buhl, R., Costabel, U., Dekhuijzen, R., Jansen, H.M., MacNee, W., Thomeer, M., Wallaert, B., Laurent, F., Nicholson, A.G., Verbeken, E.K., Verschakelen, J., Flower, C.D., Capron, F., Petruzzelli, S., De Vuyst, P., van den Bosch, J.M., Rodriguez-Becerra, E., Corvasce, G., Lankhorst, I., Sardina, M., Montanari, M.; IFIGENIA Study Group. (2005). High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 353(21), 2229-2242.
  - Dohrman A, Miyata, S., Gallup, M., Li, J.D., Chapelin, C., Coste, A., Escudier, E., Nadel, J., Basbaum C. (1998). Mucin gene (MUC 2 and MUC 5AC) upregulation by Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1406(3), 251-259. doi: 10.1016/s0925-4439(98)00010-6.
  - du Bois, R.M. (2010). Strategies for treating idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Drug Discov*, 9(2), 129-140. doi: 10.1038/nrd2958.
  - Ellison, R.T., Giehl, T.J. (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin Invest*, 88(4), 1080-1091. doi: 10.1172/JCI115407.
  - Evans, C.M., Kim, K., Tuvim, M.J., Dickey, B.F. (2009). Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects. *Curr Opin Pulm Med*, 15(1), 4-11. doi: 10.1097/MCP.0b013e32831da8d3.
  - Fabian, S.L., Penchev, R.R., St-Jacques, B., Rao, A.N., Sipilä, P., West, K.A., McMahon, A.P., Humphreyset, B.D. (2012). Hedgehog-Gli pathway activation during kidney fibrosis. *Am J Pathol*, 180(4), 1441-1453. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.12.039.
  - Farkas, L., Gauldie, J., Voelkel, N.F., Kolb, M. (2011). Pulmonary hypertension and idiopathic pulmonary fibrosis: a tale of angiogenesis, apoptosis, and growth factors. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 45(1): p. 1-15. doi: 10.1165/rcmb.2010-0365TR.
  - Fehervari Z, Kiyono H. (2008). The mucosa: at the frontlines of immunity. *Trends Immunol*, 29(4), 503-504. doi: 10.1016/j.it.2008.09.001.
  - Fernandez, I.E., Eickelberg, O. (2012). New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*, 380(9842), 680-688. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61144-1.
  - Fingerlin, T.E., Murphy, E., Zhang, W., Peljto, A.L, Brown, K.K., Steele, M.P., Loyd, J.E., Cosgrove, G.P., Lynch, D., Groshong, S., Collard, H.R., Wolters, P.J., Bradford, W.Z., Kossen, K., Seiwert, S.D., du Bois, R.M., Garcia, C.K., Devine, M.S., Gudmundsson, G., Isaksson, H.J., Kaminski, N., Zhang, Y., Gibson, K.F., Lancaster, L.H., Cogan, J.D., Mason, W.R., Maher, T.M., Molyneaux, P.L., Wells, A.U., Moffatt, M.F., Selman, M., Pardo, A., Kim, D.S., Crapo, J.D., Make, B.J., Regan, E.A., Walek, D.S., Daniel, J.J., Kamatani, Y., Zelenika, D., Smith, K., McKean, D., Pedersen, B.S., Talbert, J., Kidd, R.N., Markin, C.R., Beckman, K.B., Lathrop, M., Schwarz, M.I., Schwartz, D.A. (2013). Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nat Genet*, 45, 613-620. doi: 10.1038/ng.2609.
  - Fitzgerald, D.B., Moloney, F., Twomey, M., O'Connell, J.O., Cronin, o., Harty, L., Harney, S., Henry, M.T. (2015). Efficacy and Safety of Rituximab in Connective Tissue Disease related Interstitial Lung Disease. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 32(3), 215-221.

- Fumarola, C., Bonelli, M.A., Petronini, P.G., Alfieri, R.R. (2014). Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol*, 90(3), 197–207. doi: 10.1016/j.bcp.2014.05.011.
- Funke, M., Zhao, Z., Xu, Y., Chun, J., Tager, A.M. (2012). The lysophosphatidic acid receptor LPA1 promotes epithelial cell apoptosis after lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 46(3), 355–364. doi: 10.1165/rcmb.2010-0155OC.
- Ganesan, S., Comstock, A.T., Sajjan, U.S. (2013). Barrier function of airway tract epithelium. *Tissue barriers*, 1(4), e24997. doi: 10.4161/tisb.24997.
- Ganz, T. (2002). Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest*, 109(6), 693–697. doi: 10.1172/JCI115218.
- Gendler S.J., Lancaster, C.A., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Lalani, E.N., Wilson, D. (1990). Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem*, 265(25), 15286–15293.
- Gensch, E., Gallup, m., Sucher, A., Li, D., Gebremichael, A., Lemjabbar, H., Mengistab, A., Dasari, V., Hotchkiss, J., Harkema, j., Basbaum, C. (2004). Tobacco smoke control of mucin production in lung cells requires oxygen radicals AP-1 and JNK. *J. Biol. Chem*, 279(37), 39085–39093. doi: 10.1074/jbc.M406866200.
- Giroux-Leprieur, E., Costantini, A., Ding, V.W., He, B. (2018). Hedgehog Signaling in Lung Cancer: From Oncogenesis to Cancer Treatment Resistance. *Int J Mol Sci*, 19(9), 2835. doi: 10.3390/ijms19092835.
- Gorina E, Goldin J, Hyun KG, Zhong, M., Sekayan, T., Yu, E., Kouchakji, E. (2020). Lung Fibrosis Measured by Quantitative High Resolution Computed Tomography (qHRCT) in Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) Patients Treated with Pamrevlumab (FG-3019). *Am J Respir Crit Care Med*, 1201, A7688.
- Greene, C.M., McElvaney, N.G. (2005). Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells. *Arch Immunol Ther Exp*, 53(5), 418–427.
- Grimminger, F., Gunther, A., Vancheri, C. (2015). The role of tyrosine kinases in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 45(5), 1426–1433. doi: 10.1183/09031936.00149614.
- Gu, L., Tseng, S., Horner, R.M., Tam, C., Loda, M., Rollins, B.J. (2000). Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature*, 404(6776), 407–411. doi: 10.1038/35006097.
- Gunther, A., Mosavi, P., Ruppert, C., Heinemann, S., Temmesfeld, B., Velcovsky, H.G., Morr, H., Grimminger, F., Walmrath, D., Seeger, W. (2000). Enhanced tissue factor pathway activity and fibrin turnover in the alveolar compartment of patients with interstitial lung disease. *Thromb Haemost*, 83(6), 853–60.
- Hall, J.E. & Guyton, J.E. (2016). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*, 13<sup>a</sup> ed. Barcelona: Elsevier.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 44(5), 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hancock, A., Armstrong, L., Gama, R., Millar, A. (1998). Production of interleukin 13 by alveolar macrophages from normal and fibrotic lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 18(1), 60–65. doi: 10.1165/ajrcmb.18.1.2627.
- Hansel, T.T., Johnston, S.L., Openshaw, P.J. (2013). Microbes and mucosal immune responses in asthma. *Lancet*, 381, 861–873. doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62202-8.
- Hattori, T., Zhou, X., Trudeau, J.B., Wenzel, S.E. (2013). MUC4 Protein Is Increased In Severe Asthmatic Bronchial Epithelial Cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 187: A2404.
- Hetzel, M., Bachem, M., Anders, D., Trischler, G., Faehling, M. (2005). Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Lung*, 183(4), 225–237. doi: 10.1007/s00408-004-2534-z.
- Hirani, N., Mackinnon, A.C., Nicol L., Walker, J., Ford, P., Schambye, H., Pederson, A., Nilsson, U., Leffler, H., Thomas, T., Francombe, D., Simpson, J., Gibbons, M., Maher,

- T.M. (2017). A Novel Inhaled Galectin-3 Inhibitor for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). Results from the First in (IPF) Patients Study. *Am J Respir Crit Care Med*, 195: A7560.
- Hoffmann J, Wilhelm J, Marsh LM, Ghanim, B., Klepetko, W., Kovacs, G., Olschewski, H., Olschewski, A., Kwapiszewska, G. (2014). 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*, 190(1): 98-111. doi: 10.1164/rccm.201401-0037OC.
  - Hodgson, U., Laitinen, T., Tukiainen, P. (2002) Nationwide Prevalence of Sporadic and Familial Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence of Founder Effect Among Multiplex Families in Finland. *Thorax*, 57(4): 338-42. doi: 10.1136/thorax.57.4.338.
  - Holt, P.G., Strickland, D.H., Wikström, M.E., Jahnsen, F.L. (2008). Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol*, 8(2), 142-152. doi: 10.1038/nri2236.
  - Horowitz, J.C., Lee, D.Y., Waghray, M., Keshamouni, V.G., Thomas, P.E., Zhang, H., Cui, Z., Thannickal, V.J. (2004). Activation of the pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway by transforming growth factor-beta1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor. *J Biol Chem*, 279: 1359-1367. doi: 10.1074/jbc.M306248200.
  - Hosaka, K., Yang, Y., Seki, T., Fischer, C., Dubey, O., Fredlund, E., Hartman, J., Religa, P., Morikawa, H., Ishii, Y., Sasahara, M., Larsson, O., Cossu, G., Cao, R., Lim, S., Cao, Y. (2016). Pericyte-fibroblast transition promotes tumor growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113(38): E5618-E5627. doi: 10.1073/pnas.1608384113.
  - Huang, S.K., Scruggs, A.M., McEachin, R.C., White, E.S., Peters-Golden, M. (2014). Lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis exhibit genome-wide differences in DNA methylation compared to fibroblasts from nonfibrotic lung. *PLoS ONE*, 9(9): e107055. doi: 10.1371/journal.pone.0107055.
  - Hubbard, R., Lewis, S., Richards, K., Johnston, I., Britton, J. (1996). Occupational Exposure to Metal or Wood Dust and Aetiology of Cryptogenic Fibrosing Alveolitis. *Lancet*, 347(8997): 284-289. doi: 10.1016/s0140-6736(96)90465-1.
  - Hwang, A.J., Kim, D., Chun, S.M., Bae, S., Song, J.S., Kim, M.Y., Koo, H.J., Song, J.W., Kim, W.S., Lee, J.C., Kim, H.R., Choi, C., Jang, S.J. (2018). Genomic profiles of lung cancer associated with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol*, 244(1), 25-35. doi: 10.1002/path.4978.
  - Ibrahim, H.R., Aoki T., Pellegrini A. (2002). Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme and aprotinin as model molecules. *Curr Pharm Des*, 8(9), 671-693. doi: 10.2174/1381612023395349.
  - Ishikawa, N., Hattori, N., Yokoyama, A., Kohno, N. (2012) Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases. *Respir Investig*, 50(1), 3-13. doi: 10.1016/j.resinv.2012.02.001.
  - Itoh, Y., Kamata-Sakurai, M., Denda-Nagai, K., Nagai, S., Tsuiji, M., Ishii-Schrade, K., Okada, K., Goto, A., Fukayama, M., Irimura, T. (2008). Identification and expression of human epiglycanin/MUC21: a novel transmembrane mucin. *Glycobiology*, 18(1), 74-83. doi: 10.1093/glycob/cwm118.
  - Jacquot, J., Hayem, A., Galabert, C. (1992). Functions of proteins and lipids in airway secretions. *Eur Respir J*, 5(3), 343-358.
  - Jenkins, R.G., Moore, B.B., Chambers, R.C., Eickelberg, O., Königshoff, M., Kolb, M., Laurent, G.J., Nanthakumar, C.B., Olman, M.A., Pardo, A., Selman, M., Sheppard, D., Sime, P.J., Tager, A.M., Tatler, A.L., Thannickal, V.J., White, E.S., ATS Assembly on Respiratory Cell and Molecular Biology (2017). An Official American Thoracic Society Workshop Report: Use of Animal Models for the Preclinical Assessment of Potential Therapies for Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 56(8), 667-679. doi: 10.1165/rcmb.2017-0096ST.

- Jonckheere, N., Skrypek, M., Merlin, J., Dessein, A.F., Dumont, P., Leteurtre, E., Harris, A., Desseyn, J.L., Susini, C., Frénois, F., Van Seuningenet, I. (2012). The mucin muc4 and its membrane partner erbb2 regulate biological properties of human capan-2 pancreatic cancer cells via different signalling pathways. *PLoS One*, 7(2), e32232. doi: 10.1371/journal.pone.0032232.
- Karachaliou, N., Mayo, C., Costa, C., Magrí, I., Gimenez-Capitan, A., Molina-Vila, M.A., Rosell, R. (2013). KRAS mutations in lung cancer. *Clin Lung Cancer*, 14(3), 205-214. doi: 10.1016/j.clcc.2012.09.007.
- Kawasaki, H., Ogura, T., Yokose, T., Nagai, K., Nishiwaki, Y., Esumi, H. (2001). p53 gene alteration in atypical epithelial lesions and carcinoma in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol*, 32(10), 1043-1049. doi: 10.1053/hupa.2001.28246.
- Khalil, N., Manganas, H., Ryerson, C.J., Shapera, S., Cantin, A.M., Hernandez, P., Turcotte, E.E., Parker, J.M., Moran, J.E., Albert, G.R., Sawtell, R., Hagerimana, A., Laurin, P., Gagnon, L., Cesari, F., Kolb, M. (2018). Phase 2 clinical trial of PBI-4050 in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 53(3), 1800663. doi: 10.1183/13993003.00663-2018.
- Kierszenbaum, A.L. (2006). *Histology and Cell Biology. An Introduction to Pathology. Tissue and Cell*, 6: 157–163.
- Kim, K.K., Wei, Y., Szekeres, C., Kugler, M.C., Wolters, P.J., Hill, M.L., Frank, J.A. Brumwell, A.N., Wheeler, S.E., Kreidberg, J.A., Chapman H.A. (2009). Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*, 119(1), 213-224. doi: 10.1172/JCI36940.
- King, T.E. Jr., Bradford, W.Z., Castro-Bernardini, S., Fagan, E.A., Glaspole, I., Glassberg, M.K., Gorina, E., Hopkins, P.M., Kardatzke, D., Lancaster, L., Lederer, D.J., Nathan, S.D., Pereira, C.A., Sahn, S.A., Sussman, R., Swigris, J.J., Noble, P.W. ASCEND Study Group (2014). A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 370(22): 2083-2092. doi: 10.1056/NEJMoa1402582.
- Kirkham, S., Kolsum, U., Rousseau, K., Singh, D., Vestbo, J., Thornton, D.J. (2008). MUC5B is the major mucin in the gel phase of sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 178(10), 1033-1039. doi: 10.1164/rccm.200803-391OC.
- Knight, D.A., Holgate, S.T. (2003). The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology*, 8(4), 432-446. doi: 10.1046/j.1440-1843.2003.00493.x.
- Knight, D.A., Ernst, M., Anderson, G.P., Moodley, Y.P., Mutsaers, S.E. (2003). The role of gp130/IL-6 cytokines in the development of pulmonary fibrosis: critical determinants of disease susceptibility and progression?. *Pharmacol Ther*, 99(3), 327-338. doi: 10.1016/s0163-7258(03)00095-0.
- Knowles, M.R., Boucher, R.C. (2002). Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*, 109(5), 571-577. doi: 10.1172/JCI15217.
- Kolb, M., Richeldi, L., Behr, J., Maher, T.M., Tang, W., Stowasser, S., Hallmann, C., du Bois, R.M. (2017). Nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and preserved lung volume. *Thorax*, 72(4), 340-346. doi: 10.1136/thoraxjnl-2016-208710.
- Konigshoff, M. Lung cancer in pulmonary fibrosis: Tales of epithelial cell plasticity. (2005). *Respir Int Rev Thorac Dis*, 81(5), 353-358. doi: 10.1159/000326299.
- Kim, K.C. (2012). Role of epithelial mucins during airway infection. *Pulm Pharmacol Ther*, 25(6), 415-419. doi: 10.1016/j.pupt.2011.12.003.
- Lan, H.Y. (2011). Diverse roles of TGF-beta/Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci*, 7(7), 1056-1067. doi: 10.7150/ijbs.7.1056.
- Landi, M.T., Chatterjee, N., Yu, K., Goldin, L.R., Goldstein, A.M., Rotunno, M., Mirabello, L., Jacobs, K., Wheeler, W., Yeager, M., Bergen, A.W., Li, Q., Consonni, D., Pesatori, A.C., Wacholder, S., Thun, M., Diver, R., Oken, M., Virtamo, J., Albanes, D.,

- Wang, Z., Burdette, L., Doheny, K.F., Pugh, E.W., Laurie, C., Brennan, P., Hung, R., Gaborieau, V., McKay, J.D., Lathrop, M., McLaughlin, J., Wang, Y., Tsao, M.S., Spitzm M.R., Wang, Y., Krokan, H., Vatten, L., Skorpen, F., Arnesen, E., Benhamou, S., Bouchard, C., Metspalu, A., Vooder, T., Nelis, M., Völk, K., Field, J.K., Chen, C., Goodman, G., Sulem, P., Thorleifsson, G., Rafnar, T., Eisen, T., Sauter, W., Rosenberger, A., Bickeböller, H., Risch, A., Chang-Claude, J., Wichmann, H.E., Stefansson, K., Houlston, R., Amos, C.I., Fraumeni, J.F. Jr, Savage, S.A., Bertazzi, P.A., Tucker, M.A., Chanock, S., Caporaso, N.E. (2009). A genome-wide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma. *Am J Hum Genet*, 85(5), 679-691. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.09.012.
- Langevin, S.M., Kratzke, R.A., Kelsey, K.T. (2015). Epigenetics of lung cancer. *Transl Res* 165(1), 74–90. doi: 10.1016/j.trsl.2014.03.001.
  - Lawrence, J., Nho, R. (2018). The Role of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Pulmonary Fibrosis. *Int J Mo. Sci* 2018; 19: 778. doi: 10.3390/ijms19030778.
  - Lederer, D.J., Martinez, F.J. (2018). Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med* 2018; 378: 1811–1823.
  - Lee, C.G., Kang, H.R., Homer, R.J., Chupp, G., Elias, J.A. (2006). Transgenic modeling of transforming growth factor-beta (1): Role of apoptosis in fibrosis and alveolar remodeling. *Proc Am Thorac Soc*, 3(5), 418-423. doi: 10.1513/pats.200602-017AW.
  - Lemmon, M.A., Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117-1134. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.
  - Ley, B., Collard, H.R. (2013). Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Epidemiol*, 5, 483-492. doi: 10.2147/CLEP.S54815.
  - Li, Y., Martin, L.D., Spizz, G., Adler, K.B. (2001). MARCKS protein is a key molecule regulating mucin secretion by human airway epithelial cells in vitro. *J Biol Chem*, 276(44), 40982-40990. doi: 10.1074/jbc.M105614200.
  - Linares, M.J., Jareño, J., Almonacid, C., Casanova, A., Flandes, J., Jures-tschke, M.A., Perpiñá, M., Laporta, R., Gaité, A., Gómez, L., De Granda, I., Gallego, V., Ancochea, J. (2007). Interstitial Lung Diseases Incidence in Guadalajara and Madrid Community. XVII European Respiratory Society. Ann Congress. Stockholm, Sweden.
  - Lipson, K.E., Wong, C., Teng, Y., Sponget, S. (1996). CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*; 5 (Suppl 1): S24. doi: 10.1186/1755-1536-5-S1-S24.
  - Liu, F., Hata, A., Baker, J.C., Doody, J., Cárcamo, J., Harland, R.M., Massagué J. (1996). A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature*, 381(6583), 620-623. doi: 10.1038/381620a0.
  - Loffek, S., Schilling, O., Franzke, C.W. (2011). Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J*, 38(1), 191-208. doi: 10.1183/09031936.00146510.
  - Loomis-King, H., Flaherty, K.R., Moore, B.B. (2013). Pathogenesis, current treatments and future directions for idiopathic pulmonary fibrosis. *Curr Opin Pharmacol*, 13(3), 377-385. doi: 10.1016/j.coph.2013.03.015.
  - Lopez- Campos JL, Rodríguez-Becerra E; Neumosur Task Group; Registry of Interstitial Lung Diseases. (2004). Incidence of interstitial lung diseases in the south of Spain 1998-2000: the RENIA study. *Eur J Epidemiol*, 19(2), 155-161. doi: 10.1023/b:ejep.0000017660.18541.83.
  - Losa, D., Chanson, M., Crespín, S. (2011). Connexins as therapeutic targets in lung disease. *Expert Opin. Ther. Targets*, 15(8), 989-1002.
  - Lovgren, A.K., Kovacs, J.J., Xie, T., Potts, E.N., Li, Y., Foster, W.M., Liang, J., Meltzer, E.B., Jiang, D., Lefkowitz, R.J., Noble, P.W. (2011). Beta-arrestin deficiency protects against pulmonary fibrosis in mice and prevents fibroblast invasion of extracellular matrix. *Sci Transl Med*, 3(74), 23. doi: 10.1126/scitranslmed.3001564.
  - Lukey, P.T., Harrison, S.A., Yang, S., Man, Y., Holman, B.F., Rashidnasab, A., Azzopardi, G., Grayer, M., Simpson, J.K., Bareille, P., Paul, L., Woodcock, H.V.,

- Toshner, R., Saunders, P., Molyneaux, P.L., Thielemans, K., Wilson, F.J., Mercer, P.F., Chambers, R.C., Groves, A.M., Fahy, W.A., Marshall R.P., Maher, TM. (2019). *Eur Respir J*, 53, 1801992; DOI: 10.1183/13993003.01992-2018.
- Lung, H.L., Bangarusamy, D.K., Xie, D., Cheung, A.K.L., Cheng, Y., Kumaran, M.K., Miller, L., Liu, E.T., Guan, X., Sham, Yan, J.S., Fang, Y., Li, L., Wang, Protopopov, A.I., Zabarovsky, E.R., Tsao, S.W., Stanbridge, E.J., Lung M.L. (2005). THY1 is a candidate tumour suppressor gene with decreased expression in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*, 24(43): 6525–6532. doi: 10.1038/sj.onc.1208812.
  - Maden, C.H., Fairman, D., Chalker, M., Costa, M.J., Fahy, W.A., Garman, N., Lukey, P.T., Mant, T., Parry, S., Simpson, J.K., Slack, R.J., Kendrick, S., Marshall, R.P. (2018). Safety, tolerability and pharmacokinetics of GSK3008348, a novel integrin alphavbeta6 inhibitor, in healthy participants. *Eur J Clin Pharmacol*, 74(6), 701-709. doi: 10.1007/s00228-018-2435-3.
  - Maher, T.M. (2012). Idiopathic pulmonary fibrosis: pathobiology of novel approaches to treatment. *Clin Chest Med*, 33(1), 69-83. doi: 10.1016/j.ccm.2011.11.002.
  - Maher, T.M., van der Aar, E.M., Van de Steen, O., Allamassey, L., Desrivot, J., Dupont, S., Fagard, L., Ford, P., Fieuw, A., Wuyts, W. (2018). Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of GLPG1690, a novel autotaxin inhibitor, to treat idiopathic pulmonary fibrosis (FLORA): a phase 2a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med*, 6, 627-635. doi: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30181-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30181-4)
  - Maher, T.M., Kondon, Y., Corte, T.J., Glassberg, M.K., Costabel, U., Lancaster, L.H., Kardatzke, D., Kaminski, J., Howard, M., Olsson, J.K., Neighbors, M., Owen, R., Belloni, P. (2018). The RIFF Study (Cohort B): A Phase II, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Lebrikizumab in Combination with Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 197, A6168.
  - Malouf, M.A., Hopkins, P., Snell, G., Glanville, A.R., Everolimus in IPF study investigators. (2011). An investigator-driven study of everolimus in surgical lung biopsy confirmed idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology*, 16(5), 776-783. doi: 10.1111/j.1440-1843.2011.01955.x.
  - Margaritopoulos, G.A., Trachalaki, A., Wells, A.U., Vasarmidi, E., Bibaki, E., Papastratigakis, G., Detorakis, S., Tzanakis, N., Antoniou, K.M. (2018). Pirfenidone improves survival in IPF: results from a real-life study. *BMC Pulm Med*, 18(1), 177. doi: 10.1186/s12890-018-0736-z.
  - Marin, F., Corstjens, P., De Gaulejac, B., de Vrind-De Jong, E., Westbroek, P. (2000). Mucins and molluscan calcification. Molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, pteriomorphia). *J Biol Chem*, 275(27), 20667-20675. doi: 10.1186/s12890-018-0736-z.
  - Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., Kroemer, G. (2014). Self-consumption: The interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(2), 81-94. doi: 10.1038/nrm3735.
  - McKay, J.D, Hung, R.J., Han, Y., Zong, X., Carreras-Torres, R., Christiani, D.C., Caporaso, N.E., Johansson, M. Xiao, X. Li, Y., Byun, J., Dunning, A., Pooley, K.A., Qian, D.C., Ji, X., Liu, G., Timofeeva, M.N., Bojesen, S.E., Wu, X., Marchand, L.L., Albanes, D., Bickeböllner, D., Aldrich, M.C., Bush, W.S., Tardon, A., Rennert, G., Teare, M.D., Field, J.K., Kiemenev, L.A., Lazarus, P., Haugen, A., Lam, S., Schabath, M.B., Andrew, A.S., Shen, H., Hong, Y., Yuan, J., Bertazzi, P.A., Pesatori, A.C., Ye, Y., Diao, N., Su, L., Zhang, R., Brhane, Y., Leighl, N., Johansen, J.S., Mellemegaard, A, Saliba, W., Haiman, C.A., Wilkens, L.E., Fernandez-Somoano, A., Fernandez-Tardon, G., van der Heijden H.F.M., Kim, J.H., Dai, J., Hu, Z., Davies, M.P.A., Marcus, M.W., Brunnström, H., Manjer, J., Melander, O., Muller, D.C., Overvad, K., Trichopoulou, A., Tumino, A., Doherty, J.A., Barnett, M.P., Chen, C., Goodman, G.E., Cox, A., Taylor, A., Woll, P., Brüske, I., Wichmann, H., Manz, J., Muley, T.R., Risch, A., Rosenberger, A.,

- Grankvist, K., Johansson, M., Shepherd, F.A., Tsao, M., Arnold, S.M., Haura, E.B., Bolca, C., Holcatova, I., Janout, V., Kontic, M., Lissowska, J., Mukeria, A., Ognjanovic, S., Orłowski, T.M., Scelo, G., Swiatkowska, B., Zaridze, D., Bakke, P., Skaug, V., Zienolddiny, S., Duell, E.J., Butler, L.M., Koh, W., Gao, Y., Houlston, R.S., McLaughlin, J., Stevens, V.L., Joubert, P., Lamontagne, M., Nickle, D.C., Obeidat, M., Timens, W., Zhu, B., Song, L., Kachuri, L., Soler Artigas, M., Tobin, M.D., Wain, L.V., SpiroMeta Consortium, Rafnar, T., Thorgeirsson, T.E., Reginsson, G.W., Stefansson, K., Hancock, D.B., Bierut, L.J., Spitz, M.R., Gaddis, N.C., Lutz, S.M., Gu, F., Johnson, E.O., Kamal, A., Pikielny, C., Zhu, D., Lindström, S., Jiang, X., Tyndale, R.F., Chenevix-Trench, G., Beesley, J., Bossé, Y., Chanock, S., Brennan, P., Landi, M.T., Amos, C.I. (2017). Large-scale association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci and heterogeneity in genetic susceptibility across histological subtypes. *Nat Genet*, 49(7), 1126-1132. doi: 10.1038/ng.3892.
- Meltzer, E.B, Noble, P.W. (2008). Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Orphanet J Rare Dis*, 3:8. doi: 10.1186/1750-1172-3-8.
  - Moore, B.B., Ballinger, M.N., White, E.S., Green, M.E., Herrygers, A.B, Wilke, C.A., Toews, G.B., Peters-Goldenet, M. (2005). Bleomycin-induced E prostanoïd receptor changes alter fibroblast responses to prostaglandin E2. *J Immunol*, 174(9), 5644-5649. doi: 10.4049/jimmunol.174.9.5644.
  - Mora, A.L., Rojas, M., Pardo, A., Selman, M. (2017). Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease. *Nat Rev Drug Discov*, 16(11), 810. doi: 10.1038/nrd.2017.225.
  - Morris DG, Huang X, Kaminski N, Yanli Wang, Steven D Shapiro, Gregory Dolganov, Adam Glick, Dean Sheppard (2003). Loss of integrin alpha(v)beta6-mediated TGF-beta activation causes Mmp12-dependent emphysema. *Nature*, 422(6928), 169-173. doi: 10.1038/nature01413.
  - Moshai, E.F., Wemeau-Stervinou, L., Cigna, N., Brayer, S., Sommé, J.M., Crestani, B., Mailleux, A.A. (2014). Targeting the hedgehog-glioma-associated oncogene homolog pathway inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 51(1), 11-25. doi: 10.1165/rcmb.2013-0154OC.
  - Mozaffarian, A., Brewer, A.W., Trueblood, E.S., Luzina, I.G., Todd, N.W., Atamas, S.P., Arnett, H.A: (2008) Mechanisms of oncostatin M-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *J Immunol*, 181(10), 7243-7253. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.7243.
  - Nagashio, R., Ueda, J., Ryuge, S., Nakashima, H., Jiang, S., Kobayashi, M., Yanagita, K., Katono, K., Satoh, Y., Masuda, M., Murakumo, Y., Hachimura, K., Sato, Y. (2015). Diagnostic and prognostic significances of MUC5B and TTF-1 expressions in resected non-small cell lung cancer. *Sci Rep*, 5, 8649. doi: 10.1038/srep08649.
  - Nathan, N., Giraud, V., Picard, C., Nunes, H., Dastot-Le Moal, F., Copin, B., Galeron, L., De Ligniville, A., Kuziner, N., Reynaud-Gaubert, M., Valeyre, D., Couderc, L.J., Chinet, T., Borie, R., Crestani, B., Simansour, M., Nau, V., Tissier, S., Duquesnoy, P., Mansour-Hendili, L., Legendre, M., Kannengiesser, C., Coulomb-L'Hermine, A., Gouya, L., Amselem, S., Clement, A. (2016). Germline SFTPA1 mutation in familial idiopathic interstitial pneumonia and lung cancer. *Hum Mol Genet*, 25(8), 1457-1467. doi: 10.1093/hmg/ddw014.
  - Nathan, S.D., Noble, P.W., Tuder, R.M. (2007). Idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension: connecting the dots. *Am J Respir Crit Care Med*, 175(9), 875-880. doi: 10.1164/rccm.200608-1153CC.
  - Niv, Y. (2008). MUC1 and colorectal cancer pathophysiology considerations. *World J Gastroenterol*, 14(14), 2139-2141. doi: 10.3748/wjg.14.2139.
  - Noble, P.W., Albera, C., Bradford, W.Z., Costabel, U., Glassberg, M.K., Kardatzke, D., King, T.E. Jr, Lancaster, L., Sahn, S.A., Szwarzberg, J., Valeyre, D., du Bois, R.M., CAPACITY Study Group. (2011). Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet*, 377(9779), 1760-1769. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60405-4

- Noskovicova, N., Petrek, M., Eickelberg, O., Heinzemann, K. (2015). Platelet-derived growth factor signaling in the lung. From lung development and disease to clinical studies. *Am. J. Respir Cell Mol Biol*, 52(3), 263-284. doi: 10.1165/rcmb.2014-0294TR.
- Noth, I., Anstrom, K.J., Calvert, S.B., de Andrade, J., Flaherty, K.R., Glazer, C., Kaner, R.J., Olman, M.A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network (IPFnet) (2012). Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research N. A placebo-controlled randomized trial of warfarin in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 186(1), 88-95. doi: 10.1164/rccm.201202-0314OC.
- Noth, I., Zhang, Y., Ma, S.F., Flores, C., Barber, M., Huang, Y., Broderick, S.M., Wade, M.S., Hysi, P., Scuirba, J., Richards, T.J., Juan-Guardela, B.M., Vij, R., Han, M.K., Martinez, F.J., Kossen, K., Seiwert, S.D., Christie, J.D., Nicolae, D., Kaminski, N., Garcia, J.G.N. (2013). Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med*, 1(4), 309-317. doi: 10.1016/S2213-2600(13)70045-6.
- Noy, R., Pollard, J.W. (2014). Tumor-associated macrophages: From mechanisms to therapy. *Immunity*, 41(1), 49-61. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.010.
- O'Riordan, T.G., Smith, V., Raghu, G. (2015). Development of novel agents for idiopathic pulmonary fibrosis: Progress in target selection and clinical trial design. *Chest*, 148(4), 1083-1092. doi: 10.1378/chest.14-3218.
- Oku, H., Shimizu, T., Kawabata, T., Nagira, M., Hikita, I., Ueyama, A., Matsushima, S., Torii, M., Arimura, A. (2008). Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol*, 590(1-3), 400-408. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.06.046.
- Oldham, J.M., Ma, S.F., Martinez, F.J., Raghu, G., Schwartz, D.A., Valenzi, E., Witt, L., Lee, C., Vij, R., Huang, Y., Streck, M.E., Noth, I; IPFnet Investigators. (2015). TOLLIP, MUC5B, and the Response to N-Acetylcysteine among Individuals with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 192, 1475-1482. doi: 10.1164/rccm.201505-1010OC.
- Olson, A.L., Swigris, J.J. (2012). Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Epidemiology. *Clin Chest Med*, 33(1), 41-50. doi: 10.1016/j.ccm.2011.12.001.
- Palmer, S.M., Snyder, L., Todd, J.L., Soule, B., Christian, R., Anstrom, K., Luo, Y., Gagnon, R., Rosen, G. (2018). Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Trial of BMS-986020, a Lysophosphatidic Acid Receptor Antagonist for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest*, 154(5), 1061-1069. doi: 10.1016/j.chest.2018.08.1058.
- Park, S.H., Saleh, D., Giaid, A., Michel, R.P. (1997). Increased endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist. *Am J Respir Crit Care Med*, 156(2 Pt 1), 600-608. doi: 10.1164/ajrccm.156.2.9607123.
- Pastuszek-Lewandoska, D., Domanska-Senderowska, D., Antczak, A., Kordiak, J., Górski, P., Czarnicka, K.H., Migdalska-Sęk, M., Nawrot, E., Kiszalkiewicz, J.M., Brzezińska-Lasota, E. (2018). The Expression Levels of IL-4/IL-13/STAT6 Signaling Pathway Genes and SOCS3 Could Help to Differentiate the Histopathological Subtypes of Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Mol Diagn Ther*, 22(5), 621-629. doi: 10.1007/s40291-018-0355-7.
- Patel, A.S., Lin, L., Geyer, A., Haspel, J.A., An, C.H., Cao, J., Rosas, I.O., Morse, D. (2012). Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS ONE*, 7(7), e41394. doi: 10.1371/journal.pone.0041394.
- Paulin, R., Meloche, J., Bonnet, S. (2012). STAT3 signaling in pulmonary arterial hypertension. *JAKSTAT*, 1(4), 223-233. doi: 10.4161/jkst.22366.
- Peacock, A.J., Dawes, K.E., Shock, A., Gray, A.J., Reeves, J.T., Laurent, G.J. (1992) Endothelin-1 and endothelin-3 induce chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 7(5), 492-499. doi: 10.1165/ajrcmb/7.5.492.

- Pelosi, G., Pastorino, U., Pasini, F., Maissoneuve, P., Frassetto, F., Iannucci, A., Sonzogni, A., De Manzoni, G., Terzi, A., Durante, E., Bresaola, E., Pezzella, F., Viale, G. (2003). Independent prognostic value of fascin immunoreactivity in stage I nonsmall cell lung cancer. *Br J Cancer*, 88(4), 537–547. doi: 10.1038/sj.bjc.6600731.
- Perez-Vilar, J. (2008). Mucin granule intraluminal organization. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 36(2), 183-190. doi: 10.1165/rcmb.2006-0291TR.
- Peters-Golden, M., Bailie, M., Marshall, T., Wilke, C., Phan, S.H., Toews, G.B., Moore, B.B. (2002). Protection from pulmonary fibrosis in leukotriene-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 165(2), 229-235. doi: 10.1164/ajrccm.165.2.2104050.
- Piera-Velazquez, S., Li, Z., Jiménez, S.A. (2011). Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol*, 179(3), 1074-1080. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.06.001.
- Prasse, A., Ramaswamy, M., Mohan, S., Pan, L, Kenwright, A., Neighbors, M., Belloni, P., LaCamera, P.P. (2019). A Phase 1b Study of Vismodegib With Pirfenidone in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Pulm Ther*, 5(2), 151-163.
- Rabinovich, E.I., Kapetanaki, M.G., Steinfeld, I., Gibson, K.F., Pandit, K.V., Yu, G., Yakhini, Z., Kaminski, N. (2012). Global methylation patterns in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS ONE*, 7, e33770. doi: 10.1371/journal.pone.0033770.
- Raghu, G., Striker, L.J., Hudson, L.D., Striker, G.E. (1985). Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis*, 131(2), 281-289. doi: 10.1164/arrd.1985.131.2.281.
- Raghu, G., Brown, K.K., Costabel, U., Cottin, V., du Bois, R.M., Lasky, J.A., Thomeer, M., Utz, J.P., Khandker, R.K., McDermott, L., Fatenejad, S. (2008). Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with etanercept: an exploratory, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 178(9), 948-955. doi: 10.1164/rccm.200709-1446OC
- Raghu, G., Collard, H.R., Egan, J.J., Martinez, F.J., Behr, J., Brown, K.K., Colby, T.V., Cordier, J.F., Flaherty, K.R., Lasky, J.A., Lynch, D.A., Ryu, J.H., Swigris, J.J., Wells, A.U., Ancochea, J., Bouros, D., Carvalho, C., Costabel, U., Ebina, M., Hansell, D.M., Johkoh, T., Kim, D.S., King, T.E. Jr, Kondoh, Y., Myers, J., Müller, N.L., Nicholson, A.G., Richeldi, L., Selman, M., Dudden, R.F., Griss, B.S., Protzko, S.L., Schünemann, H.J. ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis. (2011). An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*, 183, 788-824. doi: 10.1164/rccm.2009-040GL.
- Raghu, G., Anstrom, K.J., King, T.E. Jr, Lasky, J.A., Martinez, F.J. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network (2012). Prednisone, Azathioprine, and N-acetylcysteine for Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med*, 366(21), 1968-1977. doi: 10.1056/NEJMoa1113354.
- Raghu, G., Million-Rousseau, R., Morganti, A., Perchenet, L., Behr, J., Group MS. (2013a). Macitentan for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: the randomised controlled MUSIC trial. *Eur Respir J*, 42(6), 1622-1632. doi: 10.1183/09031936.00104612.
- Raghu, G., Behr, J., Brown, K.K., Kawut, S.M., Flaherty, K.R., Martinez, F.J., Nathan, S.D., Wells, A.U., Collard, H.R., Costabel, U., Richeldi, L., de Andrade, J., Khalil, N., Morrison, L.D., Lederer, D.J., Shao, L., Li, X., Pedersen, P.S., Montgomery, A.B., Chien, J.W., O'Riordan, T.G.; ARTEMIS-IPF Investigators, (2013b). Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with ambrisentan: a parallel, randomized trial. *Ann Intern Med*, 158, 641-649. doi: 10.7326/0003-4819-158-9-201305070-00003.
- Raghu, G., Martinez, F.J., Brown, K.K., Costabel, U, Cottin, V., Wells, A.U., Lancaster, L., Gibson, K.F., Haddad, T., Agarwal, P., Mack, M., Dasgupta, B., Nnane, I.P., Flavin, S.K., Barnathan, ES. (2015). CC-chemokine ligand 2 inhibition in idiopathic pulmonary fibrosis: a phase 2 trial of carlumab. *Eur Respir J*, 46(6), 1740-1750. doi: 10.1183/13993003.01558-2014.

- Raghu, G., Scholand, M.B., de Andrade, J., Lancaster, L., Mageto, Y., Goldin, J., Brown, K.K., Flaherty, K.R., Wencel, M., Wanger, J., Neff, T., Valone, F., Stauffer, J., Porter, S. (2016). FG-3019 Anti-Connective Tissue Growth Factor Monoclonal Antibody: Results of an Open-Label Clinical Trial in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Eur Respir J*, 47(5), 1481-1491. doi: 10.1183/13993003.01030-2015.
- Raghu, G., van den Blink, B., Hamblin, M.J., Brown, A.W., Golden, J.A., Ho, L.A., Wijzenbeek, M.S., Vasakova, M., Pesci, A., Antin-Ozerkis, D.E., Meyer, K.C., Kreuter, M., Santin-Janin, H., Mulder, G.J., Bartholmai, B., Gupta, R., Richeldi, L. (2018). Effect of Recombinant Human Pentraxin 2 vs Placebo on Change in Forced Vital Capacity in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 319(22), 2299-2307. doi: 10.1001/jama.2018.6129.
- Ramasamy, S., Duraisamy, S., Barbashov, S., Kawano, T., Kharbanda, S., Kufe, D. (2007). The MUC1 and galectin-3 oncoproteins function in a microRNA-dependent regulatory loop. *Mol Cell*, 27(6), 992-1004. doi: 10.1016/j.molcel.2007.07.031.
- Rice, L.M., Padilla, C.M., Mc Laughlin, S.R., Mathes, A., Ziemek, J., Goummih, S., Nakerakanti, S., York, M., Farina, G., Whitfield, M.L., Spiera, R.F., Christmann, R.B., Gordon, J.K., Weinberg, J., Simms, R.W., Lafyatis, R. (2015). Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. *J Clin Invest*, 125(7), 2795-2807. doi: 10.1172/JCI177958.
- Rich, R., Fleisher, T., Shearer, W., Schroeder, H., Frew, A., Weyand, C., (2013). *Clinical immunology*. 4<sup>o</sup> ed. Elsevier. doi: 10.1080/01422419908228843
- Richeldi, L., Costabel, U., Selman, M., Kim, D.S., Hansell, D.M., Nicholson, A.G., Brown, K.K., Flaherty, K.R., Noble, P.W., Raghu, G., Brun, M., Gupta, A., Juhel, N., Klüglich, M., du Bois, R.M. (2011). Efficacy of a tyrosine kinase inhibitor in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 365(12), 1079-1087. doi: 10.1056/NEJMoa1103690.
- Riese, D.J., Stern, D.F. (1998). Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *BioEssays*, 20(1), 41-48. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199801)20:1<41::AID-BIES7>3.0.CO;2-V.
- Rinkevich, Y., Mori, T., Sahoo, D., Xu, P.X., Bermingham, J.R., Weissman, I.L. (2012). Identification and prospective isolation of a mesothelial precursor lineage giving rise to smooth muscle cells and fibroblasts for mammalian internal organs, and their vasculature. *Nat Cell Biol*, 14(12), 1251–1260. doi: 10.1038/ncb2610.
- Rogers, D.F. (2007). Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. *Respir Care*, 52 (9), 1134-1146.
- Rose, M.C., Voynow, J.A. (2006). Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev*, 86(1), 245-278. doi: 10.1152/physrev.00010.2005.
- Sanders, Y.Y., Pardo, A., Selman, M., Nuovo, G.J., Tollefsbol, T.O., Siegal, G.P., Hagood, J.S. (2008). Thy-1 promoter hypermethylation: A novel epigenetic pathogenic mechanism in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 39(5), 610-618. doi: 10.1165/rcmb.2007-0322OC.
- Schafer, M.J., White, T.A., Iijima, K., Haak, A.J., Ligresti, G., Atkinson, E.J., Oberg, A.L., Birch, J., Salmonowicz, H., Zhu, Y., Mazula, D.L., Brooks, R.W., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Pirtskhalava, T., Prakash, Y.S., Tchkonja, T., Robbins, P.D., Aubry, M.C., Passos, J.F., Kirkland, J.L., Tschumperlin, D.J., Kita, H., LeBrasseur, N.K. (2007). Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun*, 8, 14532. doi: 10.1038/ncomms14532.
- Scotton, C.J., Chambers, R.C. (2007). Molecular targets in pulmonary fibrosis: The myofibroblast in focus. *Chest*, 132(4), 1311-1321. doi: 10.1378/chest.06-2568.
- Seibold, M.A., Wise, A.L., Speer, M.C., Steele, M.P., Brown, K.K., Loyd, J.E., Fingerlin, T.E., Zhang, W., Gudmundsson, G., Groshong, S.D., Evans, C.M., Garantziotis, S., Adler, K.B., Dickey, B.F., du Bois, R.M., Yang, I.V., Herron, A., Kervitsky, D., Talbert, J.L., Markin, C., Park, J., Crews, A.L., Slifer, S.H., Auerbach, S., Roy, M.G., Lin, J., Hennessy, C.E., Schwarz, M.I., Schwartz, D.A. (2011). A common MUC5B promoter

- polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 364(16), 1503-1512. doi: 10.1056/NEJMoa1013660.
- Selman, M., Pardo, A. (2006). Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc*, 3(4): 364-372. doi: 10.1513/pats.200601-003TK.
  - Selman, M., Pardo, A. (2014). Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. An integral model. *Am J Respir Crit Care Med*, 189(10), 1161-1172. doi: 10.1164/rccm.201312-2221PP.
  - Shiga, K., Hara, M., Nagasaki, T., Sato, T., Takahashi, H., Takeyama, H. (2015). Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancer*, 7(4), 2443–2458. doi: 10.3390/cancers7040902.
  - Simon, G.C., Martin, R.J., Smith, S., Thaikoottathil, J., Bowler, R.P., Barenkamp, S.J., Chu, H.W. (2011). Upregulation of MUC18 in airway epithelial cells by IL-13: implications in bacterial adherence. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 44 (606), 13. doi: 10.1165/rcmb.2010-0384OC.
  - Singh, A.P., Chaturvedi, P., Batra, S. (2007). Emerging Roles of MUC4 in Cancer: A Novel Target for Diagnosis and Therapy. *Cancer Res*, 67(2), 433-436. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3114.
  - Singh, S.R., Hall, I.P. (2008). Airway myofibroblasts and their relationship with airway myocytes and fibroblasts. *Proc Am Thorac Soc*, 5(1), 127-132. doi: 10.1513/pats.200706-070VS.
  - Sosulski, M.L., Gongora, R., Danchuk, S., Dong, C., Luo, F., Sanchez, C.G. (2015) Deregulation of selective autophagy during aging and pulmonary fibrosis: The role of TGFbeta1. *Aging Cell*, 14, 774-783.
  - Strieter, R.M. (2005). Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: the whole story or the last chapter of a long novel. *Chest*, 128(5 Suppl 1): 526S-532S. doi: 10.1378/chest.128.5\_suppl\_1.526S.
  - Strieter, R.M., Gomperts, B.N., Keane, M.P. (2007) The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*, 117(3), 549-556. doi: 10.1172/JCI30562.
  - Stroopinsky, D., Rajabi, H., Nahas, M., Rosenblatt, J., Rahimian, M., Pyzer, A., Tagde, A., Kharbada, A., Jain, S., Kufe, T., Leaf, R.K., Anastasiadou, E., Bar-Natan, M., Orr, S., Coll, M.D., Palmer, K., Ephraim, A., Cole, L., Washington, A., Kufe, D., Avigan, D. (2018). MUC1-C drives myeloid leukaemogenesis and resistance to treatment by a survival-mediated mechanism. *J Cell Mol Med*, 4(8), 234-241. doi: 10.1111/jcmm.13662.
  - Strutz, F., Zeisberg, M., Renziehausen, A., Raschke, B., Becker, V., van Kooten, C., Müller, G. (2001). TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int*, 59(2): 579-592.
  - Stuart, B.D., Choi, J., Zaidi, S., Xing, C., Holohan, B., Chen, R., Choi, M., Dharwadkar, P., Torres, F., Girod, C.E, Weissler, J., Fitzgerald, J., Kershaw, C., Klesney-Tait, J., Mageto, Y., Shay, J.W., Ji, W., Bilguvar, K., Mane, S., Lifton, R.P., Garcia, C.K. (2015). Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nat Genet*, 47(5), 512-517. doi: 10.1038/ng.3278.
  - Sze, M. A. Dimitriu, P.A., Hayashi, S., Elliott, W.M., McDonough, J.E., Gosselink, J.V., Cooper, J., Sin, D.D., Mohn, W.W., Hogg, J.C. (2012). The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 185(10), 1073-1080.
  - Tager, A.M., LaCamera, P., Shea, B.S, Campanella, G.S., Selman, M., Zhao, Z., Polosukhin, V., Wain, J., Karimi-Shah, B.A., Kim, N.D., Hart, W.K., Pardo, A., Blackwell, T.S., Xu, Y., Chun, J., Luster, A.D. (2008). The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med*, 14(1), 45-54. doi: 10.1038/nm1685.
  - Takahashi, T, Munakata, M., Ohtsuka, Y., Nisihara, H., Nasuhara, Y., Kamachi-Satoh, A., Dosaka-Akita, H., Homma, Y., Kawakami, Y. (2002). Expression and alteration of

- ras and p53 proteins in patients with lung carcinoma accompanied by idiopathic pulmonary fibrosis. *Cancer*, 95(4), 624-633. doi: 10.1002/cncr.10708.
- Takishima, T., Shimura, S. (1993). Airway secretion: physiological bases for the control of mucus hypersecretion. *Lung Biology and Health*, 72(433), 49.
  - Taniguchi, H., Ebina, M., Kondoh, Y., Ogura, T., Azuma, A., Suga, M., Taguchi, Y., Takahashi, H., Nakata, K., Sato, A., Takeuchi, M., Raghu, G., Kudoh, S., Nukiwa, T.; Pirfenidone Clinical Study Group in Japan. (2010). Pirfenidone Clinical Study Group in J. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 35(4), 821-829. doi: 10.1183/09031936.00005209.
  - Tarran, R., Grubb, B.R., Gatzky, J.T., Davis, C.W., Boucher, R.C. (2001). The Relative Roles of Passive Surface Forces and Active Ion Transport in the Modulation of Airway Surface Liquid Volume and Composition. *J Gen Physiol*, 118(2), 223-236. doi: 10.1085/jgp.118.2.223.
  - Thornton, D.J., Rousseau, K., McGuckin, M.A. (2008). Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu Rev Physiol*, 70, 459-486. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100702.
  - Todd, NW., Luzina, S.P., Atamas, S.P. (2012). Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5(1), 11. doi: 10.1186/1755-1536-5-11.
  - Trovato-Salinaro, A., Trovato-Salinaro, E., Failla, M., Mastruzzo, C., Tomaselli, V., Gili, E., Crimi, N., Condorelli, D.F., Vancheri, C. (2006). Altered intercellular communication in lung fibroblast cultures from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*, 7, 122.
  - Tsakiri, K.D., Cronkhite, J.T., Kuan, P.J., Xing, C., Raghu, G., Weissler, J.C., Rosenblatt, R.L., Shay, J.W., Garcia, C.K. (2007). Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(18), 7552-7557. doi: 10.1073/pnas.0701009104.
  - Van der Strate, B.W.A., Beljaars, L., Molema, G., Harmsen, M.C., Meijer, D.K F. (2001). Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res*, 52(3), 225-239. doi: 10.1016/s0166-3542(01)00195-4.
  - Van Maele, L., Fougeron, D., Janot, L., Didierlaurent, A., Cayet, D., Tabareau, J., Rumbo, M., Corvo-Chamaillard, S., Boulenouar, S., Jeffs, S., Vande Walle, L., Lamkanfi, M., Lemoine, Y., Erard, F., Hot, D., Hussell, T., Ryffel, B., Benecke, A.G., Sirard, J.C. (2014). Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity. *Mucosal Immunol*, 7(3), 489-500. doi: 10.1038/mi.2013.66.
  - Van Moorsel, C.H., Ten Klooster, L., van Oosterhout, M.F., de Jong, P.A., Adams, H., Wouter van Es, H., Ruven, H.J., van der Vis, J.J., Grutters, J.C. (2015). SFTPA2 Mutations in Familial and Sporadic Idiopathic Interstitial Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 192, 1249-1252. doi: 10.1164/rccm.201504-0675LE.
  - Vancheri, C., Kreuter, M., Richeldi, L., Ryerson, C.J., Valeyre, D., Grutters, J.C., Wiebe, S., Stansen, W., Quaresma, M., Stowasser, S., Wuyts, W.A, Investigators Injourney Trial. (2018). Nintedanib with Add-on Pirfenidone in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Results of the INJOURNEY Trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 197(3), 356-363. doi: 10.1164/rccm.201706-1301OC.
  - Vancheri, C., Failla, M., Crimi, N., Raghu, G.(2010) Idiopathic pulmonary fibrosis: A disease with similarities and links to cancer biology. *Eur Respir J*, 35(3), 496-504. doi: 10.1183/09031936.00077309.
  - Vareille, M., Kieninger, E., Edwards, M.R., Regamey, N. (2011). The airway epithelium: Soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin Microbiol Rev*, 24(1), 210-229. doi: 10.1128/CMR.00014-10.
  - Visscher, D.W., Myers, J.L. (2006). Histologic spectrum of idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc*, 3(4), 322-329. doi: 10.1513/pats.200602-019TK.
  - Wallace, W.A., Fitch, P.M., Simpson, A.J., Howie, S.E. (2007). Inflammation-associated remodelling and fibrosis in the lung - a process and an end point. *Int J Exp Pathol*, 88(2), 103-110. doi: 10.1111/j.1365-2613.2006.00515.x.

- Wang, Y., Kuan, P.J., Xing, C., Cronkhite, J.T., Torres, F., Rosenblatt, R.L., DiMaio, J.M., Kinch, L.N., Grishin, N.V., Garcia, C.K. (2009). Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet*, 84(1), 52-59. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.11.010.
- White, E. (2015). The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest*, 125(1), 42-46. doi: 10.1172/JCI73941.
- Whitsett, J.A., Alenghat, T. (2015). Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat. Immunol*, 16(1), 27-35. doi: 10.1038/ni.3045.
- Wilkes, D.S., Chew, T., Flaherty, K.R., Frye, S., Gibson, K.F., Kaminski, N., Klemsz, M.J., Lange, W., Noth, I., Rothhaar, K. (2015). Oral immunotherapy with type V collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 45(5), 1393-1402. doi: 10.1183/09031936.00105314.
- Willis, B.C., Liebler, J.M., Luby-Phelps, K., Nicholson, A.G., Crandall, E.D., du Bois, R.M., Borok, Z. (2005). Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by TGF-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*, 166(5), 1321-1332. doi: 10.1016/s0002-9440(10)62351-6.
- Wilson, M.S., Wynn, T.A. (2009). Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol*, 2(2), 103-121. doi: 10.1038/mi.2008.85.
- Woo, H.J., Bae, C.H., Song, S.Y., Lee, H.M., Kim, Y.D. (2010). Expression of membrane-bound mucins in human nasal mucosa: different patterns for MUC4 and MUC16. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 136(6), 603-609. doi: 10.1001/archoto.2010.71.
- Xiao, H., Zhang, G.F., Liao, X.P., Li, X.J., Zhang, J., Lin, H., Chen, Z., Zhang, X. (2018). Anti-fibrotic effects of pirfenidone by interference with the hedgehog signalling pathway in patients with systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Int J Rheum Dis*, 21, 477-486. doi: 10.1111/1756-185X.13247.
- Xie, M., Wu, X.J., Zhang, J.J., He, C.S. (2015). IL-13 receptor alpha2 is a negative prognostic factor in human lung cancer and stimulates lung cancer growth in mice. *Oncotarget*, 6(32), 32902-32913. doi: 10.18632/oncotarget.5361.
- Yang, M., Shen, H., Qiu, C., Ni, Y., Wang, L., Dong, W., Liao, Y., Du, J. (2012). High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavourable survival in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*, 49(3), 604-615. doi: 10.1016/j.ejca.2012.09.031.
- Ye, Y.Z., Zhang, Z.H., Fan, X.Y., Xu, X.L., Chen, M.L., Chang, B.W., Zhang, Y.B. (2013). Notch3 overexpression associates with poor prognosis in human non-small-cell lung cancer. *Med Oncol*, 30(2), 595. doi: 10.1007/s12032-013-0595-7.
- Zeisberg, E.M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., Kalluri, R. (2007). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res*, 67, 10123-10128.
- Zhang, C., Lan, T., Hou, J., Li, J., Fang, R., Yang, Z., Zhang, M., Liu, J., Liu, B. (2014). NOX4 promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and metastasis through positive feedback regulation of PI3K/Akt signaling. *Oncotarget*, 5, 4392-4405.
- Zhang, L., Wang, Y., Wu, G., Xiong, W., Gu, W., Wang, C.Y. (2018). Macrophages: Friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis? *Respir. Res*, 19(1), 170. doi: 10.1186/s12931-018-0864-2.
- Zhu, B., Ferry, C.H., Markell, L.K., Blazanin, N., Glick, A.B., Gonzalez, F.J., Peters, J.M. (2014). The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) promotes oncogene-induced cellular senescence through repression of endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 289, 20102-20119.
- Zhu, Z., Homer, R.J., Wang, Z., Chen, Q., Geba, G.P., Wang, J., Zhang, Y., Elias, J.A. (1999). Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest*, 103(6), 779-788. doi: 10.1172/JCI5909.

- Zisman, D.A., Schwarz, M., Anstrom, K.J., Collard, H.R., Flaherty, K.R., Hunninghake, G.W. (2010). A Controlled Trial of Sildenafil in Advanced Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med*, 363 (7), 620-629. doi: 10.1056/NEJMoa1002110.
- Zou, B., Zhou, X.L., Lai, S.Q., Liu, J.C. (2018). Notch signaling and non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*, 15(3), 3415- 3421. doi: 10.3892/ol.2018.7738.

## ANEXO 1

### Aprobación del comité ético del estudio



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

#### APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- ANEXO 11 -

Este CEIm tras evaluar en su reunión de 26 de Octubre de 2017 el Proyecto de Investigación:

Título:	Estudio de las mucinas ancladas a membrana como diana farmacológica en la fibrosis pulmonar idiopática y en la hipertensión pulmonar asociada: análisis preclínico y traslacional.		
I.P.:	Javier Milara Páya	Servicio/Unidad	Farmacia

Acuerda respecto a esta documentación:

Que se cumplen los requisitos éticos y metodológicos y la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado presentado reúnen las condiciones exigidas por este CEIC, por tanto se decide su APROBACIÓN.

#### COMPOSICIÓN DEL CEIm

**Presidente:** Dra. Elena Rubio Gomis (Unidad de Farmacología Clínica)

#### Vocales:

- Dr. Francisco Antón García (Att primaria)
- Dra. Pilar Blasco Segura (Servicio de Farmacia)
- Dr. Ernesto Bataller Alonso (Director Económico del CHGUV)
- Dña. Pepa Balaguer Cusi (Miembro Independiente de la organización asistencial)
- Dr. Enrique Ortega Gonzalez (Gerente ChgUV)
- Dra. Dolores Ocete Mochón (Servicio de Microbiología)
- Dr. Miguel García del Toro (Unidad de Infecciosos)
- D. Fráncico Javier Gracta Pérez (Servicio de Reanimación)
- Dr. Julio Cortijo Gimeno (Unidad de Docencia e Investigación)
- Dña. María Teresa Jareño (Unidad de Reanimación Cardíaca)
- D. Alejandro Moner González (Gerencia CHGUV – Asesoría Jurídica)
- Dr. Alberto Berenguer Jofresa (Servicio de Cardiología)
- Dra. Ana Blasco Cordellat (Servicio de Oncología)
- Dr. Antonio Martorell Aragonés (Unidad de Alergología)

