

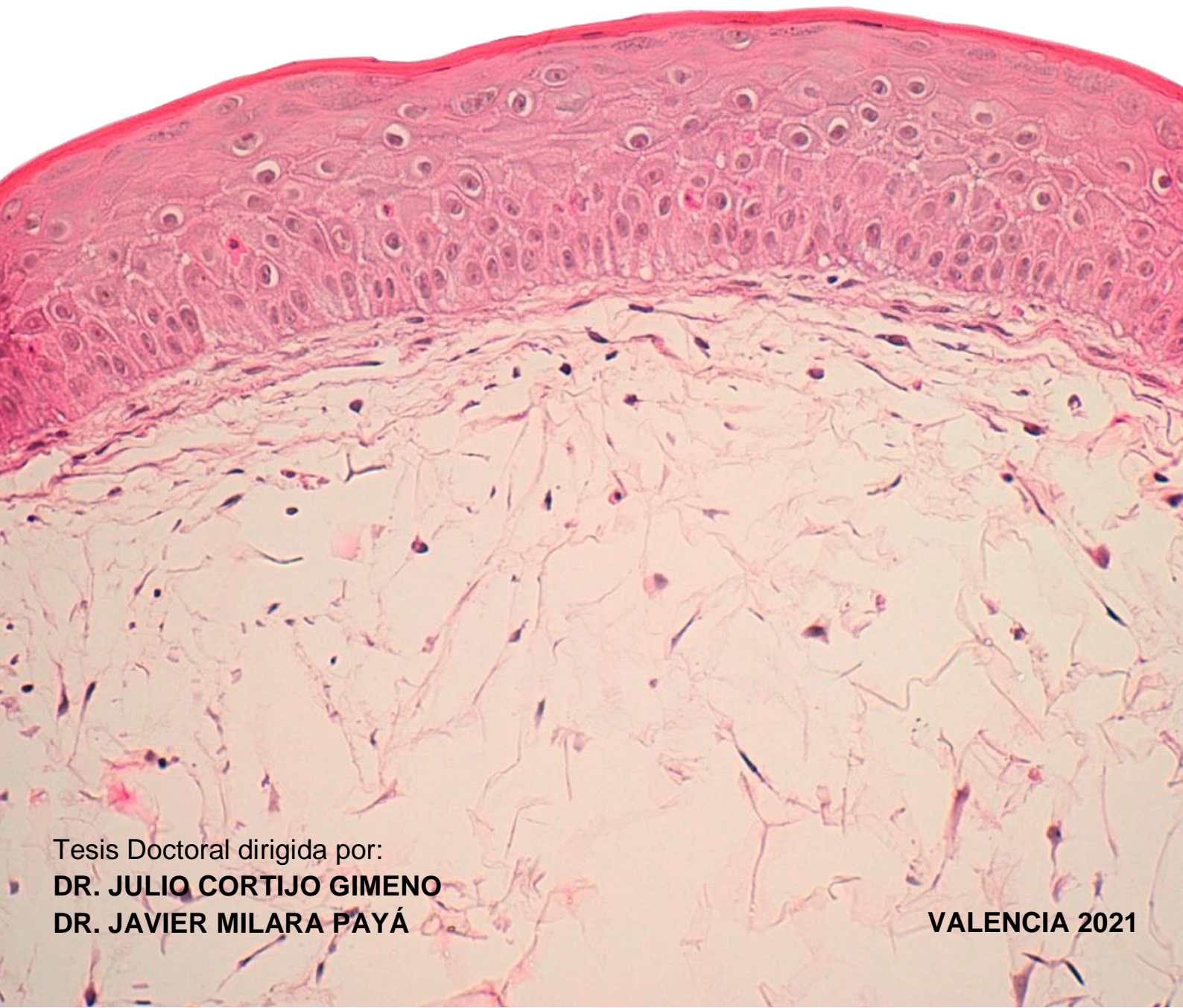
**DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA**

**PILAR RIBERA ALBA**



**VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA**

**ESTUDIO DEL PERFIL FARMACOLÓGICO DE  
INHIBIDORES DE PDE4 EN MODELOS DE  
FIBROSIS CUTÁNEA**



Tesis Doctoral dirigida por:

**DR. JULIO CORTIJO GIMENO**

**DR. JAVIER MILARA PAYÁ**

**VALENCIA 2021**



**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA**



**ESTUDIO DEL PERFIL FARMACOLÓGICO DE INHIBIDORES DE  
PDE4 EN MODELOS DE FIBROSIS CUTÁNEA**

**TESIS DOCTORAL**

**Presentada por:**

**PILAR RIBERA ALBA**

**Dirigida por:**

**DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO**

**DR. D. JAVIER MILARA PAYÁ**

**VALÈNCIA, 2021**



D. Julio Cortijo Gimeno, Catedrático y Javier Milara Payá, Profesor Asociado de la Universitat de València,

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo presentado por la Lda. **PILAR RIBERA ALBA**, titulado “Estudio del perfil farmacológico de inhibidores de PDE4 en modelos de fibrosis cutánea”, para obtener el grado de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de la Tesis, para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Lo que firmamos en Valencia diciembre 2021

JULIO  
FRANCISCO  
CORTIJO  
GIMENO

Firmado digitalmente por  
JULIO  
FRANCISCO  
CORTIJO|GIMENO  
Fecha: 2021.11.30  
18:48:49 +01'00'

MILARA  
PAYA JAVIER  
- 29191882Y

Firmado digitalmente por MILARA  
PAYA JAVIER - 29191882Y  
Nombre de reconocimiento (DN):  
c=ES,  
serialNumber=IDCES-29191882Y,  
givenName=JAVIER, sn=MILARA  
PAYA, cn=MILARA PAYA JAVIER -  
29191882Y  
Fecha: 2021.11.29 12:13:25 +01'00'

Julio Cortijo Gimeno

Javier Milara Payá



# **AGRADECIMIENTOS**





La presente tesis doctoral ha sido el fruto de un trabajo realizado a lo largo de cuatro años. Durante todo ese trayecto he estado acompañada de personas que me han apoyado, ayudado y que nunca han dudado en que este proyecto saldría adelante. Por ello, me gustaría dedicar un espacio a esos compañeros y amigos que siempre han estado a mi lado.

En primer lugar, agradecer al Dr. Julio Cortijo. Todavía recuerdo cuando estaba en tercero de carrera y Paula y yo queríamos hacer prácticas extracurriculares. La verdad es que fue difícil encontrar un laboratorio donde quisiesen a alumnos en prácticas, pero tras varios emails, llamadas e incluso visitas conocimos a Julio. Allí se nos abrió un mundo. Nos explicó el camino a seguir hasta la realización de la tesis doctoral, cosa que estaba en mi mente desde hacía bastantes años. Salí ilusionada pensando que podría llegar a conseguirlo y así ha sido, y la verdad es que desde aquel día nunca nos ha soltado de la mano. Por todo ello, gracias. Al Dr. Javier Milara, por ser un ejemplo de lo que es el trabajo duro sin que eso signifique dejar de lado la alegría. Pero sobre todo por guiarme y enseñarme el camino cuando yo prácticamente no entendía nada. Por ayudarme a interpretar los resultados con ilusión y motivarme. Y por supuesto, por creer en mí y enseñarme.

A los profesores del departamento de farmacología de la Universitat de València, porque la experiencia docente en la facultad ha sido increíble, y ellos me han formado para poder dar mis primeras clases. Me recomendaron libros, apuntes, escucharon la lección antes incluso que los alumnos y estuvieron supervisándome, pero lo más importante es que siempre lo hacían con una sonrisa. He aprendido mucho y además me he divertido compartiendo aula con ellos.

Como una buena amiga mía dijo un día: existen compañeros de trabajo, y luego están ellos... mi querido Labteam. Gracias a esta experiencia puedo decir que me llevo grandes amigos.

Paula, desde el 2012 a tu lado. Todo empezó el primer día de carrera cuando yo iba algo perdida y te vi y te hice aquella pregunta, perdona ¿Vas a biotecnología? La carrera ya nos hizo amigas, pero es que desde entonces nunca nos hemos separado. Hemos compartido bancada durante años y años, y siempre nos hemos entendido.

Eres de esas personas que, aunque estén ocupadas, siempre pueden parar un momento y escucharte para darte algún consejo, además con tu serenidad y calma, aunque también estés un poco loca. Vamos a por el C1 de ruso.

Sonia, mi mentora. En parte todo esto es posible gracias a ti. Tú me enseñaste sin dudarle y a mí me encantaba aprender de ti. Pasamos muchísimas horas en el laboratorio, pero también empezamos a hacerlo fuera de él, siendo confidentes la una de la otra. Ojalá estuvieses más cerquita.

Mi querida Beatriz. Valiente como la que más, con objetivos claros y luchadora hasta conseguirlos. Con la verdad por delante. Abriste muchas puertas a las que vinimos detrás. Fan de tu risa y de tus bailes. Porque esta señorra entiende de perdona. Y aunque a ti te guste más una carrera por la montaña y a mí una cervecita bien fría sé que jamás nos separemos. Porque ya nos encargaremos nosotras de buscar ese término medio, como por ejemplo... ¿Montepi?

Y hablando de Montepi, allí esta ella, su nombre es alegría, bondad, locura, inocencia o a veces también Inés. Cuántas cosas hemos vivido. Porque me gusta tu orden dentro de tu desorden, porque me encanta hablar contigo de cosas científicas, de psicología, de nuestros problemas o simplemente de la vida. Irradias positividad, y ese es uno de los grandes motivos por los que me gusta tenerte a mi lado. Gracias sobre todo por este último año.

Cristina, compañera de viajes y amiga. Has sabido escucharme, serenarme y saber cuándo necesitaba un abrazo siempre. Y es que eso es algo que te define, la lealtad a tus amigos y el compañerismo. Porque siempre serás la primera en ofrecerte, pero en ofrecerte y hacerlo. Gracias por estar siempre ahí sin dudarle, pero también por las fiestas, risas y aventuras.

Amparo, si hubieses aceptado darme un euro por cada vez que te disculpas ya sería rica. Y es que eres más buena que el pan. Mira que pasamos horas en el laboratorio, pero la verdad es que he tenido muchísima suerte de hacerlo contigo. Porque siempre vas a saludar o a despedirte allí donde estemos, y porque si alguien se queda solo y necesita ayuda, vas a ser la primera que se queda a ayudar para así poder

iros antes los dos. Quiero verte haciendo un hidalgo el día que esto de verdad se acabe.

Y para hidalgos también está Anthony. Estudiante del FIR que llegaste al laboratorio sin tener mucha idea de lo que allí se hacía. A pesar de que no puedes estar tantas horas como los que solo nos dedicamos a esto has sabido integrarte y hacer que te queramos, incluso aunque no te apuntes las cosas en la libreta para saber cómo hacerlas otro día. Mi compañero de baile, ve buscando academia que el verano que viene la petamos.

Martín, esa persona loca y que vuelve loca al resto, la que no quiere más dramas y a la que le gusta una maleta con ruedas. Descarado y dicharachero. Llegamos como pollitos al laboratorio y nos reíamos cuando algo no salía tal y como debiera (por decirlo de alguna manera). Siento que tuvieses que acampar hace poco por mi culpa. Eres de esas personas que quiero conservar siempre porque es imposible estar mal contigo. Y es que, aunque esté triste, tú sabes hacerme llorar de alegría.

Xavi, mira que vals! No sabes cómo me alegro de haber trabajado contigo. Porque desde el principio siempre nos hemos entendido, porque a ti y a mí sí que nos gusta la buena música, las cañas y las risas. Eres un crack y espero poder seguir disfrutando momentos contigo.

A mi familia y amigos, porque ellos sí que han vivido esta aventura desde el principio, cuando estudiaba y estudiaba para sacar nota y optar a una beca predoctoral. Su alegría cuando lo conseguí, y su paciencia posterior. Porque son los que me aguantan día tras día, en lo bueno y en lo malo, y los que de vez en cuando tienen que recordarme las cosas que he conseguido, porque según ellos soy autoexigente y metódica. Sois mi equilibrio.

Y lo más importante, a mis padres. Porque, aunque suene como un tópico, lo han dado todo por mí. Me han educado de manera impecable y han sido y son mis mejores amigos. Mi padre no sabe muy bien lo que es la biotecnología, pero sé lo que siente cuando dice con la boca bien grande y con algo de humor que su hija sabe hacer arroz que sin nada más ya tiene sabor a bogavante. Mi madre, farmacéutica, está

viendo como su hija recorre el camino que a ella también le hubiese gustado experimentar, y me da la mano para seguir adelante con el amor más grande del mundo. Somos un equipo peculiar, y es que no podría haber tenido más suerte que caer aquí, en esta casa y en esta familia. Gracias porque esto realmente no es solo mío, es algo nuestro.





# ÍNDICE





<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1	La piel	3
1.2	Fibrosis	4
1.3	TGF $\beta$	6
1.4	Fibrosis cutánea	8
1.5	Mecanismo de reparación de heridas y TGF $\beta$	10
1.6	Características y aspectos clínicos de los queloides	13
1.7	Tratamiento farmacológico: esclerodermia	14
1.8	Tratamiento farmacológico: cicatrices hipertróficas y queloides	16
1.9	Características histológicas y moleculares de las cicatrices hipertróficas y los queloides	19
1.10	La fosfodiesterasa 4 como diana farmacológica en fibrosis	23
1.11	Características de roflumilast	26
<b>2</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
2.1	Hipótesis	33
2.2	Objetivos	34
<b>3</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>37</b>
3.1	Materiales	39
3.1.1	Reactivos utilizados	39
3.1.2	Pacientes	42
3.1.3	Animales de experimentación	42
3.2	Métodos	43
3.2.1	Aislamiento y cultivo de fibroblastos dérmicos	43
3.2.2	Cultivo de células comerciales	43
3.2.3	Cultivo modelo 3D	44
3.2.4	Condiciones experimentales <i>in vitro</i>	48
3.2.5	Silenciamiento de PDE4B	49
3.2.6	Ensayo de proliferación	51
3.2.7	Senescencia	52
3.2.8	KeratinoSens	53
3.2.9	Fluorescencia por DCF de especies reactivas de oxígeno	54
3.2.10	Modelo animal	55
3.2.11	Adquisición TC	57

3.2.12	Adquisición de imágenes.....	58
3.2.13	Análisis de imágenes .....	58
3.2.14	Toma de muestras .....	59
3.2.15	Hidroxiprolina .....	59
3.2.16	Análisis de la expresión proteica mediante western blot.....	60
3.2.17	Análisis de la expresión génica mediante PCR .....	63
3.2.18	Co-inmunoprecipitación.....	67
3.2.19	Histología .....	68
3.2.19.1	Fijación y deshidratación del tejido .....	68
3.2.19.2	Inmunohistoquímica.....	68
3.2.19.3	Tinción hematoxilina-eosina .....	70
3.2.19.4	Co-inmunofluorescencia .....	71
3.2.20	Análisis estadístico .....	72
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
4.1	Estudio de la expresión de las isoformas de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) y marcadores fibróticos en muestras de pacientes sanos, cicatrices hipertróficas y queloides.....	77
4.1.1	Estudio genético de la expresión de las isoformas de fosfodiesterasa 4 (PDE4)	77
4.1.2	Estudio genético de la expresión de marcadores fibróticos .....	77
4.1.3	Estudio de la expresión proteica de la fosfodiesterasa 4 B (PDE4B) y la $\alpha$ -actina de musculo liso ( $\alpha$ SMA) en cortes de tejido de pacientes .....	79
4.2	Estudio <i>in vitro</i> de los efectos de roflumilast sobre la expresión de marcadores fibróticos y de las rutas aguas abajo de TGF $\beta$ 1.....	79
4.2.1	Estudio del efecto de roflumilast sobre la expresión de los marcadores de la transición de fibroblasto a miofibroblastos (TFM) y de la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 en fibroblastos .....	80
4.2.2	Estudio del efecto de roflumilast sobre la expresión de marcadores fibróticos tras inducir la transición de fibroblasto a miofibroblastos (TFM) y de la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 en fibroblastos .....	81
4.2.3	Estudio del papel de la fosfodiesterasa 4 B (PDE4B) en la transición de fibroblasto a miofibroblasto (TFM) y en la ruta canónica y no canónica de TGF $\beta$ 1 en fibroblastos .....	82
4.2.4	Estudio del efecto de roflumilast en fibroblastos extraídos de queloides.....	84

4.2.5	Estudio de los efectos de roflumilast en la expresión de las isoformas de PDE4 y de los marcadores de la transición epitelial mesenquimal (TEM) en un modelo 3D de epidermis.....	85
4.2.6	Estudio de los efectos de roflumilast en la expresión de los marcadores de la TEM, y en la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 en queratinocitos .....	86
4.2.7	Estudio del papel de la fosfodiesterasa 4 B (PDE4B) en la transición epitelial mesenquimal (TEM) y en la ruta canónica y no canónica de TFGβ1 en queratinocitos..	88
4.3	Análisis de la expresión e interacción de la PDE4B y p-ERK1/2 en diferentes modelos de fibrosis cutánea.....	89
4.4	Análisis del estrés oxidativo en fibrosis cutánea, los efectos de roflumilast y el papel de la fosfodiestesa 4 B (PDE4B).....	91
4.4.1	Estudio de la expresión de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) en piel .....	92
4.4.2	Estudio de la expresión de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) y el papel de roflumilast y la PDE4B en fibroblastos .....	92
4.4.3	Estudio de la expresión de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) y el papel de roflumilast y la PDE4B en queratinocitos.....	93
4.5	Estudio <i>in vitro</i> del mecanismo de acción de roflumilast.....	95
4.5.1	Análisis del mecanismo de acción de roflumilast en NHDF .....	96
4.5.2	Análisis del mecanismo de acción de roflumilast en NHEK .....	99
4.6	Estudio <i>in vitro</i> de la proliferación y senescencia.....	102
4.6.1	Análisis de la proliferación y senescencia en NHDF y fibroblastos de queoloide 102	
4.6.2	Análisis de la proliferación y senescencia en NHEK y un modelo 3D de epidermis.....	105
4.7	Estudio de los efectos de roflumilast en un modelo <i>in vivo</i> de fibrosis cutánea.....	106
4.7.1	Análisis <i>in vivo</i> de la expresión de marcadores de fibrosis.....	106
4.7.2	Estudio del nivel de fibrosis, así como de la integridad del tejido <i>in vivo</i> .....	107
4.7.3	Análisis de las imágenes de tomografía computarizada .....	110
4.7.4	Análisis del papel de la PDE4 en la expresión de marcadores fibróticos y la fosforilación de SMAD3 .....	110
5	DISCUSIÓN.....	115
6	CONCLUSIÓN .....	131
7	BIBLIOGRAFÍA .....	135

<b>8</b>	<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>151</b>
<b>9</b>	<b>ANEXO I.....</b>	<b>157</b>
<b>10</b>	<b>ANEXO II.....</b>	<b>161</b>





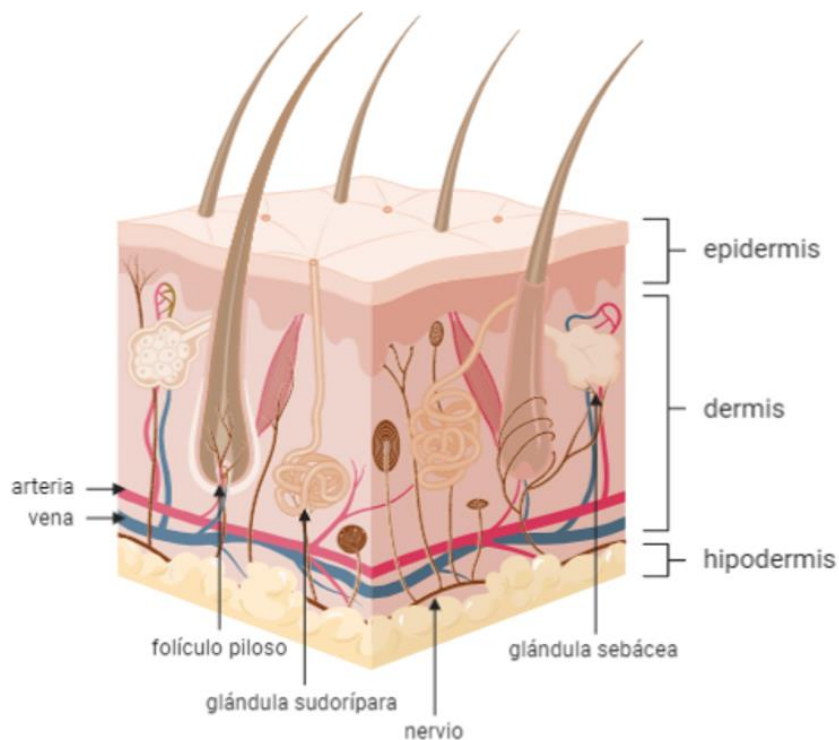
# **1 INTRODUCCIÓN**





## 1.1 La piel

La piel es el sistema de órganos más grande del cuerpo y como tal, desempeña funciones importantes tales como la protección ante agresiones mecánicas e infecciones y el mantenimiento de la temperatura corporal y del equilibrio de fluidos en el cuerpo (1). Esta compuestas por tres capas llamadas epidermis, dermis y tejido subcutáneo o hipodermis (**Figura 1**) (2).



**Figura 1: Estructura esquemática de la piel.** Creada con BioRender.

La epidermis, la capa más externa de la piel, es un epitelio escamoso estratificado que está formado por diferentes tipos celulares, de los cuales, el 90-95% son queratinocitos. Estas células epiteliales, experimentan un proceso de diferenciación (queratinización) desde la capa basal hasta el estrato córneo, primera y última capa de la epidermis de dentro hacia fuera, lo que en última instancia resulta en la formación de células escamosas anucleadas (corneocitos) que forman el estrato córneo. Así pues, la epidermis se divide en 4 o 5 capas dependiendo de la zona anatómica del cuerpo. La primera capa, como ya se ha dicho, es la capa basal, seguida del estrato espinoso, el estrato granuloso, el estrato lúcido y el estrato córneo. El

estrato lúcido únicamente se encuentra en la región palmoplantar. Además, la epidermis también contiene dos unidades estructurales distintas, las glándulas sudoríparas y los folículos pilosos (3).

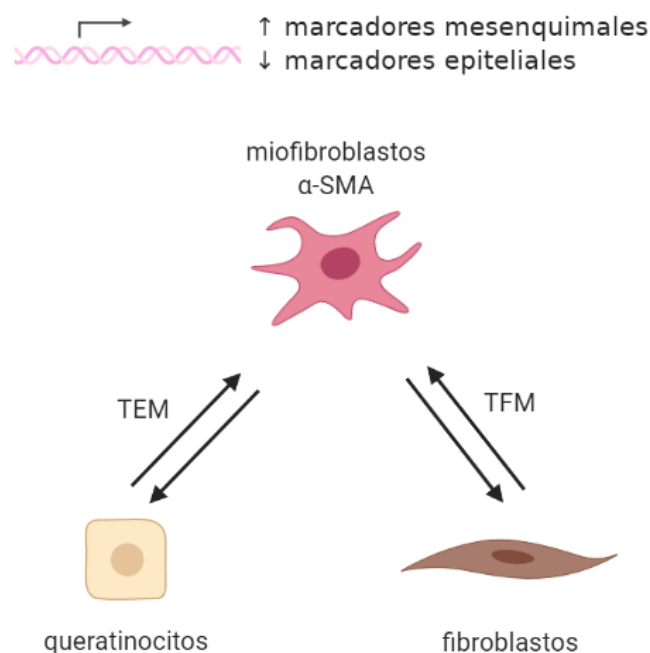
La dermis está formada por una capa gruesa de tejido conectivo que consta, entre otras, de fibras de colágeno (Col) y elastina, proteínas que le otorgan resistencia y flexibilidad respectivamente. Las más abundantes son las fibras de Col (>90%) que están compuestas fundamentalmente por Col tipo I y Col tipo III. La dermis a su vez, se divide en dos capas, la dermis papilar, a continuación de la epidermis, y la dermis reticular. La dermis papilar es más rica en células y está formada por una malla fina de haces de Col. La dermis reticular, o profunda, está formada por haces de Col más gruesos que se disponen de forma paralela a la superficie de la piel. La dermis está compuesta por diferentes tipos celulares, como fibroblastos, dendrocitos dérmicos y mastocitos, vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas (3).

La hipodermis está formada por tejido graso donde el principal tipo celular son los adipocitos. Esta capa desempeña un papel importante en la termorregulación y el suministro de energía (3).

## 1.2 Fibrosis

La fibrosis, es un mecanismo fisiológico que se da en respuesta a un daño en el tejido. Se define como el aumento de la proliferación de fibroblastos y deposición de matriz extracelular (MEC), que, cuando adquiere un carácter patológico, puede destruir la arquitectura normal y producir la disfunción del órgano. Las células más importantes involucradas en este proceso son los miofibroblastos, que son células mesenquimales contráctiles productoras de Col. Estas células se generan a partir de diversas fuentes como por ejemplo las células epiteliales, que sufren el proceso de transición epitelio mesenquimal (TEM), y de los fibroblastos residentes, que sufren el proceso de transición de fibroblasto a miofibroblasto (TFM) (**Figura 2**). La TEM es un proceso mediante el cual las células epiteliales experimentan cambios fenotípicos, perdiendo la adhesión intercelular y la polaridad apical basal, adquiriendo características mesenquimales que le confieren capacidad migratoria. El primer paso es la pérdida de marcadores epiteliales, como la *zonula occludens 1* (ZO-1) y la E-

cadherina, las cuales mantienen el contacto intercelular mediante uniones estrechas y adherentes respectivamente. A continuación, se produce la regulación al alza de componentes de la MEC como el Col tipo I y la fibronectina. Esta última interactúa con otros componentes de la MEC y con moléculas de adhesión celular favoreciendo la motilidad. Este proceso, como se ha dicho anteriormente, interviene en mecanismos fisiológicos tales como la cicatrización de heridas cutáneas, durante la cual, los queratinocitos estacionarios migran a través del lecho de la herida para restaurar la barrera epidérmica (4–7).



**Figura 2: Origen de los miofibroblastos en fibrosis cutánea.** Los miofibroblastos, que son células mesenquimales que sintetizan y secretan componentes de la matriz extracelular (MEC) y contribuyen a la fibrosis, se originan a partir de diversas fuentes tales como: la transición epitelio mesenquimal (TEM), y la transición de fibroblastos a miofibroblastos (TFM). Creada con BioRender.

Aunque la fibrosis puede tener diferentes etiologías, generalmente, es el resultado de una inflamación crónica inducida por diferentes estímulos como infecciones, isquemia, reacciones alérgicas o autoinmunes, radiación o agresiones químicas. La inflamación persistente provoca la liberación sostenida de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento fibrogénicos (8). Las células del sistema inmunológico secretan, entre otras moléculas, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), que activa a las células residentes provocando su transición a miofibroblasto

y la expresión por lo tanto de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), proteína contráctil y marcador por excelencia de los miofibroblastos (6–8). Este tipo celular también se puede identificar por el incremento en la expresión de la proteína de activación de los fibroblastos (FAP) (9).

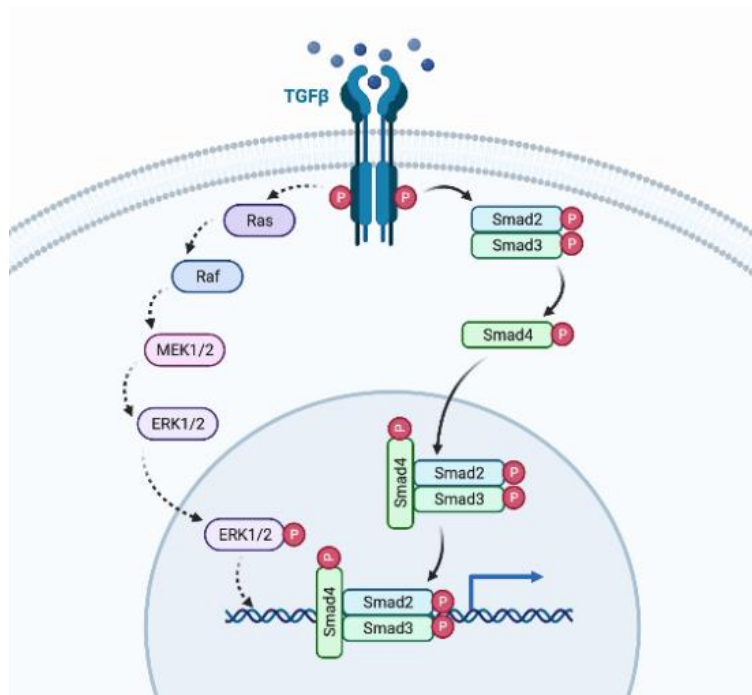
### 1.3 TGF $\beta$

La superfamilia de citocinas TGF $\beta$  está formada por TGF $\beta$ s, activinas, inhibinas, proteínas morfogénicas óseas (BMP), la hormona anti-mülleriana y factores de diferenciación y crecimiento. Los TGF $\beta$ s, están involucrados en muchos procesos celulares, los cuales incluyen la proliferación, la TEM y la remodelación de la MEC. Por ejemplo, en el caso de las células epiteliales, los TGF $\beta$ s inhiben la proliferación e inducen su diferenciación. Aunque las TGF $\beta$ s forman parte de los mecanismos de mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, estas moléculas se sobre-expresan en patologías tales como el cáncer, procesos fibróticos e inflamación (10,11).

Existen tres isoformas de TGF $\beta$ s en humanos: TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3. La isoforma que adquiere mayor importancia en la presente tesis doctoral es TGF $\beta$ 1 por su papel en el proceso de curación de heridas (12,13). Además, TGF $\beta$ 1 es la más predominante y se encuentra de forma casi ubicua en todos los tejidos de mamíferos. De hecho, es la isoforma a la que se le atribuye principalmente el desarrollo de la fibrosis tisular (8). Todas las isoformas de TGF $\beta$ s se secretan en su forma latente inactiva, formada por un homodímero unido a una secuencia de aminoácidos conocida como péptido asociado latente (LAP). Este a su vez, está unido a una proteína denominada proteína de unión al TGF $\beta$  latente (LTBP), formando un complejo denominado complejo grande de latencia (LLC), que interactúa con la MEC. De esta forma, las isoformas de TGF $\beta$ s no pueden unirse a sus receptores. El proceso de activación de los TGF $\beta$ s implica la liberación del LLC de la MEC, así como la posterior proteólisis del complejo LAP-LTBP. Los TGF $\beta$ s activos, se unen y activan a los receptores serina/treonina quinasa tipo I y II (receptores de TGF $\beta$  tipo I (T $\beta$ RI) y receptores TGF $\beta$  tipo II (T $\beta$ RII)) induciendo la formación de complejos heterodiméricos. Los TGF $\beta$ s tienen una mayor afinidad por los T $\beta$ RII, los cuales fosforilan a los T $\beta$ RI, lo que conlleva la activación de las rutas de señalización aguas abajo del receptor: la vía

canónica dependiente de SMAD y las vías independientes de SMAD o no canónicas (10–12).

La familia de proteínas SMAD esta compuestas por: SMAD regulado por receptores (R-SMAD 1,2,3,5 y 8), SMAD mediadora común (Co-SMAD 4) y las SMAD inhibitorias (I-SMAD 6 y 7) (14). Solo los R-SAMD son fosforilados y activados por los T $\beta$ RI. SAMD2 y SMAD3 responden principalmente a la señalización de la subfamilia TGF $\beta$ s, mientras que, SMAD1, 5 y 8 lo hacen a la de BMP (11). En la vía dependiente de SMAD, SMAD2 y SMAD3 son fosforilados por dicho receptor y se translocan al núcleo junto SMAD4, donde interactúan con otros factores de la transcripción modulando la expresión génica de, por ejemplo,  $\alpha$ -SMA, lo que a su vez promueve el depósito de proteínas de la MEC como Col tipo I y III (15). Las vías no canónicas engloban rutas de señalización que dependen, entre otras, de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (10). Los miembros de esta familia de proteínas regulan procesos celulares tales como la diferenciación, la proliferación, la supervivencia o la apoptosis. De entre las vías MAPK activadas por TGF $\beta$  se encuentra la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) (**Figura 3**) (8).



**Figura 3:** vía canónica dependiente de SMAD y vía no canónica MAPK/ERK. El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) se une al receptor heterodimérico que se autofosforila y fosforila a su vez a

proteínas intracelulares tales como SAMD2 y SMAD3 o ERK1/2, lo que conlleva la activación aguas abajo de rutas de señalización y la transcripción de genes relacionados con procesos celulares tales como la transcripción epitelio mesenquimal (TEM). Creada con BioRender.

## 1.4 Fibrosis cutánea

La fibrosis cutánea ocurre en una variedad de enfermedades como la esclerosis sistémica (ES) o esclerodermia (15–17), queloides (5), cicatrices hipertróficas y otras afecciones (18). Todas ellas comparten una característica, y es la deposición excesiva de Col y otros componentes de la MEC debido a la activación de los fibroblastos dérmicos (19). Los trastornos fibróticos pueden afectar en gran medida a la duración y calidad de vida de los pacientes con disfunción orgánica y trastornos psicológicos (5,18).

En el caso de la ES, por ejemplo, en EEUU hay aproximadamente 100.000 casos con un promedio de supervivencia de 11 años. Esta es una enfermedad sistémica del tejido conectivo donde entre los órganos más afectados destacan los pulmones, el corazón, el tracto gastrointestinal, los riñones y la piel (18). Desde el punto de vista patogénico, generalmente se considera que la autoinmunidad, la vasculopatía y la fibrosis son los principales procesos fisiopatológicos (20). La esclerosis de la piel es el rasgo más característico de la ES, junto con la enfermedad pulmonar intersticial (EPI), y se evalúa mediante la puntuación de Rodnan modificado (mRSS) (21). Esta es una técnica que se utiliza para medir el grosor de la piel y que puede relacionarse con la gravedad y la mortalidad en pacientes con ES. Se trata de estimar el grosor de la piel palpándola y usando una escala del 0 al 3 en 17 áreas del cuerpo (22).

En la etapa final de la ES, hay un depósito excesivo de Col en la dermis, con pérdida de las estructuras anexas y tejido adiposo asociado (18). La ES se clasifica en dos formas clínicas principales según el grado de afectación de la piel: esclerosis sistémica limitada (ESL) y esclerosis sistémica difusa (ESD). Los pacientes con ESL sufren de fibrosis en la piel en la cara y extremidades (distales a las rodillas y los codos), sin embargo, en la ESD, la fibrosis se produce en el tronco y partes proximales de las extremidades. La ESL tiene una progresión más lenta, lo que conlleva un pronóstico relativamente bueno con una supervivencia de 10 años superior al 90%. En

la ESD, el porcentaje de supervivientes con una esperanza de vida de 10 años o más oscila entre el 65 y el 82%, resultado de la amplia gama de complicaciones sistémicas (21).

Hablando de las características moleculares de esta patología, estudios previos han demostrado que los fibroblastos extraídos de pacientes con ESD sobre-expresan los T $\beta$ RI y T $\beta$ RII *versus* fibroblastos sanos y que esta sobre-expresión a su vez está relacionada con un incremento en la deposición de Col tipo I (23). También se ha probado un aumento en la fosforilación de SMAD2/3 en la epidermis de pacientes con ES (24). Por otro lado, varios estudios han demostrado una sobre-expresión de la proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina (IGFBP3). Esta es la principal proteína transportadora del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) pero también posee otras funciones fisiológicas. Se ha observado un aumento de IGFBP3, además del caso de los pacientes de ES, en otras afecciones fibróticas como la fibrosis pulmonar idiopática (FPI). Además, en este caso, la estimulación de fibroblastos de pulmón con IGFBP3 resultó en un aumento en la deposición de fibronectina, por lo que, los autores sugieren que esta proteína juega un papel importante en el inicio y/o perpetuación de la fibrosis (25,26). Además, también se ha visto que, hay una mayor expresión de calponina en las biopsias de piel procedentes de pacientes de ES, proteína que favorece la motilidad celular y cuya expresión aumenta en el caso de los miofibroblastos (27).

La cicatrización de heridas es un proceso fisiológico importante para mantener la integridad de la piel después de un traumatismo. La aberración en dicho proceso conlleva una cicatrización excesiva, con la formación de cicatrices hipertróficas y queloides (**Figura 4**), o heridas crónicas (úlceras) (28). Los pacientes con diabetes, los ancianos y los pacientes con trastornos genéticos, están especialmente predispuestos a la curación anormal de heridas que conducen a secuelas a largo plazo (29). Los queloides representan tumores fibroproliferativos benignos que se originan, normalmente, en respuesta a un traumatismo en la piel y a una expresión excesiva de factores de crecimiento y citoquinas. El tejido que loide se caracteriza por una deposición excesiva de componentes de la MEC, mayoritariamente Col, y por rebasar los márgenes de la herida a diferencia de la piel hipertrófica (14). La cicatriz

hipertrófica, por lo general, se aplana al nivel de la piel circundante y puede retroceder con el tiempo. Un queloide, por el contrario, suele necesitar de cirugía para su retirada y además tiene una alta tasa de recurrencia (28).



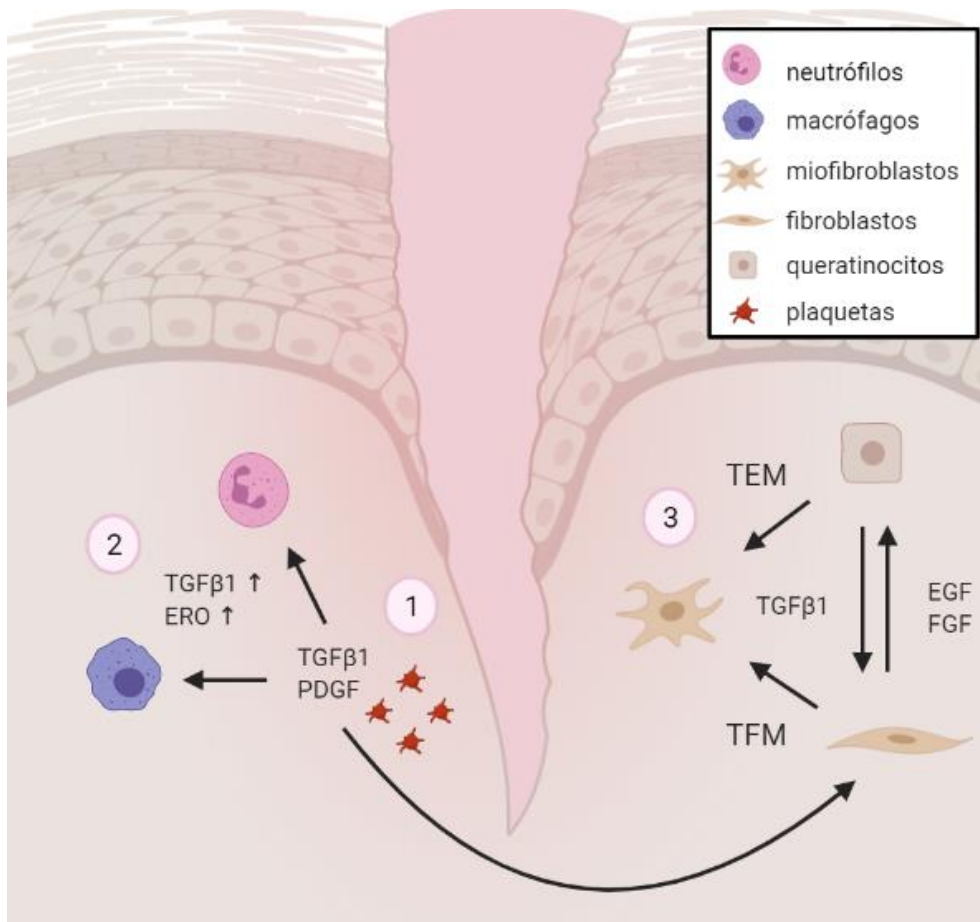
**Figura 4:** imágenes representativas de cicatrices hipertróficas (izquierda) y queloides (derecha). Imagen obtenida de DermNet NZ (30).

### 1.5 Mecanismo de reparación de heridas y TGF $\beta$

Existen varias fases en el mecanismo de reparación de heridas (**Figura 5**), tales como la hemostasia, inflamación, proliferación y maduración. La hemostasia puede definirse como la interrupción del sangrado después de una lesión e implica vasoconstricción, agregación plaquetaria y coagulación de la sangre (13). La agregación plaquetaria conlleva la desgranulación de las plaquetas y la liberación de factores quimiotácticos (quimiocinas) y factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y TGF $\beta$ 1 (28,29,31). PDGF es un potente mitógeno que atrae neutrófilos, macrófagos y fibroblastos. Las plaquetas, en este caso, son la principal fuente de TGF $\beta$ 1, pero este factor de crecimiento también es liberado por macrófagos, neutrófilos, fibroblastos y queratinocitos (1). En la inflamación, los neutrófilos y macrófagos fagocitan el tejido muerto o dañado además de las bacterias y generan un microambiente hostil para las mismas por medio de las especies reactivas de oxígeno (ERO). En la fase proliferativa se forma el tejido de granulación, que está compuesto por fibroblastos activados y miofibroblastos que sintetizan una nueva MEC y ayudan a contraer la herida (29). Una característica distintiva del proceso fisiológico normal de reparación de heridas es la capacidad de detener la producción continua de Col, con un depósito máximo de aproximadamente 21 días (16). En esta fase, las células epiteliales también proliferan para restablecer la barrera epidérmica (32). El tejido de granulación será después desplazado por tejido conectivo normal en



la fase de maduración (29). Este último paso requiere de un equilibrio preciso entre la apoptosis de las células existentes y la formación de nuevas células (28). En un proceso normal de cicatrización de heridas, existen señales de “detención” que cesan los mecanismos de reparación cuando se cierra la herida y se completa la reepitelización (1). La patogénesis de la cicatrización excesiva de heridas no está del todo clara, aunque la clínica sugiere que esta puede deberse a un desequilibrio en cualquiera de las fases del proceso de cicatrización de heridas (28,33). La persistencia de la población de miofibroblastos en el caso de las cicatrices hipertróficas podría estar relacionada con una inhibición de la apoptosis. De hecho, se ha visto que, los miofibroblastos derivados de cicatrices hipertróficas tienen respuestas diferenciales a inductores apoptóticos en comparación con los miofibroblastos cuyo origen son heridas cutáneas normales. Este fenómeno, la muerte celular programada, podría inducirse en el caso del mecanismo de reparación de heridas por la reducción en la concentración de factores de crecimiento o por la remodelación de la MEC por parte de las metaloproteinasas, lo cual interferiría en la adhesión de los miofibroblastos con la MEC (34).



**Figura 5: Mecanismo de reparación de heridas.** Tras una lesión en la piel, las plaquetas se activan y liberan factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  1 (TGF $\beta$ 1) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Estas moléculas, atraen y activan a otras células como macrófagos y neutrófilos que además de ampliar la señal liberando más TGF $\beta$ 1, fagocitan el tejido dañado y las bacterias y generan especies reactivas de oxígeno (ERO). TGF $\beta$ 1 activa a los fibroblastos residentes y a los queratinocitos promoviendo su transición a miofibroblastos, células productoras de componentes de la matriz extracelular (MEC). Además, los queratinocitos y fibroblastos liberan otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) lo que promueve la proliferación de estas células. Creada con BioRender.

TGF $\beta$ , por lo tanto, juega un papel importante en la homeostasis de la piel. Por ejemplo, en un estudio realizado sobre queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT y dos variantes genéticas de esta misma línea celular, una de las cuales estaba transfectada con un vector de ARN interferente para SMAD2, 3 y 4, y la otra sobre-expresaba SMAD7, se observó que, tras estimular a las células con TGF $\beta$ , la proliferación disminuyó drásticamente en el caso de las primeras pero que sin embargo no afectó a las variantes modificadas. Tanto las HaCaT a las cuales se les había inhibido la expresión de SMAD2, 3 y 4, como la variante que sobre-expresaba SMAD7 poseían una alta tasa de proliferación en ausencia de TGF $\beta$ , la cual no se vio afectada tras tratar a las células con dicho factor (35). En el caso de los queloides, se ha

visto que hay una sobre-expresión de los receptores T $\beta$ RI y T $\beta$ RII en comparación con los fibroblastos normales (36). También se ha visto que, la adición exógena de anticuerpos neutralizantes de TGF $\beta$ 1 en modelos de ratón adultos resultó en una menor aparición de cicatrices y en una disminución de la deposición de Col y fibronectina (37). Estos hallazgos se corroboraron con estudios posteriores. Por ejemplo, hubo un experimento *in vivo* en el que primero se generaron heridas por escisión a los ratones y al tercer día se les administró un inhibidor de TGF $\beta$  asociado a un péptido de direccionamiento vía intravenosa. Esta proteína recombinante dirigía la decorina, el inhibidor de TGF $\beta$ , a los vasos sanguíneos angiogénicos donde se extravasaría a los tejidos. Los análisis histológicos demostraron que, al décimo día, el tejido de granulación en las lesiones de los ratones que habían sido tratados con el péptido de direccionamiento y decorina era un 50% menor con respecto al grupo control. Además, también se redujo significativamente la longitud de las heridas. Asimismo, se redujo la expresión de  $\alpha$ -SMA y el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) (38).

Es decir que, TGF $\beta$ 1, parece tener un papel fundamental en la formación de cicatrices al reclutar células inflamatorias en las primeras fases del proceso de curación y promover la síntesis de componentes de la MEC y la contracción de la herida (39).

## 1.6 Características y aspectos clínicos de los queloides

A medida que la población envejece, la incidencia y la prevalencia de afecciones que conducen a una cicatrización deficiente de la herida también aumenta (40). Los queloides pueden aparecer de manera espontánea o tras un traumatismo o infección cutánea. Su etiología no está bien definida, pero se sabe que tiene un gran componente genético. De hecho, un estudio demostró que, más del 50% de los pacientes con queloides tenían antecedentes familiares. Esta cicatrización excesiva se observa en individuos de todas las razas, incluidos los albinos, pero se sabe que los individuos de piel oscura son más susceptibles a la formación de queloides, con una incidencia del 6% al 16% en las poblaciones africanas (33).

Los queloides pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo, aunque, a pesar de ello, existen zonas más susceptibles que otras. En este sentido, se ha informado de

que la aparición de este tipo de cicatrices es más común en el tórax, los hombros y los lóbulos de las orejas, mientras que las plantas de las pies y la palmas de las manos resultan en regiones menos frecuentes (41).

Este tipo de afecciones pueden suponer un impacto para el paciente tanto físico como psicológico. Suelen ir acompañados de hiperpigmentación, dolor y prurito. Por ejemplo, en un estudio realizado en 120 pacientes con queloides, donde se investigó el impacto de dichas afecciones sobre la calidad de vida de los mismos gracias al cuestionario *Dermatology Life Quality Index (DLQI)*, un 45% obtuvo una puntuación moderada y un 16,66% alta, pudiendo relacionar el mayor impacto sobre la calidad de vida en pacientes de edades comprendidas entre los 16 y 35 años y preferentemente mujeres. Asimismo, en un 53,33% de los casos, los queloides cursaban con dolor, y en un 95% con prurito. Se observaron trastornos funcionales en un 33,33% de los casos (42).

En otro estudio realizado a 28 pacientes, se encontró que el 86% de estos experimentó prurito y el 46% dolor. Además, el prurito se daba mayoritariamente en el borde mientras que el dolor se asoció más al centro del queloide (43).

### 1.7 Tratamiento farmacológico: esclerodermia

El objetivo en el tratamiento de la fibrosis de la piel es restaurar el perfil de fibroblastos dérmicos que se encuentran anormalmente activados produciendo así un exceso de MEC. Generalmente, la activación anormal de este tipo celular es consecuencia final de los procesos fisiopatológicos de la enfermedad, como la activación del sistema inmunitario o la vasculopatía (44).

El metotrexato (MTX) ha sido utilizado para el tratamiento de la fibrosis de la piel en la ES. Su uso está limitado a pacientes dónde la fibrosis cutánea evoluciona rápidamente pero no afecta a ningún otro órgano, ya que por ejemplo, no tiene ningún efecto sobre la EPI (20).

La ciclofosfamida (CFM) tuvo un efecto beneficioso pero modesto sobre la función pulmonar y el engrosamiento de la piel en un ensayo aleatorizado doble ciego *versus* placebo. En este estudio los pacientes fueron tratados con CFM oral durante 12

meses, lo que resultó en una mejoría de la capacidad vital forzada (FVC), prueba que mide la funcionalidad respiratoria (45). El problema surge porque ha quedado demostrado que la EPI requiere de un tratamiento a largo plazo y el perfil de seguridad y los efectos secundarios del tratamiento con CFM pueden limitar su uso durante períodos prolongados de tiempo (20).

El micofenolato de mofetilo (MMF) mostró una mejor tolerabilidad y una menor toxicidad en un estudio *versus* CFM, aunque no mejoró la eficacia. Estos resultados ponen al MMF como primera opción para el tratamiento de la EPI asociada a ES (46).

Rituximab (RTX), un anticuerpo anti-CD20, también ha demostrado tener efectos beneficiosos en la ES mejorando la fibrosis cutánea y mejorando y/o estabilizando la fibrosis pulmonar (47,48). Otro medicamento biológico prometedor para el tratamiento de la ES es el tocilizumab (TCZ), un anticuerpo anti-receptor de interleucina-6 (IL-6), sin embargo, este no parece mejorar la mRSS y sería beneficioso para pacientes con un componente inflamatorio (49). Por otro lado, en un estudio basado en fresolimumab, un anticuerpo anti-TGF $\beta$ , se vio que el bloqueo de las tres isoformas de TGF $\beta$  puede ser una estrategia terapéutica para la ES (50).

Otro enfoque terapéutico con eficacia comprobada es el trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) autólogas. Este tratamiento es efectivo tanto en la fibrosis pulmonar como en la cutánea pero tiene una alta tasa de mortalidad, por lo que, los pacientes con manifestaciones muy graves fueron excluidos de los ensayos realizados para medir la seguridad y eficacia y, por otro lado, los pacientes con enfermedad temprana, que podrían beneficiarse de dicho tratamiento, pueden ser tratados con terapias más convencionales y seguras como MMF o productos biológicos como RTX o TCZ (20,51,52). En un estudio realizado recientemente, se ha visto que, el TCMH autólogas mieloablativo, es decir, la administración de quimioterapia y/o radioterapia a fin de eliminar las células de la médula ósea previo al trasplante, tiene beneficios a largo plazo en pacientes con ES incluyendo una mayor supervivencia en comparación con estudios anteriores de trasplante no mieloablativos (53).

Pirfenidona y nintedanib son dos fármacos aprobados para el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) (20). Un estudio reciente mostró que, nintedanib, tiene un efecto beneficioso y estadísticamente significativo sobre el deterioro de la función pulmonar en pacientes con EPI secundaria a la ES, pero ningún efecto sobre la fibrosis cutánea (54). De la misma manera, se ha investigado la eficacia de la pirfenidona en un ensayo controlado aleatorio, pero, en este caso, parece ser que el fármaco no tiene efecto sobre las funciones pulmonares y la piel en pacientes con ES en comparación con placebo (55). Actualmente, se está llevando a cabo un estudio (Identificador de ClinicalTrials.gov: NCT03221257) que combina pirfenidona con MMF *versus* MMF. La combinación de un inmunosupresor con un agente antifibrótico podría ser muy beneficioso desde el punto de vista patogénico.

### 1.8 Tratamiento farmacológico: cicatrices hipertróficas y queloides

Resulta mucho más eficiente prevenir las heridas hipertróficas que tratarlas (56). Cuando un paciente presenta una herida, esta debe ser correctamente desinfectada y, según sea necesario, aplicar antibióticos tópicos y/o dispositivos para aliviar la presión (57). El objetivo en el tratamiento de las heridas hipertróficas es promover su capacidad espontánea de retroceder con el tiempo (58).

Existen diversos tratamientos para la cicatrización anormal de las heridas, entre ellos la cirugía. La tasa de recurrencia tras la escisión quirúrgica de un queloide oscila entre 50 y el 80%. Es por ello que no se recomienda la cirugía para el tratamiento de estas afecciones ya que además puede exacerbar la situación clínica inicial. En el caso de recurrir a dicho tratamiento, se suelen utilizar terapias adyuvantes como por ejemplo la radioterapia. Se ha demostrado que, la radioterapia postcirugía de queloides reduce la tasa de recurrencia al 2.4-50% (59). La radioterapia por si sola tiene una tasa de respuesta del 10 al 94%, con una tasa de recurrencia en queloides del 50 al 100% (56).

Las láminas de gel de silicona se han utilizado como terapia tópica para queloides y cicatrices hipertróficas desde principios de los 80. Son láminas autoadhesivas y semioclusivas. También se usan como profilaxis para ayudar a prevenir cicatrices anómalas (56). Se trata de un tratamiento seguro, no invasivo, de

fácil aplicación sin necesidad de acudir a un centro médico y es por ello que resulta de especial utilidad en niños (58). Uno de los inconvenientes es mantener en contacto la lámina de gel con el toda la superficie en lesiones grandes (59). Por otro lado, existen también geles autosecantes de silicona tópicos. Comprenden una alternativa a las láminas de gel de silicona y la gran ventaja con respecto a estas últimas es su fácil aplicación sobre cualquier tipo de superficie (60).

La terapia de presión se usa para el tratamiento de cicatrices hipertróficas y queloides desde la década de los 70 (56). Su uso está más extendido para el tratamiento de cicatrices hipertróficas resultantes de quemaduras aunque existe controversia en su eficacia (61).

La crioterapia, la aplicación normalmente de nitrógeno líquido sobre la cicatriz, es otra alternativa de tratamiento para estas afecciones que se estudia desde 1982 (62). En un estudio, por ejemplo, de 93 pacientes con queloides (n=55) o cicatrices hipertróficas (n=38) hubo una respuesta buena o excelente en el aproximadamente 60% de los pacientes, respondiendo mejor las cicatrices hipertróficas. Además, en estas últimas, los haces de Col hipertrófico disminuyeron o desaparecieron. No hubo recurrencia en ningún caso (63). Otro estudio en 40 pacientes, con un total de 65 queloides, mostró una eficacia del 73%, pero a su vez, todas estas cicatrices sufrieron hipopigmentación y atrofia, efectos secundarios típicos de esta terapia (64). Otra opción más novedosa, la cual reduciría los efectos secundarios de la crioterapia convencional, sería la crioterapia intralesional. En este caso, se introduce una sonda que atraviesa la cicatriz por la cual pasará el líquido criogénico. El problema viene porque no se consigue la erradicación completa de los queloides (65).

Desde mediados de la década de 1960, las inyecciones intralesionales de corticosteroides, han sido un tratamiento habitual para las cicatrices patológicas (66). De hecho, es el tratamiento de primera línea para los queloides actualmente. Estos fármacos actúan inhibiendo los procesos proinflamatorios y por consiguiente el reclutamiento de fibroblastos y el exceso de Col. El tratamiento único con corticosteroides intralesionales tiene tasas de respuesta del 50 al 100%, con tasas de recurrencia del 9 al 50% (67,68). El acetónido de triamcinolona (TAC) es el

corticosteroide más utilizado para el tratamiento de estas afecciones de la piel. Se puede usar en monoterapia o en combinación con otras modalidades de tratamiento, como por ejemplo de adyuvante tras la escisión quirúrgica de la cicatriz (69). En este sentido, se ha estudiado la prevención en la recurrencia de queloides postcirugía mediante el tratamiento con inyecciones de corticoesteroides intralesionales *versus* radioterapia y no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas (70). Por otro lado, se estudió el efecto del TAC en monoterapia *versus* crioterapia y la combinación de ambos. Los resultados sugirieron que la combinación de los dos tratamientos era la forma más efectiva de tratar los queloides ya que reducía el espesor, dolor y picazón además de que no se observó recurrencia en este grupo en un periodo de 8 meses (71). En el caso de las cicatrices hipertróficas, este tratamiento estaría considerado de segunda línea. El inconveniente principal de esta técnica es el dolor, pero, además, puede producir atrofia, aparición de telangiectasias e hipopigmentación (69).

El 5-fluorouracilo (5-FU) es un agente antineoplásico que inhibe la síntesis de ADN y que se usa con éxito en el tratamiento de cicatrices patológicas desde 1989 (72). Se hizo un estudio en 53 pacientes con cicatrices hipertróficas (n=21) y queloides (n=32). En el caso de los queloides el tratamiento intralesional con 5-FU se dio tras escisión quirúrgica. Los resultados mostraron una recurrencia del 19% en este grupo tras un año de seguimiento. En el caso del grupo con cicatrices hipertróficas el 86% presentaron una disminución en el volumen de la cicatriz de aproximadamente el 50% (73). También se ha probado la combinación del 5-FU y el TAC *versus* monoterapia en un estudio llevado a cabo con 60 pacientes. La disminución en la pigmentación fue más rápida y estadísticamente significativa en el grupo 5-FU + TAC. En el caso de la altura de la cicatriz, el grupo con mejores resultados fue el 5-FU, y con respecto a la vascularización, el TAC fue el grupo que logró una mayor disminución, todo ello con relevancia estadística. El dolor y el prurito mejoraron en todos los grupos y en el caso del prurito el grupo al que se les había administrado 5-FU lo hizo significativamente más rápido. Con respecto a los efectos secundarios, el grupo TAC mostró una mayor frecuencia de telangiectasias y atrofia cutánea. Además, la ulceración de la piel fue un problema común en el grupo del 5-FU, lo que se observó con una menor frecuencia en



el grupo tratado con la combinación y fue inexistente en el grupo de TAC. Por todo ello, los autores concluyeron que todos los tratamientos fueron efectivos pero que el mejor balance beneficio/riesgo fue para el grupo 5-FU + TAC (74).

La terapia con láser es otro de los tratamientos actuales para los queloides y las cicatrices hipertróficas. Los láseres se pueden clasificar como ablativos y no ablativos. Dentro de los láseres ablativos podemos encontrar por ejemplo el láser de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), y dentro de los no ablativos el láser de colorante pulsado (PDL). Se realizó un estudio en el que se utilizó PDL en 16 pacientes que habían desarrollado cicatrices hipertróficas o queloides derivadas de una esternotomía media. La apariencia clínica de las cicatrices mejoró en todos los casos. El prurito desapareció en 11 de los 12 de los pacientes que lo sufrían y el ardor en 7 de 8, informando este último de una mejoría. Hubo una disminución estadísticamente significativa del eritema en comparación con las cicatrices basales, pero, aun así, la diferencia con la piel normal seguía teniendo relevancia estadística. También se redujo la altura media de la cicatriz y mejoró la flexibilidad (75). En otro estudio se obtuvieron biopsias intralesionales de pacientes antes y 7 días después de ser tratados con PDL. El análisis inmunohistoquímico reveló que TGFβ1 disminuyó significativamente su expresión tras el tratamiento con PDL (76). Por otro lado, la terapia con PDL tuvo una eficacia del 86,7% en un estudio realizado en 30 pacientes con queloides con una regresión ≥ 50% (77).

### 1.9 Características histológicas y moleculares de las cicatrices hipertróficas y los queloides

Tanto en la piel hipertrófica como en los queloides, hay una mayor vasculatura en la dermis en comparación con el tejido cutáneo sano o incluso con cicatrices normales. Estas últimas no muestran diferencias estadísticamente significativas. Más concretamente, la dermis papilar de la piel hipertrófica tiene casi un 80% más de vasculatura *versus* piel sana/cicatrices normales y un poco más del 60% en la dermis reticular. En el caso de los queloides, la vasculatura aumenta en más de un 60% en la dermis papilar y hasta casi un 70% en la dermis reticular. Los queloides y la piel hipertrófica tampoco muestran diferencias significativas entre sí (78).

También se ha visto que, en tejidos que cicatrizan anormalmente, hay un mayor número de fibroblastos y una mayor infiltración de células inflamatorias (79). Diversos estudios muestran que esta patología a menudo implica una sobre-activación y proliferación excesiva de fibroblastos, además de una deficiencia en la apoptosis al final del mecanismo de reparación, lo que conlleva una excesiva deposición de MEC (1,28,33). Como se ha nombrado anteriormente, en respuesta a  $TGF\beta 1$ , los fibroblastos se diferencian en miofibroblastos para contraer la herida, reduciendo así el espacio a reepitelizar (33), y ayudar a remodelar la MEC. Se ha visto que, la señalización persistente de la vía canónica de  $TGF\beta 1$  promueve, además de la proliferación de fibroblastos, la producción excesiva de fibronectina, lo que da lugar a una cicatrización hipertrófica (28). La sobre-expresión de esta proteína también ha quedado probada en tejido queloide (80). De la misma manera, ha quedado demostrado que la expresión génica de Col tipo I está aumentada tanto en queloides como en el tejido hipertrófico, sin embargo, la proporción de Col tipo I/III solo se ve aumentada en el caso del tejido queloide en comparación con la piel sana (81). Por el contrario, la proporción de Col tipo III/I esta aumentada en heridas hipertróficas *versus* no hipertróficas (82).

Con respecto a las vías de señalización, ha quedado demostrado que la fosforilación de SMAD3 está regulada al alza en queloides y que su inhibición con ARN de interferencia disminuye la expresión del gen procolágeno en fibroblastos derivados de este tejido (83). Además, la expresión de SMAD6 y SMAD7 está disminuida en este tipo celular *versus* fibroblastos normales y fibroblastos obtenidos de cicatrices normales. Estas proteínas inhiben la vía canónica dependiente de SMAD al impedir la fosforilación de SMAD3 por parte de los  $T\beta RI$  o, en el caso de SMAD6, impedir la unión de SMAD4 con las R-SMAD (84). Esta ruta por tanto se encuentra desregulada en procesos de cicatrización aberrantes. Se ha probado que, la inhibición en la expresión de  $TGF\beta 1$ , da como resultado una menor fosforilación de ERK1/2 y SMAD2/3 en fibroblastos derivados de queloide (28). Además, otros estudios *in vitro* han demostrado que estas células, son más susceptibles a  $TGF\beta 1$  y PDGF. Se cree que, está mayor sensibilidad a dichos factores de crecimiento es debida a una mayor expresión de sus receptores por parte de los fibroblastos (14,33). Parece ser que, los

queratinocitos que derivan de tejido queloides, actúan de forma paracrina aumentando la expresión de receptores ALK5, un tipo de T $\beta$ RI, y T $\beta$ RII en fibroblastos queloides (13). Algunos estudios sugieren que la presencia de miofibroblastos en tejido queloides es más común que en otros tejidos, incluyendo las cicatrices hipertróficas, lo que sugiere que estas células juegan un papel clave en el desarrollo de este tipo de tumor fibroproliferativo benigno (33).

La remodelación de la MEC es un proceso que debe ocurrir de manera natural en la fase de maduración de las heridas. El activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), el activador tisular del plasminógeno (tPA) y las metaloproteinasas de matriz (MMP) están involucradas en dicho proceso (14). El inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), es un inhibidor del uPA y del tPA. uPA induce la degradación de la MEC y por lo tanto PAI-1, al inhibirla, tiene efectos profibróticos (85). PAI-1 es uno de los genes más regulados al alza por la vía canónica de TGF $\beta$ 1 (86). Se ha visto que, la expresión de PAI-1 está aumentada tanto *in vivo* como *in vitro* en queloides en comparación con muestras de piel sana. Además, al inhibir PAI-1 con anticuerpos neutralizantes de dicha proteína o agregando uPA a los cultivos *in vitro*, la concentración de Col disminuye, por lo que, el aumento en la actividad de PAI-1 en tejido queloides podría explicar la acumulación excesiva de Col (87). Del mismo modo, se ha visto una sobre-expresión de PAI-1 y una disminución en la concentración de uPA *in vitro* en cultivos de fibroblastos derivados de heridas hipertróficas *versus* piel sana (85).

Por otra parte, como se ha comentado anteriormente, en el proceso de curación de heridas se generan ERO. Cuando la producción de estas ERO se vuelve patológica se promueven procesos fibróticos con una mayor producción de citocinas y factores de crecimiento, lo que conlleva un aumento en la supervivencia de los fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos (18). La generación de ERO en respuesta a TGF $\beta$ 1 es rápida y precede a la expresión de PAI-1. Las rutas moleculares que se requieren para la expresión de PAI-1 son dependientes de las ERO. Otro de los genes que se modula al alza por las ERO, además de por TGF $\beta$ 1, es el que codifica para el CTGF (86). CTGF es un péptido rico en cisteína con numerosas funciones biológicas. Por ejemplo, en el caso de los fibroblastos, actúa como un agente mitogénico y

quimioatrayente, por lo que induce una mayor deposición de MEC. Ya ha quedado demostrado en otros trabajos la sobre-expresión de esta proteína en patologías que cursan con fibrosis cutánea como la ES o el tejido queloide (88,89).

Se ha visto que hay un aumento de ERO tanto en cultivos de fibroblastos derivados de cicatrices hipertróficas como de queloides en comparación con la piel sana (90). Además, el factor de transcripción Nrf2 (*nuclear erythroid factor 2*), el cual regula la expresión de los genes ARE, por sus siglas en inglés *Antioxidant Response Element*, y está implicado en la regulación de la apoptosis, también reduce su expresión en tejido queloide (91).

Las NADPH oxidasas (NOX) son una familia de enzimas que catalizan la reducción del O<sub>2</sub> produciendo ERO como el ion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) o el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (92). Se han identificado 7 enzimas NOX en humanos (NOX1-5; DUOX 1 y 2). Las ERO generadas vía NOX contribuyen a la fisiopatología de las heridas crónicas (86). La inducción de la expresión de NOX4 puede darse en diferentes condiciones entre las cuales se incluye la expresión de TGFβ1. El producto principal de NOX4 es el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (93). La inhibición de NOX4 en células mesenquimales de pulmón inhibió la expresión inducida por TGF-β1 de α-SMA, fibronectina y Col tipo I (94).

La senescencia celular es un mecanismo por el cual las células detienen irreversiblemente su crecimiento. Además, adquieren un fenotipo secretor asociado a la senescencia (FSAS), lo que implica la expresión de genes que codifican citocinas inflamatorias, factores de crecimiento y otras proteínas como la isoforma β-galactosidasa asociada a la senescencia (SA-βgal) (95). Este mecanismo puede ocurrir por el acortamiento progresivo de los telómeros y la consecuente activación de vías de respuesta al daño en el ADN, lo que resulta en la activación de la proteína supresora de tumores p53, o por estrés, cuyo origen puede ser, entre otros, el estrés oxidativo, radiaciones o terapias citotóxicas, que, consecuentemente, activan al inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina p16. Ambas vías pueden activar a su vez al inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina p21, lo que conduce a la detección del ciclo celular (96,97). Estudios anteriores han demostrado que los fibroblastos derivados de tejido queloide tienen una mayor tasa de senescencia en comparación con los fibroblastos

normales (98). Varios estudios han relacionado el estrés oxidativo con un acortamiento de los telómeros más rápido, induciendo la senescencia prematura por estrés, utilizando por ejemplo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (99). Por otro lado, se ha visto que, hay un mayor acortamiento de los telómeros en el tejido queloide *versus* piel sana (100).

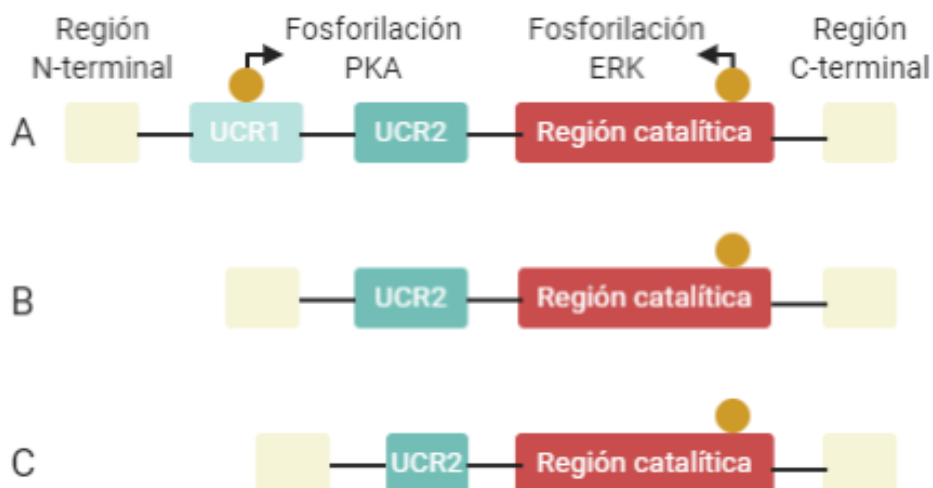
#### 1.10 La fosfodiesterasa 4 como diana farmacológica en fibrosis

El adenosín monofosfato cíclico (AMPC), es una molécula que actúa como segundo mensajero regulando respuestas celulares. Por ejemplo, en el caso de los fibroblastos, tiene efectos antifibróticos inhibiendo la proliferación y la producción de proteínas de la MEC y estimulando la apoptosis. Es sintetizado por la adenilato ciclasa (AC) en respuesta a la activación de receptores acoplados a proteínas G, y degradado por las fosfodiesterasas (PDE) (101). La concentración de AMPC dependerá, por lo tanto, del equilibrio en la actividad de la AC y las PDE. Cuando aumenta la concentración intracelular de este nucleótido cíclico, se activan las unidades catalíticas de la *protein kinase A* (PKA) que difunden hacia el núcleo donde fosforilan a factores de la transcripción como la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB) (102). Una vez se fosforila CREB, este se puede unir a los coactivadores transcripcionales CBP y su homólogo p300, lo que contribuye a la reducción de la inflamación y la fibrosis (102,103). Por ejemplo, en un estudio realizado en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT, se vio que, la cascada de señalización AMPC-PKA-CREB inhibía la transcripción dependiente de SMAD específica de TGFβ. Esto es debido al secuestro por parte de CREB de CBP y p300, que además son coactivadores transcripcionales de SMAD. La menor disponibilidad de estas proteínas se tradujo en una disminución de la expresión de PAI-1 (102).

Por otro lado, la PKA, también fosforila diferentes proteínas citoplasmáticas como las diferentes isoformas de PDE4, lo que puede desencadenar cambios en su actividad enzimática o en su interacción con otras proteínas, como Raf-1, lo que inhibe su actividad quinasa y por consiguiente la fosforilación de ERK1/2 (104).

Existen 11 familias diferentes de PDE (PDE1-11) disponibles para la degradación de nucleótidos cíclicos. La PDE4 es específica del AMPC y su inhibición puede modular las respuestas inflamatorias (103). Existen 4 genes que codifican la PDE4 (PDE4A-D) y

que dan lugar a más de 20 isoformas distintas, gracias al *splicing* alternativo, las cuales se diferencian por su región N-terminal. Estos genes se expresan diferencialmente según el tejido y tipo celular (105). Por ejemplo, en el caso del cerebro, la PDE4A, PDE4B y PDE4D se expresan de manera ubicua, siendo las dos últimas más abundantes, mientras que la expresión de la PDE4C se limita a la corteza, núcleos talámicos y cerebelo (106). La secuencia de aminoácidos que forman las diferentes isoformas de PDE4 están muy conservadas y constan de dos regiones UCR (*upstream conserved regions*) (UCR1 y UCR2) en el extremo N-terminal y un dominio catalítico en el extremo C-terminal. Parece ser que, las regiones UCR tienen un papel regulador de la actividad catalítica de esta enzima. Por ejemplo, UCR1 puede ser fosforilado por la PKA lo que provoca la activación de la PDE4. Además, como se ha dicho con anterioridad, existen diferentes isoformas debido a las variantes de empalme y estas se pueden clasificar según su extremo amino en: forma larga (contiene tanto la región UCR1 como la UCR2), forma corta (solo contiene la región UCR2) y la forma semicorta (contiene la región UCR2 incompleta) (105,107–109). Hablando del extremo C-terminal, se sabe que ERK1/2 fosforila a la PDE4B, PDE4C y PDE4D en su región catalítica activando o inhibiendo dichas isoenzimas (**Figura 6**). Por ejemplo, la PDE4B2 de forma corta se activa con la fosforilación de ERK1/2 y este efecto se inhibe en presencia de PD98059, un inhibidor MAPK/Erk quinasa (110). Además, se ha demostrado que esta isoenzima está fuertemente relacionada con la respuesta inflamatoria, ya que en ratones *knockout* para PDE4B y estimulados con LPS se redujo en hasta un 90% la secreción del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), citocina proinflamatoria (111).



**Figura 6: isoformas de la fosfodiesterasa 4 (PDE4).** Según el extremo amino-terminal las isoformas de la PDE4 se pueden clasificar en: (A) isoformas de forma larga, que contienen dos regiones UCR (*upstream conserved regions*) (UCR1 y UCR2) de las cuales la primera puede ser fosforilada por la proteína quinasa A (PKA); (B) isoformas de forma corta, que únicamente contienen la región UCR2; (C) isoformas de forma corta que contienen la región UCR2 incompleta. Además, las isoformas de la PDE4 pueden ser fosforiladas por la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) en su extremo carboxilo-terminal.

El interés sobre la PDE4 como posible diana farmacológica se remonta al menos cuatro décadas, con el estudio de Ro 20-1724. Este compuesto, categorizado posteriormente como un inhibidor de la PDE4, consiguió reducir el tamaño de las placas en pacientes con psoriasis cuando se administraba de forma tópica (112).

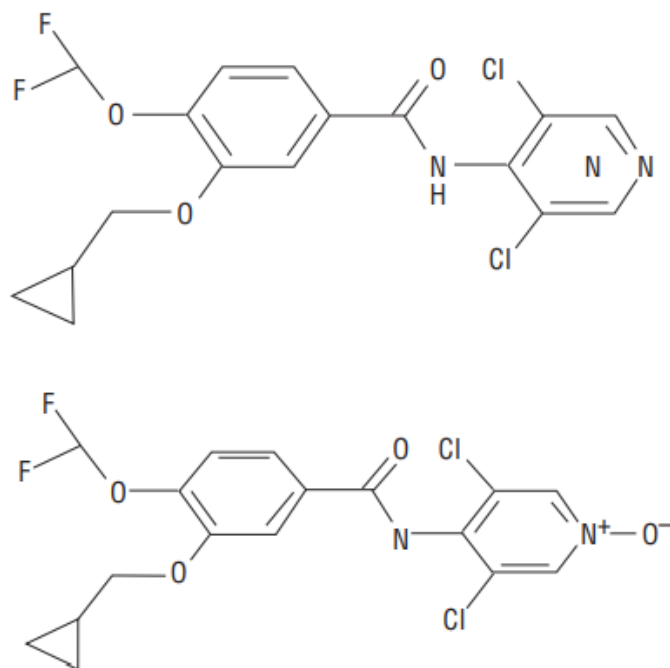
Los inhibidores de la PDE4 de primera generación, es decir, Ro 20-1724, rolipram y denbufylline, provocaban efectos secundarios tales como náuseas y vómitos, por lo que no siguieron su desarrollo clínico. Rolipram, fue investigado para el tratamiento de la depresión al atravesar fácilmente la membrana hematoencefálica y mejorar la neurotransmisión (113). Denbufylline por su parte, fue investigado para el tratamiento de la demencia, pero no resultó eficaz (114).

Roflumilast, apremilast y crisaborol son 3 inhibidores de segunda generación de la PDE4 que han sido aprobados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias o de la piel. Apremilast, fue aprobado en 2014 para el tratamiento por vía oral de la psoriasis en placas de moderada a grave y para la artritis psoriásica. Crisaborol, se usa como tratamiento por vía tópica de la dermatitis atópica desde el 2016 (103).

### 1.11 Características de roflumilast

Roflumilast (3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxi-N-[3,5-di-cloro-4-piridil]-benzamida) es uno de los inhibidores de segunda generación más potentes de la PDE4 ( $CE_{50}=0.2$  nM). Fue descubierto en 1993 a raíz del estudio de compuestos químicos derivados de la benzamida. Su biodisponibilidad es del 79% cuando se administra por vía oral y tiene una vida media de 15,7 h. Este fármaco se metaboliza rápidamente a su metabolito activo N-óxido roflumilast (NOR) ( $CE_{50}=0.9$  nM) (**Figura 7**) (115). Se trata del primer inhibidor de la PDE4 aprobado por la Agencia Europea del Medicamento, por sus siglas en inglés, EMA, para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) grave asociada a bronquitis crónica en pacientes adultos con antecedentes de exacerbaciones (113). El término exacerbación se refiere a un empeoramiento agudo de los síntomas iniciales de un paciente. La EPOC es una enfermedad pulmonar que cursa con una inflamación crónica y una remodelación fibrótica que conlleva la destrucción del parénquima pulmonar, lo que provoca una limitación progresiva del flujo de aire (116).





**Figura 7: Estructura química del roflumilast (arriba) y su metabolito activo (abajo), el N-óxido roflumilast (NOR) (115).**

Además de sus efectos antiinflamatorios, ha quedado demostrado que roflumilast frena la TFM de fibroblastos de pulmón, así como la excesiva deposición de MEC y la TEM de células epiteliales bronquiales humanas en experimentos *in vitro*, y que, además, mitiga la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina *in vivo*. Este se trata de un modelo animal comúnmente utilizado para evaluar el potencial antifibrótico de procedimientos terapéuticos. El establecimiento de la fibrosis en este caso se considera secundario al estrés oxidativo y a la intervención de múltiples factores como TGF $\beta$ . En este sentido, el inhibidor de la PDE4 consiguió revertir la expresión de TGF $\beta$ 1, Col tipo I y CTGF una vez instaurada la fibrosis pulmonar por bleomicina. Además, también redujo la proliferación de fibroblastos de pulmón extraídos de ratones C57Bl/6J. Con respecto a los experimentos *in vitro* con células epiteliales de bronquio, roflumilast, además de aumentar la expresión de marcadores epiteliales y disminuir la de marcadores mesenquimales, redujo la expresión de ERO, NOX4 y la fosforilación tanto de SMAD2/3 como de ERK1/2, por lo que su efecto está relacionado tanto con la vía canónica como con una de las vías no canónicas de TGF $\beta$  (117,118).

En otros estudios realizados *in vitro* en fibroblastos de pulmón humano, el metabolito del inhibidor de la PDE4 redujo el estrés oxidativo y la expresión, tanto a nivel proteico como a nivel genético, de NOX4, proteína implicada en la respuesta fibrogénica tras una lesión en el pulmón. Asimismo, NOR, redujo la producción de Col e inhibió la proliferación de los fibroblastos (119).

Así pues, dada la falta de un consenso sobre los tratamientos actuales para las distintas afecciones que cursan con fibrosis cutánea como queloides, cicatrices hipertróficas y la ES, y dado los efectos beneficiosos, ampliamente estudiados, de roflumilast sobre la fibrosis pulmonar, se decidió investigar los efectos de este inhibidor de la PDE4 en fibrosis cutánea con experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*.





## **2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 2.1 Hipótesis

La hipótesis propuesta en este trabajo se basa en los siguientes hallazgos:

- TGF $\beta$ 1 juega un papel clave en los procesos fibróticos y en el mecanismo de reparación de heridas (12,13,39). Asimismo, ha quedado demostrada la sobre-expresión de esta proteína tanto en cicatrices hipertróficas como en queloides, con su consecuente deposición excesiva de MEC y proliferación de fibroblastos (28,80). En el caso de la ES, se ha visto que hay una sobre-expresión por parte de los fibroblastos de los receptores de TGF $\beta$ 1 y un incremento en la fosforilación de SMAD2/3 en la epidermis (23,24).
- Se ha observado el efecto beneficioso de fármacos anti-TGF $\beta$  en afecciones que cursan con fibrosis cutánea (37,38,50).
- La inhibición de la PDE4 y por tanto el incremento en la concentración intracelular de AMPc tiene efectos antiinflamatorios y antifibróticos (101–103).
- Se ha demostrado que roflumilast, mitiga la TFM y la TEM y que revierte la sobre-expresión de TGF $\beta$ 1, Col tipo I y CTGF en modelos de fibrosis pulmonar. Asimismo, el fármaco, también reduce la hiperproliferación de fibroblastos y disminuye la producción de ERO y la expresión de NOX4, así como la fosforilación tanto de SMAD2/3 como de ERK1/2 (117,118).
- Actualmente no existe evidencia sobre los efectos de roflumilast en fibrosis cutánea.

Por tanto, se establece la siguiente hipótesis:

**Roflumilast mitiga los procesos fisiopatológicos característicos de la fibrosis cutánea al inhibir rutas de señalización aguas abajo de TGF $\beta$ 1.**

## 2.2 Objetivos

Con el fin de evaluar la validez de la hipótesis planteada, se establecen los siguientes objetivos:

- Analizar el perfil de expresión de las diferentes isoformas de la PDE4 en diferentes modelos de fibrosis cutánea.
- Investigar los efectos del silenciamiento de la PDE4 en queratinocitos y fibroblastos dérmicos.
- Evaluar los efectos de roflumilast sobre la TFM de fibroblastos dérmicos inducida por TGF $\beta$ 1, así como su capacidad de revertir dicho proceso y devolver así a las células su fenotipo de fibroblasto (TMF).
- Estudiar los efectos del inhibidor de la PDE4 sobre la TEM inducida por TGF $\beta$ 1 en un modelo 3D de epidermis, así como su reversión tras establecerse el fenotipo mesenquimal (TME).
- Observar el papel de roflumilast en la generación de ERO.
- Elucidar el mecanismo de acción del inhibidor de la PDE4.
- Explorar si roflumilast previene y/o revierte la fibrosis cutánea secundaria a la administración de ácido hipocloroso (HOCl) en ratones.







## **3 MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.1 Materiales

#### 3.1.1 Reactivos utilizados

Tabla 1. Reactivos y kits utilizados.

<b>Reactivo</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
<b>2-Mercaptoetanol</b>	Sigma - Aldrich	M6250
<b>2x Laemmli Sample Buffer</b>	BIO-RAD	1610737
<b>4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI)</b>	Thermo Fisher Scientific	D1306
<b>4–15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 15-well, 15 µl</b>	BIO-RAD	4561086
<b>4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Gel, 10 well, 50 µl</b>	BIO-RAD	4561094
<b>Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)</b>	Sigma - Aldrich	ED25C
<b>Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico (HEPES)</b>	Sigma - Aldrich	H4034
<b>Ácido Clorhídrico 37% (Reag. USP) para análisis, ACS, ISO</b>	PanReac AppliChem	131020
<b>Ácido etilenglicol tetraacético (EGTA)</b>	Sigma - Aldrich	E4378
<b>Agua tratada con DEPC</b>	Thermo Fisher Scientific	AM9906
<b>Albúmina de suero bovino (BSA)</b>	Sigma-Aldrich	A7906
<b>Alcohol isopropílico</b>	PanReac AppliChem	131090.1612
<b>Carbonato de litio</b>	Sigma - Aldrich	101752913
<b>Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)</b>	Sigma - Aldrich	11647229001
<b>Citrato</b>	PanReac AppliChem	141808.1210
<b>Cloroformo</b>	PanReac AppliChem	131252
<b>Cloruro de Sodio (NaCl)</b>	PanReac AppliChem	141659.1211
<b>Cóctel inhibidor de proteasa</b>	Sigma - Aldrich	P8340
<b>Dimetilsulfóxido (DMSO)</b>	Sigma - Aldrich	34869
<b>DPBS</b>	Biowest	LO615
<b>DPX</b>	PanReac AppliChem	255254
<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose w/l-glutamine w/o sodium</b>	Biowest	L0102-500

<b>pyruvate (DMEM)</b>		
<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium, low glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate (DMEM)</b>	Gibco	11570586
<b>Enzima TrypLE™ Select (1X), sin rojo fenol</b>	Thermo Fisher Scientific	12563029
<b>Eosina</b>	Sigma - Aldrich	HT110216
<b>Etanol absoluto para UV, IR, HPLC</b>	PanReac AppliChem	361086
<b>Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1)</b>	Sigma Aldrich	T7039
<b>Fetal Calf Serum (FCS)</b>	Amimed	2-01F00-I
<b>Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)</b>	Roche	22525322
<b>Formaldehído 3.7-4.0 %</b>	PanReac AppliChem	252931
<b>GE Healthcare Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent</b>	Thermo Fisher Scientific	10308449
<b>Geneticin™ Selective Antibiotic</b>	Gibco	11558616
<b>Glicerol</b>	PanReac AppliChem	131339.1211
<b>Glucógeno</b>	Sigma - Aldrich	10901393001
<b>Hematoxylin Solution, Gill No. 3 Hematoxilina</b>	Sigma - Aldrich	GHS332
<b>Hipoclorito de sodio (NaClO)</b>	Sigma - Aldrich	71696
<b>HyClone™ Amphotericin B (Fungiezone) Solution</b>	Thermo Fisher Scientific	11526481
<b>Hydroxyproline Assay Kit</b>	Sigma - Aldrich	MAK008
<b>Hyperfilm™ ECL™</b>	Sigma-Aldrich	GE28-9068-37
<b>Inhibidores de proteasa Pierce™</b>	Thermo Fisher Scientific	36978
<b>KBM-Gold keratinocyte Basal Medium</b>	Cultek	H3192151
<b>KGM-Gold keratinocyte growth medium SingleQuot</b>	Cultek	H3192152
<b>Kit de co-inmunoprecipitación Pierce™</b>	Thermo Fisher Scientific	26149
<b>KT5720</b>	Sigma-Aldrich	K3761
<b>Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent</b>	Thermo Fisher Scientific	11668030
<b>Luciferase Assay System 10-pack</b>	Promega	E1501
<b>Master polymer plus detection system (peroxidase) (incl. dab</b>	Master diagnóstica	MAD-000237QK

<b>chromogen)</b>		
<b>Metanol</b>	PanReac AppliChem	131091.1212
<b>NAC</b>	Sigma-Aldrich	A7250
<b>Nonidet™ P 40 Substitute</b>	Sigma - Aldrich	74385
<b>Obacunona</b>	selleckchem	S3784
<b>Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium, No Phenol Red</b>	Thermo Fisher Scientific	11520386
<b>Parafina</b>	Sigma - Aldrich	P3683
<b>Passive Lysis 5X Buffer</b>	Promega	E1941
<b>PD98059</b>	selleckchem	S1177
<b>Pen/Strep stock, 10K/10K 100 ml</b>	Cultek	H3DE17-602E
<b>Phosphate buffered saline (PBS)</b>	Sigma - Aldrich	P4417
<b>Pierce™ BCA Protein Assay Kit</b>	Thermo Fisher Scientific	23227
<b>Potassium di-Hydrogen Phosphate KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	PanReac AppliChem	131509.1210
<b>Reactivos de transcripción inversa TaqMan™</b>	Thermo Fisher Scientific	N8080234
<b>RNAlater™ Stabilization Solution</b>	Thermo Fisher Scientific	AM7021
<b>Roflumilast</b>	selleckchem	S2131
<b>Running buffer western blot</b>	BIO-RAD	161-0772
<b>Sanguinerine</b>	Sigma - Aldrich	S5890
<b>Senescence Cells Histochemical Staining Kit</b>	Sigma - Aldrich	CS0030
<b>Silencer™ Negative Control No. 1 siRNA</b>	Thermo Fisher Scientific	AM4611
<b>siPDE4B ID:11667</b>	Thermo Fisher Scientific	AM16708
<b>SIS3</b>	Sigma- Aldrich	S0447
<b>Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder</b>	Thermo Fisher Scientific	26623
<b>Suero fetal bovino (FBS), 500ml</b>	Biowest	S1400
<b>Suero fisiológico</b>	B. Braun	190/12606059/1013
<b>TaqMan® Gene Expression Master Mix</b>	Thermo Fisher Scientific	4369016
<b>Trans-Blot® Turbo™ Midi PVDF Transfer Packs</b>	BIO-RAD	1704157
<b>Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs</b>	BIO-RAD	1704156
<b>TriPure® Isolation Reagent</b>	Roche	1667157001
<b>Triton® X 100 pure</b>	PanReac AppliChem	142314
<b>Tween® 20</b>	Sigma - Aldrich	P1379

<b>Xileno</b>	PanReac AppliChem	211769.1714
<b>Platelet-Derived Growth Factor-BB human (PDGF)</b>	Sigma - Aldrich	P4306

### 3.1.2 Pacientes

Para el estudio del tejido queloide e hipertrófico *versus* piel sana se tomaron muestras de donantes del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV), España, bajo la aprobación del Comité Ético de Investigaciones Clínicas (CEIC) del CHGUV (**Anexo I**) además del consentimiento informado de cada paciente participante.

Se obtuvieron un total de 6 muestras de queloide, 6 de cicatrices hipertróficas y 6 de piel sana.

### 3.1.3 Animales de experimentación

Todos los procedimientos y el manejo de los animales se realizaron de acuerdo con las directrices del Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad de Valencia (Valencia, España). El protocolo aprobado por este Comité y utilizado en este proyecto se tituló: "Modelo murino de fibrosis cutánea (*HOCl model*): estudio comparativo de IPD4, corticoides y combinaciones" y su código es: 2017/VSC/PEA/00062 (**Anexo II**).

Se emplearon ratones macho Balb/c (Charles River Laboratory) de 12 semanas de edad y de un peso aproximado de entre 15-22 g.

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 ± 10%.

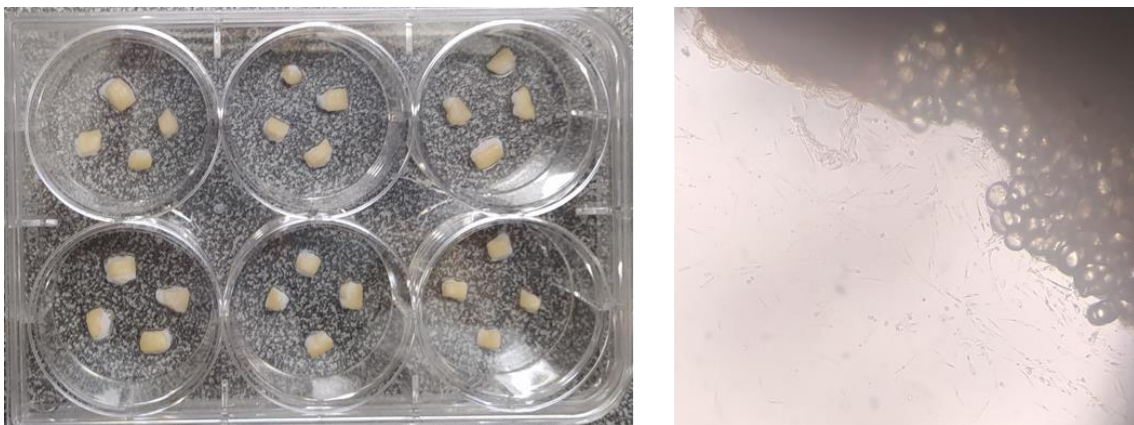


- Temperatura  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ .
- Renovación del aire a 15 ciclos por hora.
- Ciclo luz/oscuridad 12/12 horas.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Aislamiento y cultivo de fibroblastos dérmicos

Los fibroblastos se obtuvieron a partir de tejido queloide humano. La piel se cortó en secciones pequeñas y se lavó con suero fisiológico. Posteriormente, los explantes se dejaron en placas de 6 pocillos con la dermis hacia abajo. Tras 5 min se adicionó DMEM suplementado con un 10% de FBS y con 100 U/ml de penicilina/estreptomicina y 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de anfotericina B. Tras dos semanas aproximadamente, los fibroblastos que habían migrado del explante se tripsinizaron y se pasaron a frascos de 25  $\text{cm}^2$  (**Figura 8**).



**Figura 8: Aislamiento y cultivo de fibroblastos dérmicos.** En la imagen de la izquierda se pueden observar fragmentos de piel con la dermis adherida a la superficie de 6 pocillos de cultivo celular. La imagen de la derecha corresponde a un aumento 40x de la superficie circundante a un fragmento de piel tras 1 semana de cultivo, dónde se observan fibroblastos que han migrado y crecido en monocapa a partir del explante (parte superior de la fotografía).

### 3.2.2 Cultivo de células comerciales

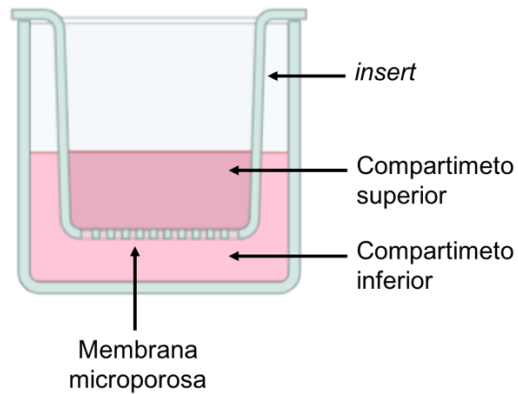
Para la realización de los experimentos *in vitro* se emplearon diferentes tipos de cultivos celulares primarios de proveedor comercial:

- Queratinocitos primarios humanos normales (NHEK; N° cat. 00192627) de la casa comercial Lonza (Basilea, Suiza). Las células se sembraron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> con *KBM-Gold keratinocyte Basal Medium* y sus respectivas *SingleQuots* además de 100 U/ml de penicilina/estreptomicina y 2,5 µg/ml de anfoterinica B. El medio fue reemplazado cada 48 h.
- Fibroblastos primarios dérmicos humanos (NHDF; N° cat. C-12300) de la casa comercial Promocell (Heidelberg, Alemania). Las células se sembraron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> con DMEM 10% FBS y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina y 2,5 µg/ml de anfoterinica B. El medio fue reemplazado cada 48 h.
- Fibroblastos primarios BALB/3T3 de ratón (N° cat. VCA-1005) de la casa comercial Lonza (Basilea, Suiza). Las células se sembraron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> con DMEM 10% FBS y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina y 2,5 µg/ml de anfoterinica B. El medio fue reemplazado cada 48 h.
- KeratinoSens (Givaudan Schweiz AG). Las células se sembraron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> con DMEM 9,1% FCS y 50 mg/ml de geneticina. El medio fue reemplazado cada 48 h.

### 3.2.3 Cultivo modelo 3D

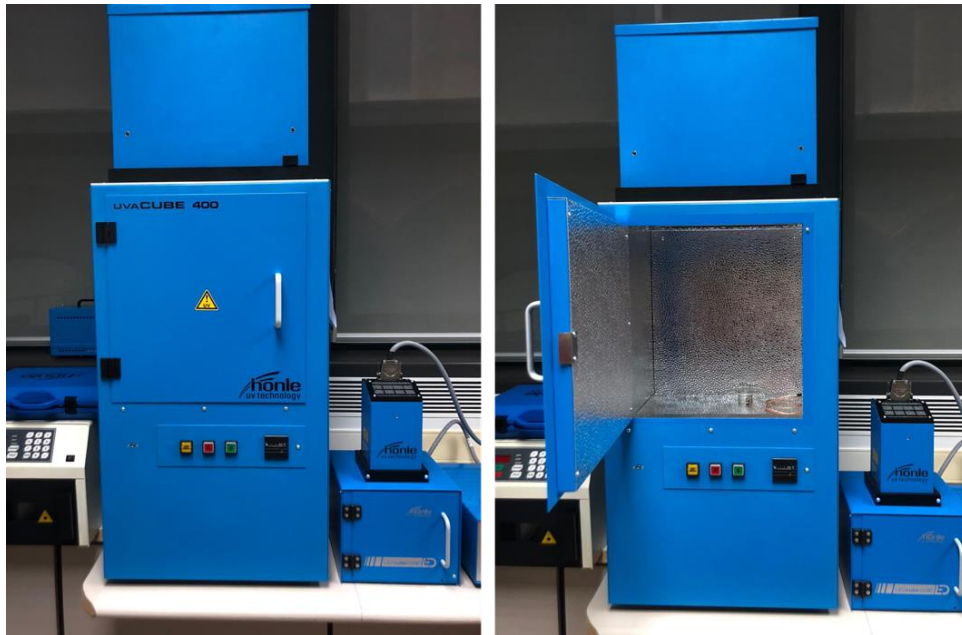
Para la formación del modelo 3D se requiere de una base de fibroblastos, sobre la que se siembran los queratinocitos que van a crecer formando diferentes capas, utilizando los fibroblastos como soporte al que adherirse, de tal forma que se consigue formar una estructura de queratinocitos similar a la epidermis.

Para la obtención de dicho modelo se utilizaron placas de 6 pocillos (Corning Incorporated; Corning, EE.UU.) e *inserts* (Merck Millipore; Burlington, EE.UU.). Los *inserts* son unos cestos de poliestireno cuyo fondo es una membrana microporosa de tereftalato de polietileno. Estos cestos se encajan en los pocillos de las placas de manera que se forman dos compartimentos, el superior y el inferior, tal y como se representa en la **Figura 9**.



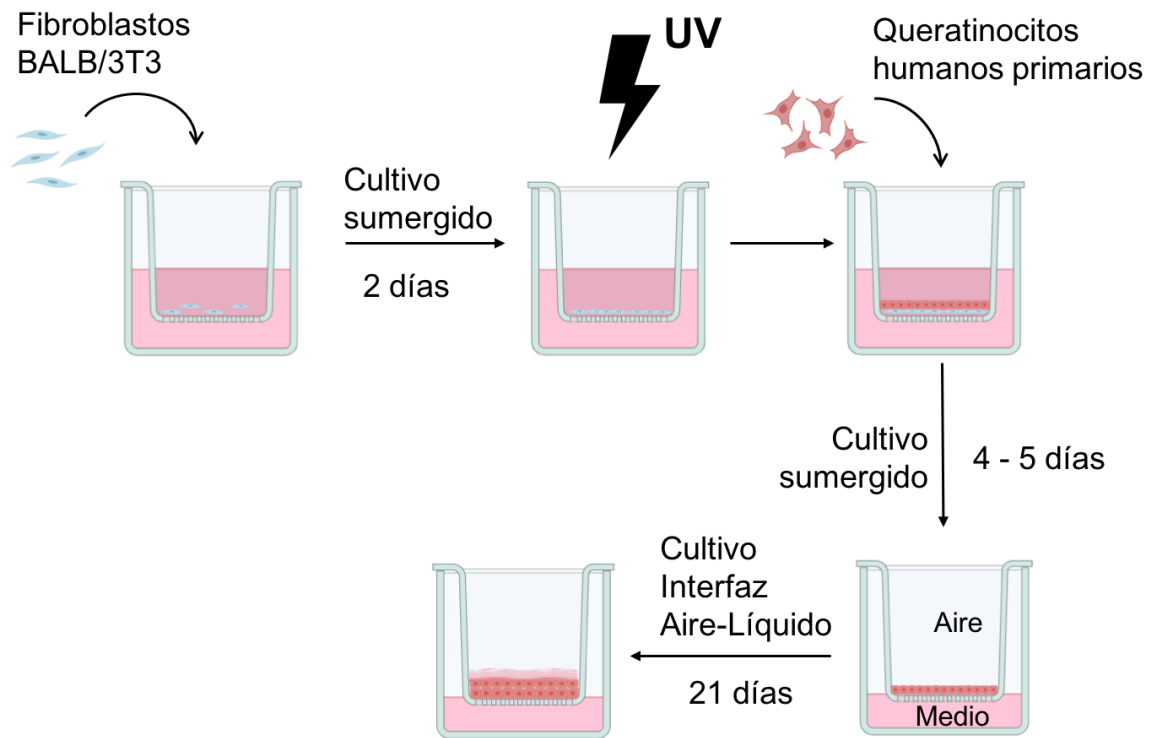
**Figura 9. Esquema de un sistema de cultivo organotípico basado en el uso de inserts.** El sistema permite generar dos compartimentos, superior e inferior, haciendo posible que la parte apical del cultivo quede expuesta al aire y la parte basal quede en contacto con el medio de cultivo. Creado con BioRender.

En primer lugar, para formar el modelo 3D de epidermis, se sembraron los fibroblastos sobre la base del *insert* y se mantuvieron durante 2 días con DMEM suplementado con 10% FBS por arriba y por abajo del *insert*. Una vez alcanzada una confluencia del 60-70% las células fueron irradiadas con luz UV a 0,048 mW durante 1 h para detener su crecimiento con el equipo UVACUBE 400 (Honle UV Technology; Germany) (**Figura 10**). Tras 24h y después de comprobar que los fibroblastos estaban vivos pero que efectivamente se había detenido su crecimiento, se sembraron sobre ellos los queratinocitos.



**Figura 10:** Cámara de irradiación para la simulación solar de radiación UV. Equipo UVACUBE 400.

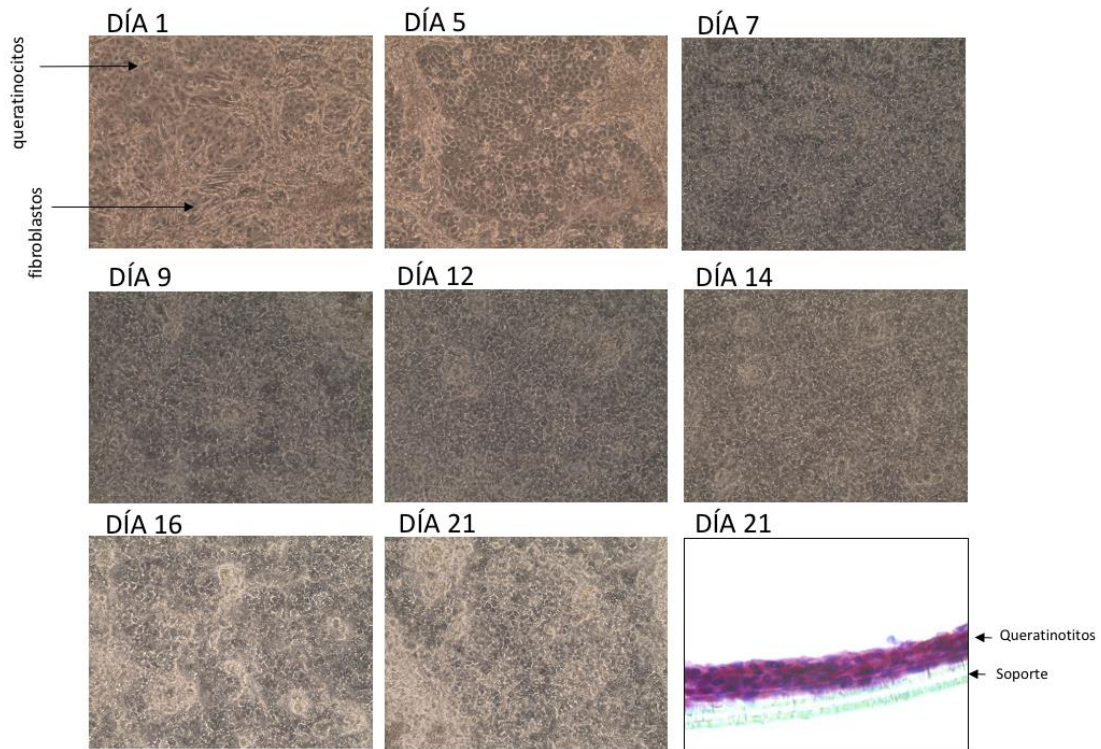
Los queratinocitos se fueron adhiriendo sobre el *insert* en los huecos que dejaban los fibroblastos. En este momento, se utilizó medio de cultivo *KBM-Gold keratinocyte Basal Medium* (medio de cultivo + suplementos), y se mantuvo durante 4-5 días hasta que se formó una monocapa de células. A partir de la formación de la monocapa celular, se quitó el medio de la parte de arriba del *insert*, dejando la capa apical del cultivo expuesta al aire, y quedando la parte basal en contacto con el medio de cultivo. El cultivo se mantuvo en incubación durante 21 días, cambiando el medio cada dos días, obteniéndose así la formación de un epitelio cutáneo pseudoestratificado. Este proceso de formación del modelo se muestra de manera esquemática en el diagrama de la **Figura 11**.



**Figura 11. Esquema del proceso de obtención de un cultivo 3D de epidermis basado en fibroblastos primarios de ratón y queratinocitos primarios de humano.** Los fibroblastos se siembran sobre la base del *insert* y tras dos días de cultivo son irradiados con luz UV. Los queratinocitos se siembran y crecen sobre los fibroblastos de manera que cuando hayan formado una monocapa celular se les retira el medio de la parte apical y se incuba 21 días. Creado con BioRender.

El seguimiento de la obtención del modelo 3D de epidermis se realizó mediante microscopía en campo claro tomando distintas fotografías a 20x, teniendo en cuenta las particularidades de la morfología de los queratinocitos y fibroblastos. Para ello se utilizó el microscopio *Leica DM6000B* (Leica Biosystems; Wetzlar, Germany) con su correspondiente software. Una vez alcanzada la maduración del modelo 3D de epidermis, se realizaron cortes histológicos y una posterior tinción hematoxilina-eosina de los *inserts* incluidos en parafina, para así poder visualizar su formación.

El seguimiento de la formación del cultivo 3D de epidermis, desde la deposición de los queratinocitos sobre los fibroblastos hasta el crecimiento final de los queratinocitos en capas, y obtención del modelo 3D de epidermis puede observarse en la **Figura 12**.



**Figura 12. Seguimiento del desarrollo del cultivo 3D de epidermis, imágenes en campo claro x20, durante 21 días, e histología con tinción hematoxilina-eosina del modelo 3D formado a día 21.** En los días 1, 5 y 7 pueden observarse las distintas morfologías celulares de queratinocitos (formas más redondeadas) y fibroblastos (formas alargadas), desapareciendo de la imagen estos últimos a medida que avanzan los días (días 9, 12, 14, 16). Por último, el día 21 solo se observan prácticamente queratinocitos en el cultivo. La última imagen (abajo a la derecha) muestra el corte transversal del soporte con el cultivo, tras una tinción clásica hematoxilina-eosina, en la que se pueden observar las distintas capas del epitelio formadas por los queratinocitos.

### 3.2.4 Condiciones experimentales *in vitro*

Las células fueron cultivadas de manera rutinaria hasta alcanzar el 70-80% de confluencia. En ese momento, se tripsinizaron y se pasaron a placas petri, placas de 6 o 96 pocillos o a placas de inmunoensayo, dependiendo de la técnica a analizar. Los ensayos se realizaron por triplicado. Una vez alcanzada una confluencia del 60-70%, se procedió al ensayo experimental. En la mayoría de experimentos, primero se administraron los fármacos a la concentración que se indica en la **Tabla 2**. Tras media hora, las células fueron estimuladas con TFGβ1 10 ng/ml. Una vez finalizado el tiempo de incubación, que osciló entre 30 minutos y 72 h, se realizaron los siguientes estudios: expresión genética por RT-PCR, expresión proteica por western blot, proliferación, co-inmunoprecipitación, actividad de Nrf2, generación de ERO y senescencia. En el caso

de los experimentos donde primero se indujo la TEM o la TFM, las células se incubaron 24 h con TFGβ1 10 ng/ml y posteriormente fueron tratadas con roflumilast 100 nM otras 24 h.

**Tabla 2. Fármacos utilizados y sus concentraciones**

Fármaco	Concentración
Roflumilast	100 nM
SIS3	10 μM
PD98059	10 μM
KT5720	2 μM
NAC	1 mM
Sanguinerine	3 μM
Obacunona	100 μM

En general, las soluciones madre de los compuestos de ensayo y de referencia se prepararon a una concentración de 10mM en DMSO, salvo en el caso de NAC, donde la solución madre se preparó en el medio de cultivo correspondiente para cada tipo celular. Las diluciones adicionales se prepararon con el vehículo utilizado para el ensayo experimental, de modo que, cada compuesto presentó su dosis especificada en la **Tabla 2**.

Las concentraciones de los fármacos fueron establecidas en base a sus concentraciones inhibitorias 50 (CI50) (120–125).

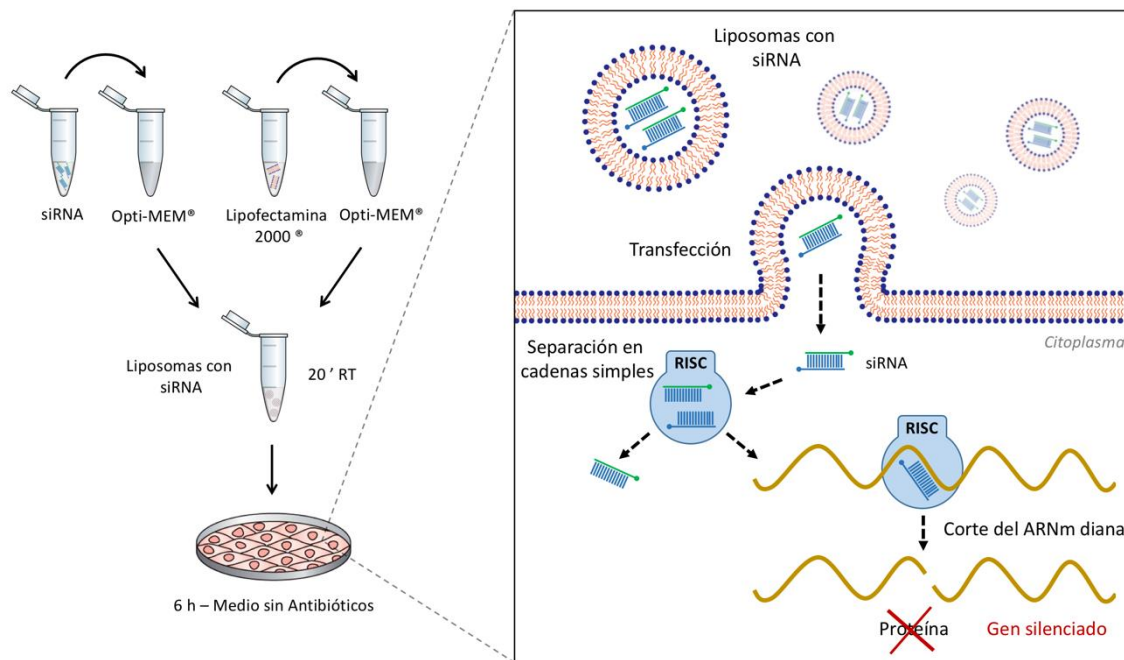
### 3.2.5 Silenciamiento de PDE4B

El ARN pequeño de interferencia (ARNsi) es un tipo de molécula de ARN bicatenario, de 20-25 pares de bases, que interfiere con la expresión de genes

específicos por complementariedad de secuencia con el ARNm después de la transcripción. De esta manera, se evita la traducción de proteínas. El ARNsi se une al complejo proteico de silenciamiento-inducido por ARN (RISC). RISC separa las hebras del ARNsi y utiliza la hebra anti-sentido como guía para reclutar la molécula del ARNm que presenta la secuencia complementaria (ARNm blanco). Cuando el ARNm se une, este se escinde inhibiendo así la traducción de la proteína correspondiente.

Para que el ARNsi penetrase en la célula, se generaron liposomas capaces de fusionarse con la membrana plasmática. Primero se prepararon dos soluciones: una solución que contiene el ARNsi (50  $\mu$ M) diluido en Opti-MEM y una solución que contiene lipofectamina diluida en Opti-MEM. Ambas soluciones se incubaron por separado durante 5 minutos y posteriormente se mezclaron e incubaron juntas otros 20 minutos, todo a temperatura ambiente. Se añadió la mezcla a los cultivos celulares de forma que, la concentración final de ARNsi en la muestra era de 50 nM y la de lipofectamina 2  $\mu$ g/ml en medio libre de antibióticos y con un 0,1% de FBS (**Figura 13**).

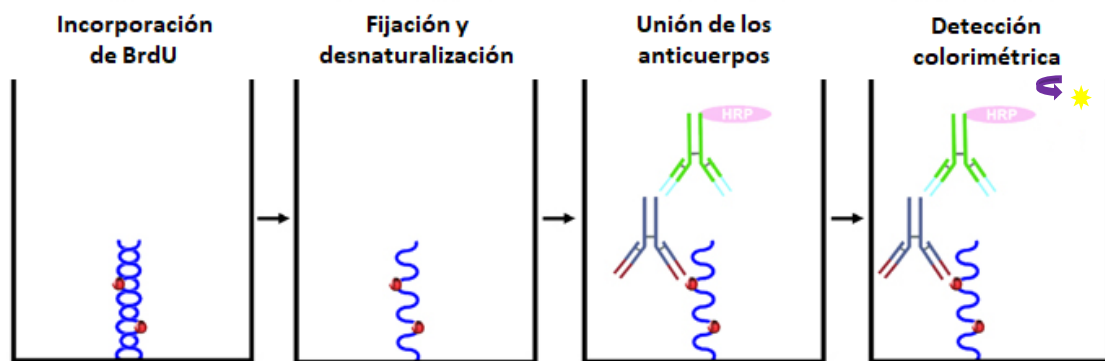




**Figura 13. Silenciamiento génico mediante ARN interferente.** En el lado izquierdo se ilustra el protocolo para generar liposomas con ARNs<sub>i</sub> mediante Lipofectamina 2000<sup>®</sup>. Cuando se cultivan las células en presencia de estos liposomas (cuadro derecho) sus cubiertas lipídicas se 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 ARNs<sub>i</sub> y utiliza la hebra antisentido como guía para seleccionar el ARNm complementario de la hebra de ARNs<sub>i</sub> presente en el complejo. Finalmente, RISC promueve el corte y posterior destrucción del ARNm diana, provocando la supresión de la expresión del gen.

### 3.2.6 Ensayo de proliferación

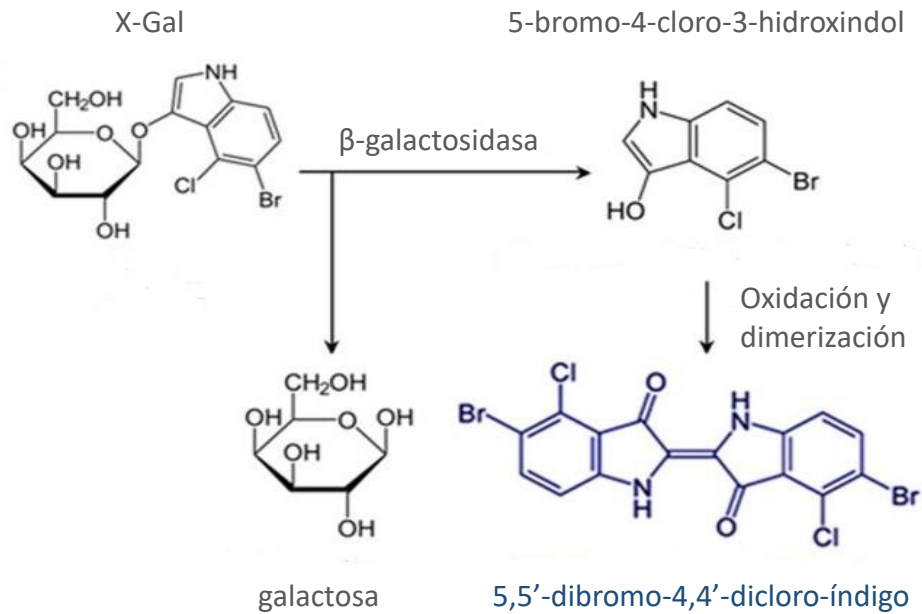
Para el ensayo de proliferación de fibroblastos silenciados para PDE4B o tratados con roflumilast se usó el kit *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)*. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos. 24 h después de haber sido tratadas y estimuladas, o silenciadas y estimuladas, se añadió BrdU. BrdU es un análogo de la timidina, y se incorpora al ADN de las células que están en proliferación. Transcurridas las 24 h desde que se añadió la sonda BrdU, se aspiró el medio y se añadió solución FixDenat. Se dejó incubar 45 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se retiró la solución FixDenat y se añadió un anticuerpo dirigido contra BrdU. Se incubó 90 min a temperatura ambiente. Después, se hicieron tres lavados con PBS 1x y se añadió el sustrato. Tras 5-30 min de incubación se paró la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M y se midió la absorbancia a 450 nm, con una longitud de referencia de 690 nm, en el espectrofotómetro (Infinite M200, Tecan Group Ltd.; Männedorf, Switzerland) (**Figura 14**).



**Figura 14. Esquema del ensayo de proliferación brdU.** El análogo de la timidina, brdU, se incorpora en el ADN durante la replicación. Una vez retirado el medio, las células se fijan y el ADN se desnaturaliza simultáneamente. Se agrega un anticuerpo monoclonal de ratón anti-brdU seguido de un anticuerpo secundario conjugado con HRP. La absorbancia es proporcional al brdU incorporado y puede correlacionarse directamente con la proliferación celular.

### 3.2.7 Senescencia

Para el estudio de la senescencia *in vitro* se usó el kit *Senescence Cells Histochemical Staining Kit*. Este kit se basa en detectar la actividad  $\beta$ -galactosidasa a pH 6 ya que solo está presente en células senescentes. La enzima  $\beta$ -galactosidasa hidroliza el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido (X-Gal) en galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol. Este último se oxida y dimeriza dando lugar al 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo que forma un precipitado de color azul (**Figura 15**).

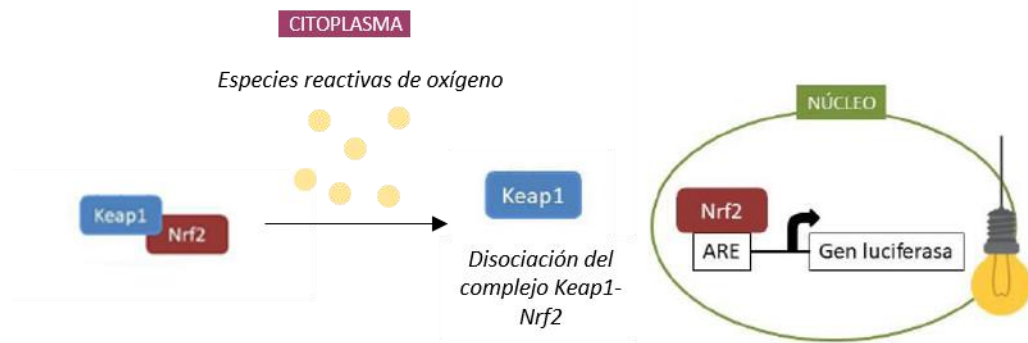


**Figura 15:** Reacción colorimétrica inducida por la enzima  $\beta$ -galactosidasa en la que el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido (X-gal) se divide en galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol dando lugar este último al 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo que produce una coloración azul.

Las células se sembraron en placas de inmunoensayo y fueron estimuladas con TGF $\beta$ 1 y tratadas con roflumilast durante 72 h. Tras aspirar el medio y hacer dos lavados con PBS 1x, las células se fijaron con solución de fijación 1x durante 7 min a temperatura ambiente. A continuación, y después de otros tres lavados, se añadió la mezcla de tinción y se incubó *over night* a 37°C. Finalmente, las células se observaron en un microscopio Leica DM6000B y se contaron las células teñidas de azul y el número total de células en cada campo. Los resultados se expresaron como % de células senescentes (células azules positivas para  $\beta$ -galactosidasa/número total de células en cada campo).

### 3.2.8 KeratinoSens

Keratinosens, es una línea celular de queratinocitos transfectada con el gen de la luciferasa, bajo el control transcripcional de un promotor constitutivo fusionado con la secuencia ARE. Nrf2 se encuentra en el citoplasma de las células en su forma inactiva unido a Keap1. En presencia de ERO, esta unión se rompe y Nrf2 viaja al núcleo para promover la transcripción de los genes asociados a la secuencia genética ARE (**Figura 16**).

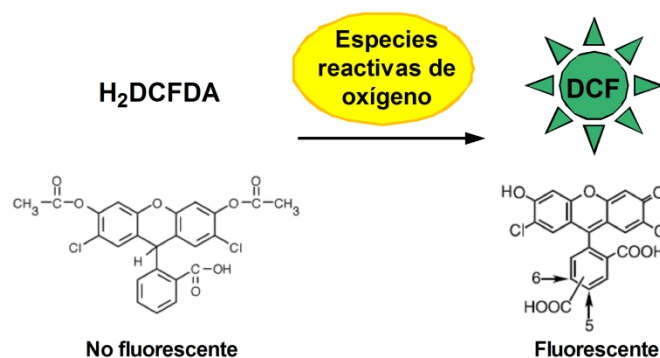


**Figura 16: Inducción de la expresión de la luciferasa en la línea celular keratinoSens.** KeratinoSens es una línea celular transfectada con el gen de la luciferasa y un promotor constitutivo fusionado con el *Antioxidant Response Element* (ARE). El factor transcripcional *nuclear erythroid factor 2* (Nrf2) se encuentra unido a Keap1, y por lo tanto inactivado, en el citoplasma de las células. En presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO) esta unión se rompe y Nrf2 es capaz de viajar hasta el núcleo y provocar la transcripción de los genes regulados por el ARE, además de, en esta línea celular, la luciferasa.

Las células se sembraron en placas opacas de 96 pocillos, se estimularon con TGFβ1 y se trataron con roflumilast u Obacunona durante 48h. A continuación, se eliminó el medio y tras tres lavados con DPBS se añadieron 20 µl de solución de lisis 1x e incubaron durante 20 min. Transcurrido ese tiempo se añadieron 50 µl de sustrato y se midió la luminiscencia en el luminómetro (LUMIstar Omega, BMG Labtech). Los resultados se expresaron como la inducción de la actividad luciferasa máxima (Imáx) (lectura de la luminiscencia de la condición experimental en estudio/lectura de la luminiscencia del control negativo).

### 3.2.9 Fluorescencia por DCF de especies reactivas de oxígeno

El 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H2DCF-DA), es un indicador de ERO ya que, en presencia de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , sufre un proceso de hidrólisis y oxidación dando lugar a un compuesto fluorescente, el 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (**Figura 17**).



**Figura 17: Reacción del 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCF-DA) a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF).** El H<sub>2</sub>DCF-DA se hidroliza y oxida en presencia de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dando lugar al DCF, compuesto fluorescente, por lo que sirve para monitorizar la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO).

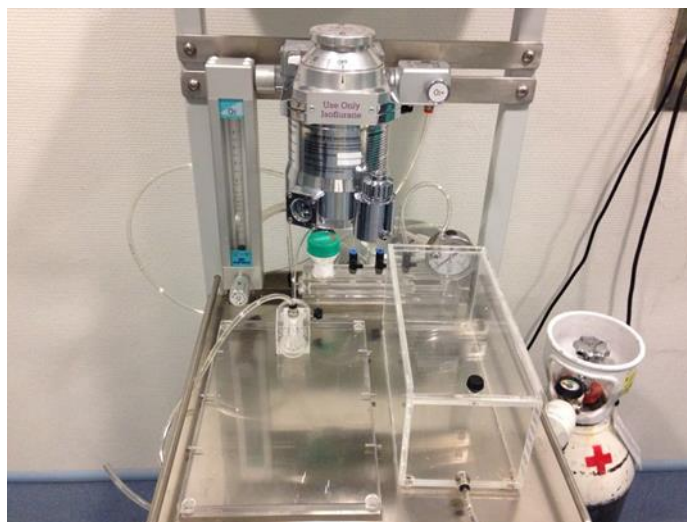
Las células se lavaron con PBS 1x y se incubaron durante 30 minutos con H<sub>2</sub>DCF-DA 50 μM, diluída en Opti-MEM, en presencia o ausencia de roflumilast. A continuación, y tras otro lavado para eliminar los restos de sonda que no habían penetrado en las células, estas se estimularon durante otros 30 minutos con TGFβ<sub>1</sub>, de nuevo, en presencia o ausencia de roflumilast.

Para cuantificar los niveles intracelulares de ERO, se midió la intensidad de fluorescencia en cinco campos por condición, seleccionados al azar, utilizando el microscopio Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Tokio, Japón). La captura y análisis de las imágenes se realizó utilizando el software Metafluor® 5.0 (Analytical Technologies, EEUU). Los resultados se expresaron como fluorescencia de DCF en unidades de fluorescencia relativa (UFR).

### 3.2.10 Modelo animal

El modelo animal de esclerosis sistémica se generó mediante la administración subcutánea de ácido hipocloroso (HOCL) (126). El objetivo de este estudio era observar la respuesta al tratamiento con roflumilast en un modelo de ratón mediante tomografía computarizada (TC), histología, y análisis de expresión génica y proteica.

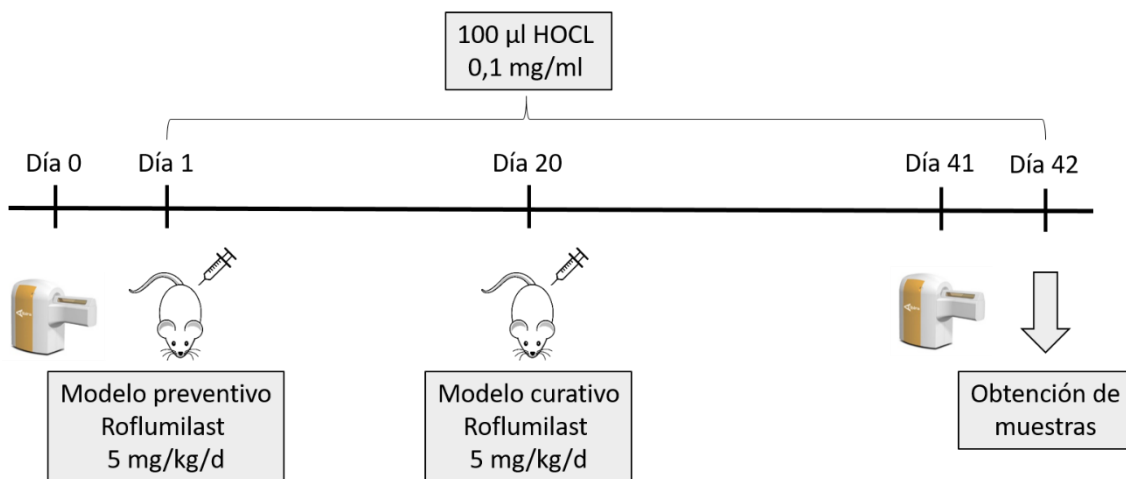
Se utilizaron 24 ratones machos divididos en tres grupos homogéneos (n=8): control, HOCL y roflumilast/HOCL. El procedimiento comenzó con la adquisición de imágenes TC a fin de determinar el estado óptimo de la piel previa al procedimiento. Para ello, los animales fueron anestesiados con isoflurano (Aerrane®) al 5% por vía inhalatoria. El isoflurano es un éter halogenado usado como anestésico inhalatorio. Los ratones se situaron dentro de una cámara estanca con entrada de oxígeno y una atmósfera de Isoflurano al 5% generada por un vaporizador (Harvard Apparatus) (Figura 18), tras unos minutos los animales quedaban dormidos.



**Figura 18: vaporizador de anestesia y cámara estanca.**

Tras 24 horas, se comenzó el procedimiento mediante la administración subcutánea de 100  $\mu$ l de HOCl/SSF (Suero salino fisiológico 0,9%) 0,1 mg/ml cada día durante 6 semanas. El HOCl se generó añadiendo 166  $\mu$ l de solución de hipoclorito de sodio (NaClO) (2,6% como cloro activo) a 11,1 ml de solución de fosfato dipotásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (100 mM, pH 7,2). A los animales del grupo control se les administró diariamente 100  $\mu$ l de SSF 0,9%. Para minimizar el sufrimiento de los sujetos las administraciones se realizan bajo cuadro anestésico con Isoflurano como se ha descrito anteriormente. En el caso del tratamiento preventivo, roflumilast se administró desde el día 1, en cambio, para el tratamiento curativo, el fármaco se empezó a administrar una vez instaurada la fibrosis cutánea (día 20). Roflumilast se administró por vía oral, por sonda a 5 mg/kg/d. El último día se procedió a la toma de imágenes mediante TC. Los animales fueron sacrificados por la administración intraperitoneal de pentobarbital

35 mg/kg. Se tomaron muestras de piel que fueron divididas en fragmentos para aislamiento de ARN, proteína, medición de hidroxiprolina y fijación en formaldehído para histología (**Figura 19**).



**Figura 19: Esquema del procedimiento llevado a cabo con el modelo animal.** Toma de imágenes de tomografía computarizada (TC) a día 0 y 41, administración diaria desde el día 1 por vía subcutánea de ácido hipocloroso (HOCL), administración diaria de roflumilast desde el día 1 para el modelo preventivo y desde el día 20 para el modelo curativo, sacrificio y toma de muestras a día 42.

### 3.2.11 Adquisición TC

La adquisición de las imágenes se realizó mediante el sistema multimodal micro-PET/SPECT/CT (Albira II de Oncovisión S.A.). Para los estudios programados se empleó la modalidad TC según se detalla a continuación.

Se anestesiaron los sujetos con isoflurano 5% vía inhalatoria. El objetivo era mantener a los ratones anestesiados e inmóviles durante la toma de imágenes de TC. A continuación, el sujeto se colocó en decúbito prono en la camilla de ratón estándar del Albira II® (**Figura 20**), equipo multimodal de adquisición micro-PET/SPECT/CT. Todos los ratones fueron sometidos a la prueba de TC a día 0 y 41.



**Figura 20. Equipo microPET/SPECT/CT Albira II® de Oncovisión S.A.**

Una vez finalizadas las adquisiciones, los ratones fueron retirados de la camilla y estabulados bajo observación.

### 3.2.12 Adquisición de imágenes

Las adquisiciones de imágenes de TC se realizaron con un offset de 10 mm de longitud para visualizar la región cutánea. La adquisición mediante TC se realizó con buena calidad de adquisición, dosis alta ( $400\mu\text{A}$ ) y voltaje alto (45Kv) con la modalidad de adquisición Step&Shoot y algoritmo de reconstrucción FBP (Filtered Back Projection). Las imágenes fueron reconstruidas mediante el algoritmo OSEM Cross con un número de iteraciones de 3 utilizando los parámetros de reconstrucción estándar del Albira Suite 5.0 Reconstructor.

El procesado y análisis de las imágenes de alta calidad de TC se empleó para ensayos densitométricos de la región cutánea.

### 3.2.13 Análisis de imágenes

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

Se determinaron volúmenes de interés (VOI) de la región cutánea. El VOI fue analizado para cada sujeto para sus distintos días de adquisición. Se calculó la media de Unidades Hounsfield (HU) por unidad de pixel.



### 3.2.14 Toma de muestras

Una vez transcurridas 20-24 horas de la toma de imágenes TC, se procedió al sacrificio de los animales mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital 35 mg/kg.

Se tomaron muestras de piel para estudios histológicos, la cuantificación de hidroxiprolina y para el análisis de la expresión génica y proteica, por lo que se fijó el tejido en una solución de formaldehído 3.7-4% en el primer caso y por otro lado se diseccionó y almacenó en viales de 1 ml con RNAlater® para la posterior extracción de ARN o en seco para la extracción de proteínas y la cuantificación de hidroxiprolina. Los viales con RNAlater® se congelaron a -20°C, mientras que las muestras en seco se congelaron con nitrógeno líquido y fueron posteriormente almacenadas a -80°C hasta el día del análisis.

### 3.2.15 Hidroxiprolina

La hidroxiprolina es un aminoácido que forma parte casi exclusivamente del Col y que sirve para estabilizar su estructura helicoidal, por lo que su medición sirve como indicador de la concentración de Col. El *Hydroxyproline Assay Kit* se basa en la reacción de la hidroxiprolina oxidada con el 4-(dimetilamino)benzaldehído (DMAB) que da como resultado un compuesto colorimétrico.

Se pesaron 10 mg de tejido y tras la adición de 100 µl de agua se trituraron en el TissueLyser II (Qiagen®). A continuación, se añadieron 100 µl de ácido clorhídrico y las muestras se incubaron durante 3 h a 120°C. Luego, los eppendorfs se centrifugaron durante 3 min a 10000 x g. Se transfirieron 25 µl a una placa de 96 pocillos y se dejó secar en una estufa a 60°C. Después, se añadieron 100 µl del buffer de oxidación y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Por último, se añadieron 100 µl del reactivo DMAB diluido y tras una incubación de 90 min a 60°C se midió la absorbancia a 560 nm, con un lector espectrofotométrico de placas Infinite M200 (Tecan Group Ltd.; Männedorf, Switzerland).

### 3.2.16 Análisis de la expresión proteica mediante western blot

Se llevó a cabo la técnica western blot para determinar cambios en la expresión proteica en piel de ratón y cultivos celulares.

En el caso del tejido que estaba almacenado en seco a  $-80^{\circ}\text{C}$  este se homogenizó con el sistema Tissuelyser II (Qiagen®) en presencia de 500  $\mu\text{l}$  de un tampón de lisis que comprende un cóctel inhibidor de proteasas completo, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y buffer C (0.02M HEPES; 0.001M EDTA; 0.001M EGTA; 0.4M NaCl y 21.1% glicerol).

Las células se sembraron en placas petri y fueron estimuladas con TGF $\beta$ 1 y tratadas con roflumilast, sanguinerine, SIS3, PD98059, NAC, KT5720 y sus combinaciones, o silenciadas para PDE4B, durante 30 min o 48 h y, tras eliminar el medio, se recogieron con el mismo tampón de lisis.

A continuación, se procedió a la extracción de proteínas de todas las muestras. Para ello, se sometió a las muestras a un choque térmico pasándolas tres veces por nitrógeno líquido y a continuación a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación. Luego, se añadió Nonidet™ P40 1% y se incubó 15 min en hielo y agitación. Por último, se centrifugaron las muestras (1000 g, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) y se recogió el sobrenadante y se cuantificó el nivel de proteína utilizando el kit *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*. Este kit se basa en la reacción de Buriel, donde las proteínas reducen el  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  en medio alcalino. El ácido bicinconínico (BCA) forma un complejo púrpura intenso en presencia de iones  $\text{Cu}^{1+}$  proporcional a la concentración de proteínas en la muestra y que medimos por espectrofotometría a 562 nm. Gracias a una curva patrón con BSA obtenemos la concentración de proteínas.

Se prepararon los extractos proteicos con Laemmli buffer y buffer C y se incubó 10 min a  $95^{\circ}\text{C}$  para favorecer la desnaturalización de proteínas. Se cargaron 12  $\mu\text{g}$  de proteína en geles de acrilamida 4-20% junto con un marcador de peso molecular. Se dejó correr 30 min a 90 V y a continuación otros 30 min a 300 V. Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,2  $\mu\text{m}$  utilizando el sistema Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories). Luego, se bloqueó la membrana con BSA 5% en PBS tween 0.1% durante 1 h, y se dejó

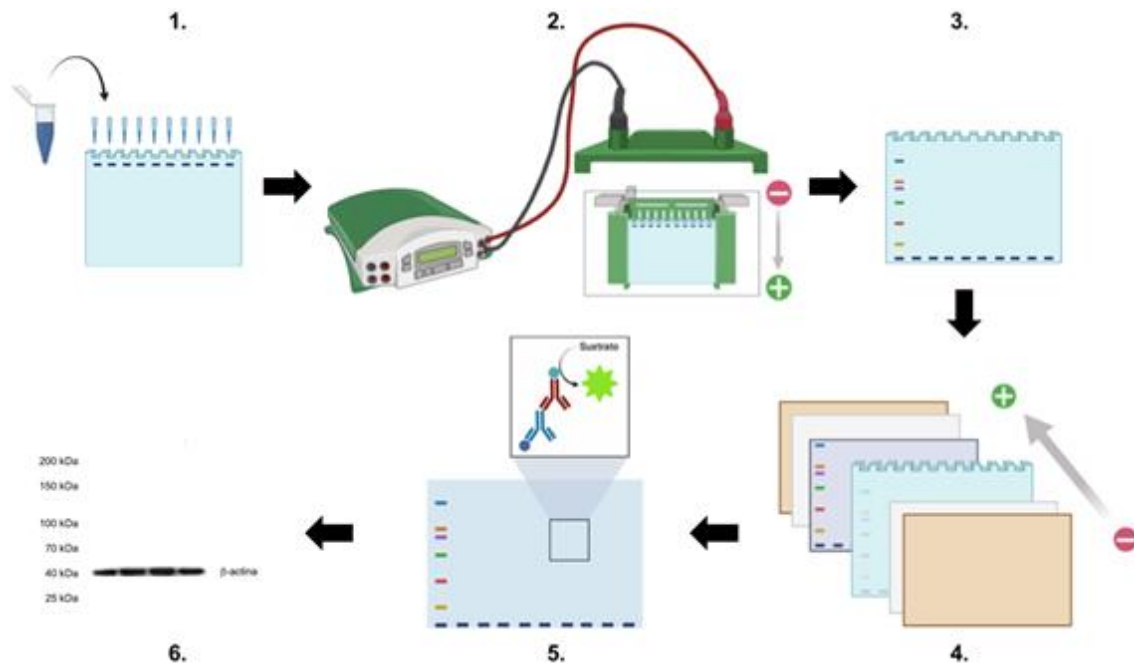
incubar con el anticuerpo correspondiente diluido BSA 5% a 4°C *over night* (**Tabla 3**). Al día siguiente, y tras varios lavados con PBS tween 0.1% se añadió el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y se dejó incubar 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se detectó la expresión proteica por quimioluminiscencia mediante los reactivos *GE Healthcare Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent*. La densitometría de las películas se realizó utilizando el software Image J (disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, EE. UU.). Los resultados se expresaron como ratios respecto a controles endógenos de  $\beta$ -Actina. Se puede observar un esquema de la técnica western blot en la **Figura 21**.

**Tabla 3** Anticuerpos utilizados en el ensayo de western blot.

<b>Epítipo</b>	<b>Origen</b>	<b>Dilución</b>	<b>Referencia</b>
<b>Calponina</b>	conejo	1:1000	biorbyt (orb37026)
<b>Colágeno tipo I (Col tipo I)</b>	conejo	1:1000	Novus (NB600-408)
<b>E-cadherina</b>	ratón	1:1000	ECM BioScience (CM1681)
<b>Factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF)</b>	cabra	1:200	Santa cruz biotechnology (sc-34772)
<b>Fibronectina</b>	conejo	1:1000	Invitrogen (PA5-29578)
<b>Fosfodiesterasa 4 B2 (PDE4B2)</b>	conejo	1:1000	Sigma-Aldrich (ABS181)
<b>Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 4 (NOX4)</b>	conejo	1:1000	Novus (NB110-58849)

<b>p21</b>	conejo	1:1000	Novus Biologicals (NB100-1941)
<b>Phospho- ERK1/ERK2 (Thr202, Tyr204)</b>	conejo	1:1000	Invitrogen (MA5-1513)
<b>Phospho-PDE4D ERK site Antibody</b>	conejo	1:250	FabGennix (PPD4-450AP)
<b>PPM1A</b>	conejo	1:1000	Cell signaling (3549S)
<b>Proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina (IGFBP3)</b>	conejo	1:1000	biorbyt (orb10884)
<b>Proteína activadora de fibroblastos (FAP)</b>	conejo	1:1000	Invitrogen (PA5-27773)
<b>Proteína inhibidora del activador del plasminógeno 1 (PAI-1)</b>	conejo	1:1000	Biorbyt (orb303829)
<b>Smad3 [p Ser423, p Ser425]</b>	conejo	1:2000	Novus Biologicals (NBP1-77836)
<b><math>\alpha</math>-actina de músculo liso (<math>\alpha</math>-SMA)</b>	ratón	1:1000	Sigma-Aldrich (A5228)
<b><math>\beta</math>-actina</b>	ratón	1:2000	Sigma-Aldrich (A5441)

<b>HRP - IgG (H+L)</b> <b>Ratón</b>	burro	1:5000	Invitrogen (SA1-100)
<b>HRP - IgG (H+L)</b> <b>Cabra</b>	burro	1:5000	Invitrogen (PA1-28664)
<b>HRP - IgG (H+L)</b> <b>Conejo</b>	burro	1:5000	Invitrogen (SA1-200)



**Figura 21. Esquema de la técnica Western Blot.** 1. Carga de las muestras y del marcador de peso molecular. 2. Separación de las proteínas en gel de acrilamida-SDS. 3. Tras la electroforesis las muestras quedan separadas a lo largo del gel, incluido el marcador. 4. Transferencia de las proteínas desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa. 5. Incubación de la membrana con anticuerpo primario, anticuerpo secundario y reacción de quimioluminiscencia. 6. Revelado de la quimioluminiscencia para visualizar la banda donde se encuentra la proteína de interés. Creado con BioRender.

### 3.2.17 Análisis de la expresión génica mediante PCR

Para la detección de la variación en la expresión génica en piel de ratón, cultivos celulares y tejido queloide e hipertrófico vs sano de humano se utilizó la técnica qPCR.

Se homogenizó el tejido, que estaba almacenado con RNAlater a  $-20^{\circ}\text{C}$ , con el sistema TissueLyser II (Qiagen®) en presencia de 500  $\mu\text{l}$  de TriPure®. En el caso de las células, estas se sembraron en placas de 6 pocillos y se estimularon con TGF $\beta$ 1 y se

trataron con roflumilast durante 48 h. Tras eliminar el medio, las células se recogieron con 300 µl de TriPure®.

A continuación, y para todas las muestras, se añadieron 100 µl de cloroformo y se centrifugó (12000 rpm, 4°C, 15 min) de tal manera que se obtuvieron dos fases: una fase acuosa que contenía el ARN y otra orgánica que contenía el ADN y proteínas. Se recogió la fase acuosa y se añadieron 250 µl de alcohol isopropílico y 1 µl de glicógeno para precipitar el ARN. Se incubó en hielo durante 10 min. Tras una centrifugación (12000 rpm, 4°C, 10 min) se descartó el sobrenadante y se hizo un lavado con alcohol 75%. Después de otra centrifugación (7500 rpm, 4°C, 5 min), y de incubar las muestras a 37°C durante 30 min para permitir que los restos de etanol se evaporen, el pellet de resuspendió con 20 µl de agua DEPC. Para que el ARN se disolviese bien en el agua DEPC, se incubó 5 min a 65 °C.

El ARN extraído se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop 2000C (ThermoFisher Scientific). Este sistema permitió determinar la concentración del ARN total (ng/ml) además del valor de la pureza de las muestras, determinado por el ratio A260/A280. La concentración de ARN para la reacción de transcripción inversa fue de 300ng/pocillo y se utilizó el kit de reactivos de transcripción inversa TaqMan. Esta reacción en la que el ARN se retrotranscribió al ADNc se realizó en el termociclador Veriti™96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación selectiva de una región de ADN de interés utilizando oligonucleótidos como cebadores. Los cebadores se unen específicamente a secuencias que flanquean la región que se pretende amplificar. Para ello se utilizaron sondas de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems), que son mezclas pre-formuladas de sondas y cebadores específicos para el gen de interés marcadas con fluorocromos (**Tabla 4**).

**Tabla 4** Sondas de expresión génica TaqMan® utilizados en la qPCR

Gen	ID
Actina (ACTA1)	Hs00559403_m1

<b>Cadherina 1</b> <b>(CDH1)</b>	Hs01023894_m1
<b>Colágeno tipo I alfa 1</b> <b>(COL1A1)</b>	Hs00164004_m1
<b>Factor de crecimiento del tejido</b> <b>conectivo</b> <b>(CTGF)</b>	Hs00170014_m1
<b>Factor de crecimiento transformante</b> <b>beta 1</b> <b>(TGFβ1)</b>	Hs00171257_m1
<b>Fibronectina 1</b> <b>(FN1)</b>	Hs01549976_m1
<b>Fosfodiesterasa 4 A</b> <b>(PDE4A)</b>	Hs00183479_m1
<b>Fosfodiesterasa 4 B</b> <b>(PDE4B)</b>	Hs00387320_m1
<b>Fosfodiesterasa 4 C</b> <b>(PDE4C)</b>	Hs00971865_m1
<b>Fosfodiesterasa 4 D</b> <b>(PDE4D)</b>	Hs00174805_m1
<b>p21</b>	Hs01040810_m1
<b>Proteína de unión estrecha 1</b> <b>(TJP1)</b>	Hs01551861_m1
<b>Colágeno tipo I alfa 1</b> <b>(COL1A1)</b>	Mm00801666_g1
<b>Factor de crecimiento del tejido</b> <b>conectivo</b> <b>(CTGF)</b>	Mm01192933_g1
<b>Factor de crecimiento transformante</b> <b>beta 1</b> <b>(TGFβ1)</b>	Mm01178820_m1

<b>Beta actina (ACTB)</b>	Hs01060665_g1
<b>Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH)</b>	Hs02786624_g1
<b>Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH)</b>	Mm99999915_g1

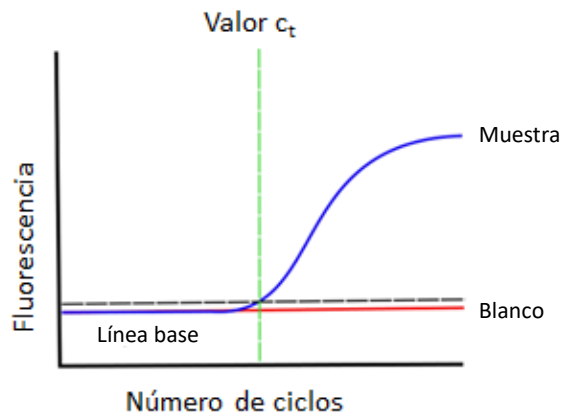
La qPCR se desarrolló en el termociclador *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) usando TaqMan® Gene Expression Master Mix. Cada reacción de PCR contenía los componentes indicados en la **tabla 5**.

**Tabla 5: Componentes de la PCR.**

<b>Componente</b>	<b>Volumen (µl)</b>
<b>ADNc</b>	2
<b>TaqMan® Gene Expression Master Mix</b>	2,5
<b>Sonda TaqMan®</b>	0,25
<b>Agua dietilpirocarbonato (DEPC)</b>	0,25

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* en inglés. El *threshold* es el nivel determinado automáticamente o manualmente y fijado en la región exponencial de la gráfica de amplificación generada, por encima de esta línea el nivel de fluorescencia se considera significativamente superior a la fluorescencia basal (**Figura 22**).





**Figura 22. Valor del ciclo umbral (Ct) en una curva de amplificación por PCR a tiempo real.** El instrumento de PCR recogerá datos de fluorescencia durante cada ciclo. Esto aparecerá en un principio como una línea recta a partir del punto del ciclo cero. El ciclo umbral estará justo por encima de esta línea, en el punto donde la fluorescencia comienza a pasar a la fase exponencial.

La cuantificación relativa de los distintos genes se realizó comparando sus Ct con el del control endógeno  $\beta$ -actina/GADPH. El nivel de expresión génica se calculó después como la diferencia ( $\Delta$ Ct) entre el valor Ct del gen de interés y el valor Ct del control endógeno. Los cambios en la expresión de los distintos genes de interés se representaron como  $2^{-\Delta$ Ct}.

### 3.2.18 Co-inmunoprecipitación

Para la co-IP de PDE4B y pERK1/2 del modelo animal y de los experimentos con NHDF y NHEK se usó el kit de co-inmunoprecipitación Pierce™.

Primero, se añadió resina a las columnas y a continuación 10  $\mu$ g de anticuerpo. Después de incubar durante 90 min en un rotador y a temperatura ambiente, se centrifugó en tubos de recolección y se descartó el flujo. Por otro lado, se prepararon los extractos de proteína. Para ello, se hizo un prelavado con *Control Agarose Resin*. A partir de este momento se trabajó en frío. El extracto de proteínas, 300  $\mu$ g, se añadió a las columnas que contenían la resina y el anticuerpo. Se incubó *over night* en el rotador. Al día siguiente, se realizaron tres lavados y a continuación la elución. Se añadieron 10  $\mu$ l de tampón de elución y se centrifugó. Luego, se añadieron 50  $\mu$ l más y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Por último, se centrifugó y se guardó el flujo, donde se encontrarían las proteínas co-inmunoprecipitadas.

Para el análisis de la co-inmunoprecipitación se realizó la técnica western blot.

### 3.2.19 Histología

#### 3.2.19.1 Fijación y deshidratación del tejido

El tejido cutáneo, de origen humano y de ratón, así como los *inserts* del modelo 3D, fueron fijados con paraformaldehído al 3,7-4% durante 24 h. A continuación, las muestras se incluyeron en cassetes de inclusión, se rotularon con lápiz y se deshidrataron (**Tabla 6**). Seguidamente, los tejidos se incorporaron en bloques de parafina utilizando el embebedor de parafina EC350-1 Myr (Leica Geosystems, Heerbrugg, Suiza). Finalmente, los bloques obtenidos se cortaron en secciones de 5  $\mu$ m de grosor utilizando el microtomo HM 340 E (Leica Geosystems, Heerbrugg, Suiza) y se adhirieron a portaobjetos, dejándose en secado a temperatura ambiente durante 48 h.

**Tabla 6. Protocolo de deshidratación**

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de repeticiones</b>
<b>Paraformaldehído 3,7-4%</b>	24 h	X1
<b>Etanol 70%</b>	60 min	X1
<b>Etanol 96%</b>	180 min	X1
<b>Etanol 96%</b>	90 min	X1
<b>Etanol 100%</b>	<i>Over night</i>	X1
<b>Xileno</b>	60 min	X2
<b>Parafina</b>	<i>Over night</i>	X1

#### 3.2.19.2 Inmunohistoquímica

Para el análisis inmunohistoquímico de  $\alpha$ -SMA en piel de ratón, en primer lugar, las secciones de tejido se desparafinaron e hidrataron (**Tabla 7**). A continuación, los portaobjetos se sumergieron en una cubeta con una solución de citrato 10 mM en un baño maría hirviendo durante 15 minutos para el desenmascaramiento antigénico. Después se atemperaron las muestras y se sumergieron en una cubeta con agua mili-Q durante 5 min. Para el bloqueo de la peroxidasa endógena se usó el bloqueo del kit

*master polymer plus detection system (peroxidase) (Incl. DAB Chromogen)*. Luego, se permeabilizó la membrana celular con tritón 100 al 0,1% en PBS a temperatura ambiente durante 10 min. Para el bloqueo de las uniones inespecíficas se usó BSA 5% en PBS que se incubó durante una hora a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Se preparó el anticuerpo primario diluido en 0,1% BSA/PBS y se dejó *overnight* a 4°C. Al día siguiente, se incubó con *Master Polymer Plus HRP* 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras el periodo de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS. Para el revelado de la inmunotinción se usó *DAB Chromogen concentrate* diluido en *DAB substrate Buffer*. Para parar la reacción se sumergieron los portaobjetos en una cubeta con agua mili-Q. Después, se sumergieron durante 1 min en Hematoxilina para diferenciar los componentes celulares. Tras 3 lavados se prosiguió con el protocolo de deshidratación (**Tabla 8**). Finalmente, se procedió al montaje añadiendo DPX sobre la muestra y el cubreobjetos.

Los cortes marcados fueron observados mediante el microscopio Nikon Eclipse TE200 (Tokyo, Japón).

**Tabla 7: Protocolo de desparafinado e hidratación del ensayo inmunohistoquímico.**

Tratamiento	Tiempo	Número de repeticiones
Estufa 60	15 min	X1
Xileno	10 min	X2
Etanol 100%	10 min	X1
Etanol 95%	10 min	X1
Etanol 70%	5 min	X1
Etanol 50%	5 min	X1
Agua	5 min	X1

**Tabla 8: Protocolo de deshidratación del ensayo inmunohistoquímico.**

Tratamiento	Tiempo	Número de repeticiones
Etanol 90%	5 min	X2
Etanol 100%	5 min	X2
Xileno	5 min	X2

### 3.2.19.3 Tinción hematoxilina-eosina

Para comprobar la integridad del tejido para las diferentes condiciones se realizó la tinción hematoxilina-eosina. Primero, se procedió al desparafinado e hidratación de las muestras (**Tabla 9**). A continuación, las muestras se metieron en una cubeta con hematoxilina (dilución 1:20) durante 3 min y rápidamente se lavaron con agua corriente abundante. Se dejaron 5 min en una cubeta con agua y después se pasaron por una cubeta que contenía agua con ácido clorhídrico al 37% hasta que el portaobjetos quedase limpio. Luego, las muestras se introdujeron en una solución de carbonato de litio saturado hasta observar un viraje a color violeta y acto seguido, se dejaron en una cubeta con eosina durante 2 min. Tras la deshidratación de las muestras (**Tabla 10**) se procedió al montaje de las mismas con DPX.

Las muestras se observaron mediante el microscopio Nikon Eclipse TE200 (Tokyo, Japón).

**Tabla 9: Protocolo de hidratación para la tinción hematoxilina-eosina.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de repeticiones</b>
<b>Xileno</b>	2 min	X3
<b>Etanol 100%</b>	2 min	X3
<b>Etanol 95%</b>	2 min	X1
<b>Etanol 70%</b>	2 min	X1
<b>Agua</b>	2 min	X1

**Tabla 10: Protocolo de deshidratación para la tinción hematoxilina-eosina.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de repeticiones</b>
<b>Etanol 96%</b>	1 segundo	X20
<b>Etanol 96%</b>	2 min	X1
<b>Etanol 100%</b>	2 min	X2
<b>Xileno</b>	2 min	X3

### 3.2.19.4 Co-inmunofluorescencia

Para la co-inmunofluorencia de pERK1/2 y  $\alpha$ -SMA, y de pERK1/2 y PDE4B, las secciones de tejido se desparafinaron e hidrataron (**Tabla 7**). A continuación, se procedió a la permeabilización con triton 100 0.1%/PBS que se dejó incubar 10 min a temperatura ambiente. Tras 3 lavados con PBS, los cortes de tejido se bloquearon con el kit *master polymer plus detection system (peroxidase) (Incl. DAB Chromogen)*. Seguidamente, se añadieron los anticuerpos primarios disueltos en 0.1% BSA/PBS (**Tabla 11**) que se dejaron incubar *over night* en cámara húmeda y a 4 °C. A partir de este momento se trabajó en oscuridad. Después de 3 lavados con PBS, se añadieron los anticuerpos secundarios diluidos en 0.1% BSA/PBS (**Tabla 11**) y se dejaron incubar 1 h a temperatura ambiente. De nuevo, se realizaron 3 lavados con PBS y a continuación, las muestras se incubaron 1 min con DAPI diluido en PBS. Finalmente, y tras otros 3 lavados con PBS, se montaron las muestras con DPX y se observaron con el microscopio confocal Leica TCS SP2.

**Tabla 11. Anticuerpos usados para el análisis de co-inmunofluorescencia.**

<b>Epitopo</b>	<b>Origen</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Referencia</b>	<b>Dilución</b>
<b>Fosfodiesterasa 4B (PDE4B)</b>	conejo	-	Invitrogen (10405073)	1:200
<b>Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 4 (NOX4)</b>	conejo	-	Novus (NB110-58849)	1:200
<b>Phospho-ERK1/2</b>	ratón	-	Sigma-Aldrich (M9692)	1:200
<b><math>\alpha</math>-actina de músculo liso (<math>\alpha</math>-SMA)</b>	ratón	-	Sigma-Aldrich (A5228)	1:200

<b>IgG (H+L) ratón</b>	cabra	Alexa Fluor® 488	Invitrogen (A-11001)	1:200
<b>IgG (H+L) conejo</b>	burro	Alexa Fluor® 555	Invitrogen (A-31572)	1:200

### 3.2.20 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se resolvió mediante análisis paramétricos. Un  $P < 0.05$  fue considerado significativo. Los resultados de los experimentos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar de la media (SEM) de n experimentos. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni.







## **4 RESULTADOS**

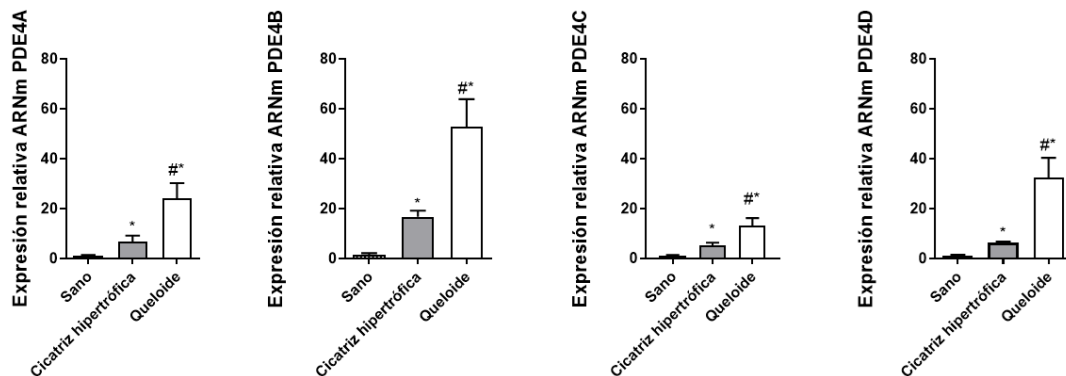


#### 4.1 Estudio de la expresión de las isoformas de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) y marcadores fibróticos en muestras de pacientes sanos, cicatrices hipertróficas y queloides

Para el estudio de la expresión de las isoformas de la PDE4 y los marcadores de la TEM y de la TFM se usaron las técnicas RT-PCR y co-inmunofluorescencia.

##### 4.1.1 Estudio genético de la expresión de las isoformas de fosfodiesterasa 4 (PDE4)

En primer lugar, se midió la expresión génica de las diferentes isoformas de la PDE4. Como se muestra en la **Figura 23**, las isoformas A, B, C y D, se encuentran sobre-expresadas tanto en las cicatrices hipertróficas como en los queloides *versus* piel sana. Además, esta sobre-expresión, es significativamente mayor en el caso de los queloides con respecto a las cicatrices hipertróficas. Asimismo, la PDE4B es la isoforma que más se sobre-expresa en este tipo de cicatrices.

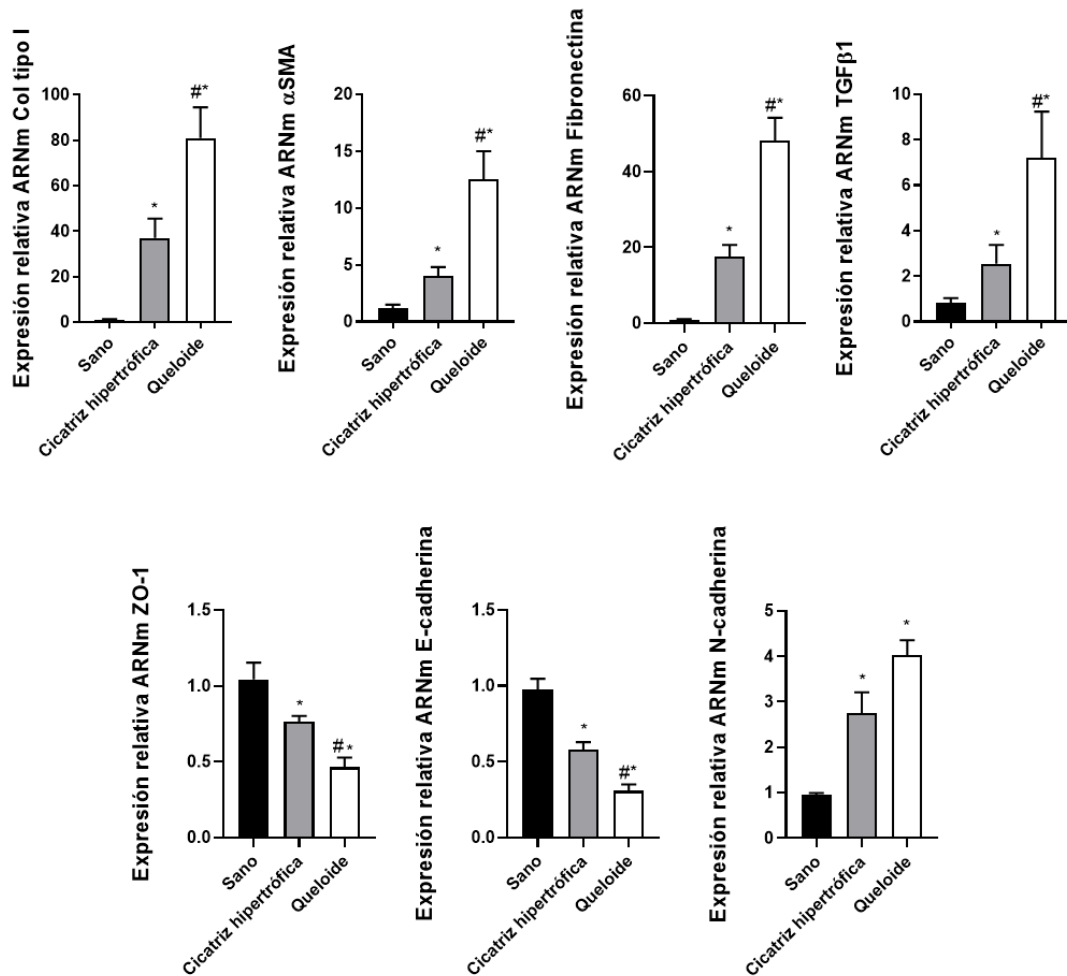


**Figura 23: Las fosfodiesterasas 4 (PDE4) A, PDE4B, PDE4C y PDE4D están sobre-expresadas en el tejido cutáneo de pacientes con queloides y cicatrices hipertróficas.** Las isoformas de la PDE4, PDE4A, PDE4B, PDE4C y PDE4D, fueron analizadas mediante RT-PCR en piel sana (n = 6), cicatriz hipertrófica (n = 6) y tejido queلوide (n = 6). Los resultados se expresan como la media ± SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0,05 vs. control; #P <0.05 vs. cicatriz hipertrófica.

##### 4.1.2 Estudio genético de la expresión de marcadores fibróticos

En segundo lugar, se midió la expresión génica de marcadores de la TFM y de la TEM tales como Col tipo I,  $\alpha$ SMA, fibronectina, TGF $\beta$ 1, N-cadherina ZO-1 y E-cadherina. Los resultados muestran que, en este tipo de cicatrices, hay una sobre-expresión de los

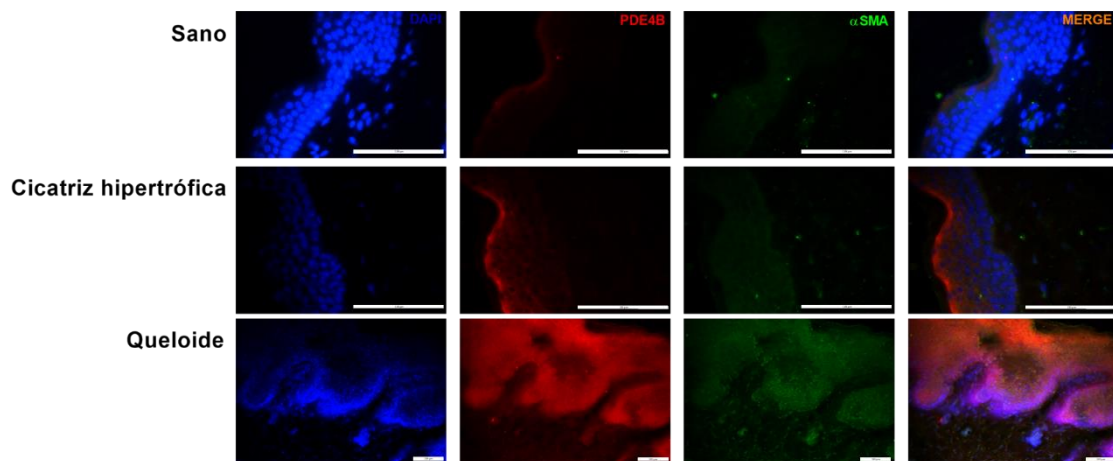
marcadores de fenotipo mesenquimal y una disminución de los marcadores epiteliales. Como se observa en la **Figura 24**, todos los marcadores tienen una diferencia de expresión estadísticamente significativa *versus* piel sana, y, excepto la N-cadherina, también hay una diferencia entre la expresión en las cicatrices hipertróficas y los queloides.



**Figura 24:** El colágeno tipo I (Col tipo I), la  $\alpha$  actina de musculo liso ( $\alpha$ SMA), la fibronectina, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  1 (TGF $\beta$ 1), y la N-cadherina están sobre-expresadas en el tejido cutáneo de pacientes con queloides y cicatrices hipertróficas, mientras que, la *zonula occludens 1* (ZO-1) y la E-cadherina disminuyen su expresión. El Col tipo I, la  $\alpha$ SMA, la fibronectina, el TGF $\beta$ 1, la ZO-1, la E-cadherina y la N-cadherina fueron analizadas mediante RT-PCR en piel sana (n = 6), cicatriz hipertrófica (n = 6) y tejido queloide (n = 6). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P < 0,05 vs. control; #P < 0,05 vs. cicatriz hipertrófica.

#### 4.1.3 Estudio de la expresión proteica de la fosfodiesterasa 4 B (PDE4B) y la $\alpha$ -actina de musculo liso ( $\alpha$ SMA) en cortes de tejido de pacientes

Tras haber demostrado que la PDE4B es la isoforma que más se sobre-expresa en las cicatrices hipertróficas y los queloides, estos resultados se corroboraron con la co-inmunofluorescencia de PDE4B y  $\alpha$ SMA, marcador por excelencia de los miofibroblastos, la cual también se ha demostrado su sobre-expresión anteriormente en este trabajo. Como se muestra en la **Figura 25**, ambas proteínas tienen mayor expresión en los cortes de tejido de cicatrices hipertróficas y queloides. Además, hay un marcaje mayor en los queloides, coincidiendo con el análisis genético, tanto en la epidermis como en la dermis.



**Figura 25:** La  $\alpha$ -actina de musculo liso ( $\alpha$ SMA) y la fosfodiesterasa 4 B (PDE4B) están sobre-expresadas tanto en la dermis como en la epidermis de tejido cutáneo de pacientes con queloides y cicatrices hipertróficas. La expresión de  $\alpha$ SMA y PDE4B se analizó mediante co-inmunofluorescencia en piel de donantes sanos, pacientes con cicatrices hipertróficas y tejido queloide. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal Leica TCS SP2. Escala 100  $\mu$ m. Los cortes de tejido se marcaron con anticuerpos para  $\alpha$ SMA (rojo) y PDE4B (verde).

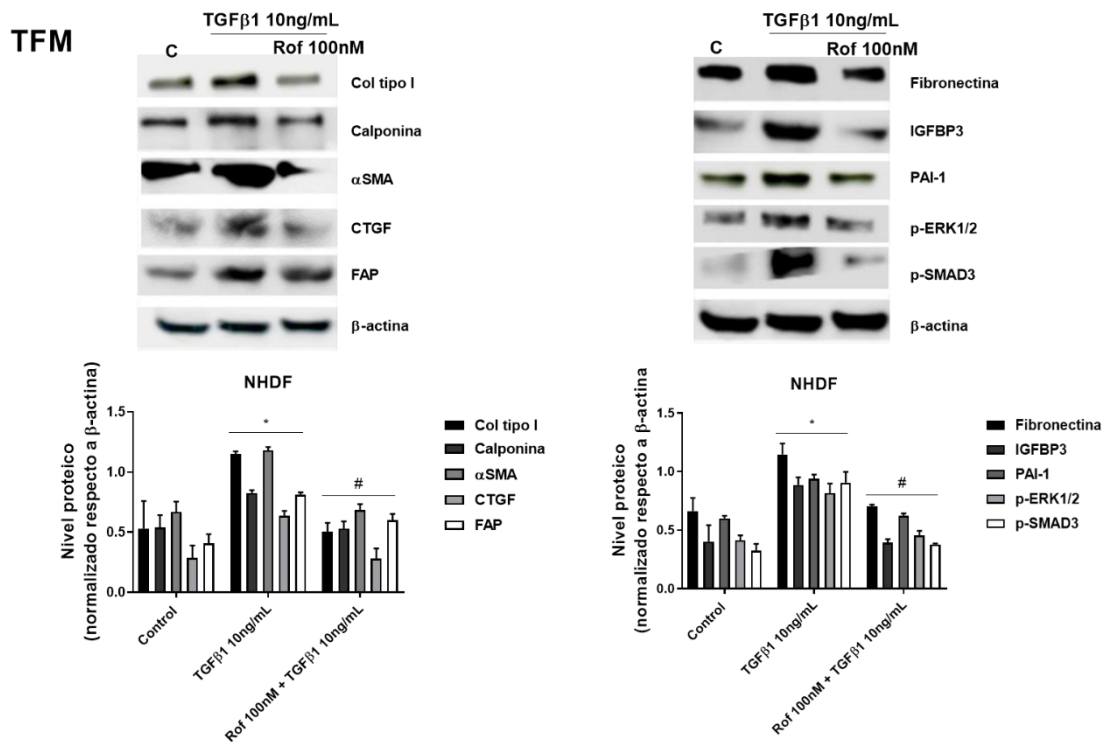
#### 4.2 Estudio *in vitro* de los efectos de roflumilast sobre la expresión de marcadores fibróticos y de las rutas aguas abajo de TGF $\beta$ 1.

Para evaluar el efecto del inhibidor de la PDE4 en cultivos *in vitro* de fibroblastos, tanto de queloide como de pacientes sanos, y del modelo 3D de epidermis y queratinocitos primarios, se usaron las técnicas western blot y RT-PCR. Además, para corroborar que dichos efectos se debían a la inhibición de la PDE4,

también se llevó a cabo el análisis proteico de los experimentos en los que se había silenciado la isoforma más sobre-expresada en la fibrosis cutánea, la PDE4B.

#### 4.2.1 Estudio del efecto de roflumilast sobre la expresión de los marcadores de la transición de fibroblasto a miofibroblastos (TFM) y de la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 en fibroblastos

Se estudió el efecto de roflumilast en NHDF tras ser estimuladas con TGFβ1 durante 30 min para promover la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 o 48 h para la TFM. Se midió la expresión proteica de los marcadores de la TFM, Col tipo I, calponina, αSMA, CTGF, FAP, fibronectina, IGFBP3 y PAI-1, además de p-ERK1/2 y p-SMAD3. Todos los marcadores de la TFM aumentaron su expresión significativamente *versus* control tras estimular a las células con TGFβ1, y, el inhibidor de la PDE4, consiguió reestablecer dicha expresión a niveles similares al control. De la misma manera, la fosforilación de ERK1/2 y de SMAD3 se vio incrementada en las células que habían sido estimuladas con TGFβ1. Sin embargo, en las células que se habían estimulado con TGFβ1 pero que además habían sido tratadas con el fármaco, no hubo un aumento estadísticamente significativo en la fosforilación de dichas proteínas con respecto al control y si frente al estímulo (**Figura 26**).

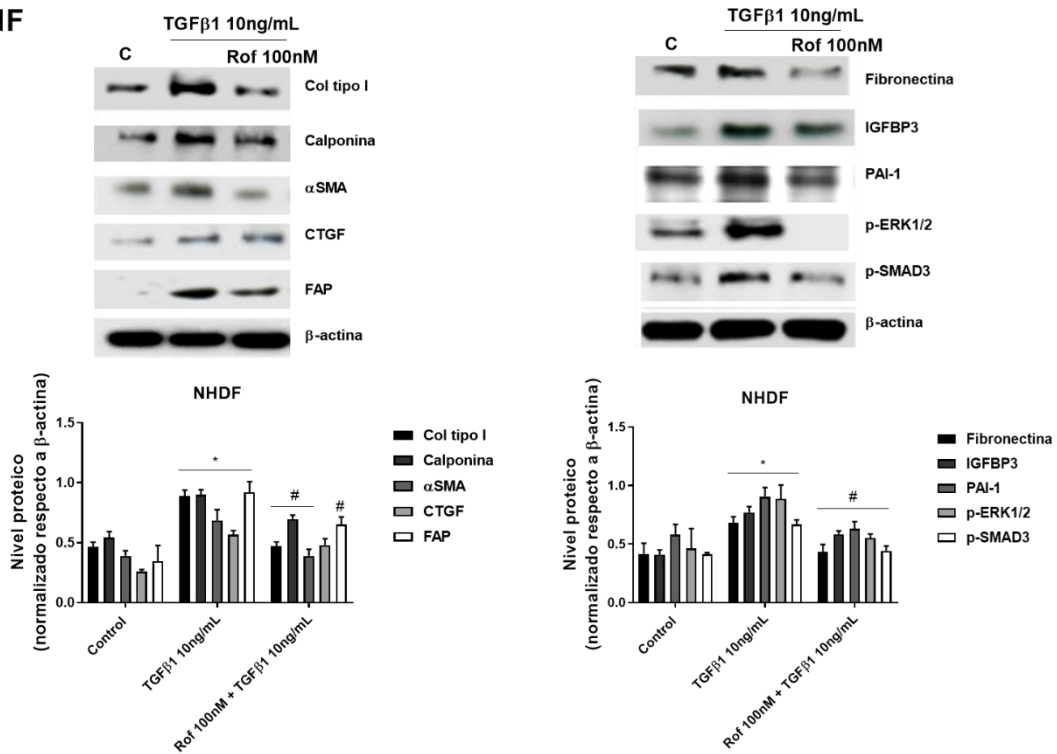


**Figura 26: Roflumilast disminuye la expresión de marcadores de la transición de fibroblasto a miofibroblasto (TFM) y la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2) y de SMAD3 inducida por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  1 (TGF $\beta$ 1) en fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF).** Las células se incubaron durante 30 minutos con roflumilast (100 nM) y luego se estimularon con TGF $\beta$ 1 10 ng/ml durante 48 horas para el análisis de marcadores de TFM o 30 minutos para el análisis de p-ERK1/2 y p-SMAD3. La expresión proteica de colágeno tipo I (Col tipo I), calponina,  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ SMA), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), proteína de activación de fibroblastos (FAP), fibronectina, proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina (IGFBP3), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), p-ERK1/2 y p-SMAD3 se analizaron mediante la técnica Western blot y se cuantificaron mediante densitometría con respecto al control interno  $\beta$ -actina. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de n = 3 experimentos independientes. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0,05 vs. control; #P <0.05 vs. TGF $\beta$ 1.

#### 4.2.2 Estudio del efecto de roflumilast sobre la expresión de marcadores fibróticos tras inducir la transición de fibroblasto a miofibroblastos (TFM) y de la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 en fibroblastos

Por otro lado, y también con NHDF, se estableció la TFM al estimular a las células durante 24 h con TGF $\beta$ 1, y, a continuación, se trataron durante otras 24 h con roflumilast además del estímulo para estudiar si el fármaco era capaz de promover la TFM. Para el estudio de la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3, las células fueron tratadas con el inhibidor de PDE4 durante 30 min tras la inducción de la TFM. Como se muestra en la **Figura 27**, los marcadores de la TFM, Col tipo I, calponina,  $\alpha$ SMA, CTGF, FAP, fibronectina, IGFBP3 y PAI-1 aumentaron su expresión tras tratar a las células con TGF $\beta$ 1, y, el fármaco, consiguió inducir la TFM al disminuir dicha expresión siendo estadísticamente significativo con respecto al estímulo excepto en el caso de CTGF. En el caso de la fosforilación de las proteínas ERK1/2 y SMAD3, esta se vio incrementada tras la inducción de la TFM, pero, al tratar a las células con roflumilast, esta modificación postranscripcional, volvió a valores similares al control.

## TMF



**Figura 27: Roflumilast promueve la transición de miofibroblasto a fibroblasto (TMF) e inhibe la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2) y de SMAD3 inducida por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  1 (TGF $\beta$ 1) en fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF).** Las células se estimularon durante 24 horas con TGF $\beta$ 1, se incubaron durante 30 minutos con roflumilast (100 nM) y luego se estimularon con TGF $\beta$ 1 10 ng/ml otras 24 horas para el análisis de marcadores de TMF o 30 minutos para el análisis de p-ERK1 / 2 y p-SMAD3. La expresión proteica de colágeno tipo I (Col tipo I), calponina,  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ SMA), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), proteína de activación de fibroblastos (FAP), fibronectina, proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina (IGFBP3), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), p-ERK1/2 y p-SMAD3 se analizaron mediante la técnica Western blot y se cuantificaron mediante densitometría con respecto al control interno  $\beta$ -actina. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de  $n = 3$  experimentos independientes. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \* $P < 0,05$  vs. control; # $P < 0.05$  vs. TGF $\beta$ 1.

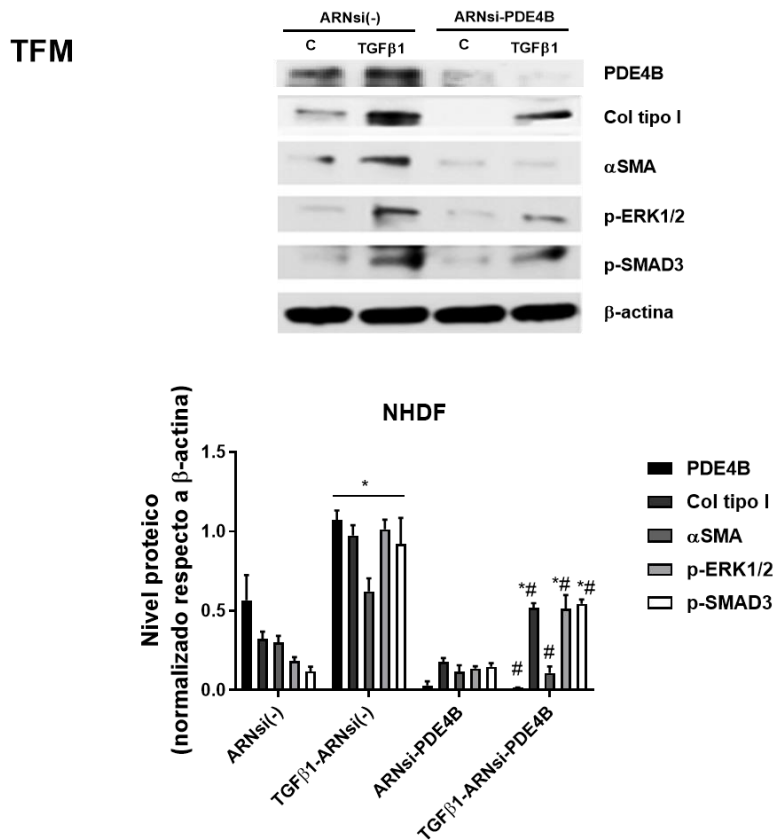
### 4.2.3 Estudio del papel de la fosfodiesterasa 4 B (PDE4B) en la transición de fibroblasto a miofibroblasto (TFM) y en la ruta canónica y no canónica de TGF $\beta$ 1 en fibroblastos

Con la intención de corroborar que los efectos de roflumilast se deben a la inhibición de la PDE4, y como gracias a experimentos anteriores ha quedado demostrado que la PDE4B es la que más se sobre-expresa en muestras de pacientes con cicatrices hipertróficas y queloides, se usó ARNsi para PDE4B en NHDF para el posterior estudio de la expresión proteica de marcadores de la TFM y la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3. Las células fueron incubadas con ARNsi(-) o ARNsi-PDE4B durante



6 h. A continuación, se estimuló con TGFβ1 durante 30 min para el análisis de PDE4B, p-ERK1/2 y p-SMAD3 o durante 48 h para los marcadores de la TFM.

Como se observa en la **Figura 28**, el silenciamiento de la PDE4B funcionó con éxito ya que no se detectó apenas proteína. TGFβ1 aumentó significativamente *versus* control la expresión de col tipo I, αSMA, p-ERK1/2 y p-SMAD3 en el caso de las células tratadas con ARNsi(-), sin embargo, esta diferencia, no fue relevante para αSMA en el caso de las células tratadas con ARNsi-PDE4B. Además, todas las proteínas disminuyeron su expresión en el caso de las células tratadas con ARNsi-PDE4B y estimuladas con TGFβ1 de manera estadísticamente significativa *versus* ARNsi(-) + TGFβ1.



**Figura 28:** La fosfodiesterasa 4 B (PDE4B) interviene en la expresión de los marcadores de la transición de fibroblasto a miofibroblasto (TFM) y en la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2) y de SMAD3 inducida por el factor de crecimiento transformante β 1 (TGFβ1) en fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF). Las células fueron silenciadas para PDE4B mediante ARN interferente (ARNsi-PDE4B) o con silenciamiento control (ARNsi(-)) y se estimularon durante 48 h con TGFβ1 10 ng/ml para el análisis de colágeno tipo I (Col tipo I), α-actina de músculo liso (αSMA) o 30 minutos para el análisis de PDE4B2, p-ERK1/2 y p-SMAD3. La expresión de proteínas se

analizó mediante la técnica Western blot y se cuantificó mediante densitometría con respecto al control interno  $\beta$ -actina. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de  $n = 3$  experimentos independientes. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \* $P < 0,05$  vs. control ARNsi(-)/ARNsi-PDE4B; # $P < 0.05$  vs. ARNsi(-) TGF $\beta$ 1.

#### 4.2.4 Estudio del efecto de roflumilast en fibroblastos extraídos de queloide

A continuación, se procedió al estudio de la expresión proteica de marcadores de la TFM (**Figura 29A**) y de la fosforilación de ERK1/2 y de SMAD3 (**Figura 29B**) en fibroblastos extraídos de muestras de queloide. Las células fueron incubadas con el fármaco durante 30 min y posteriormente estimuladas con TGF $\beta$ 1 durante 30 min para p-ERK1/2 y p-SMAD3 o 48 h en el caso de col tipo I,  $\alpha$ SMA y PDE4B.

Como se puede observar en la **Figura 29**, TGF $\beta$ 1 incrementa la expresión de los marcadores de la TFM, así como la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 y la expresión de PDE4B, y, roflumilast, revierte en todos los casos dicha situación siendo estadísticamente significativo *versus* estímulo.

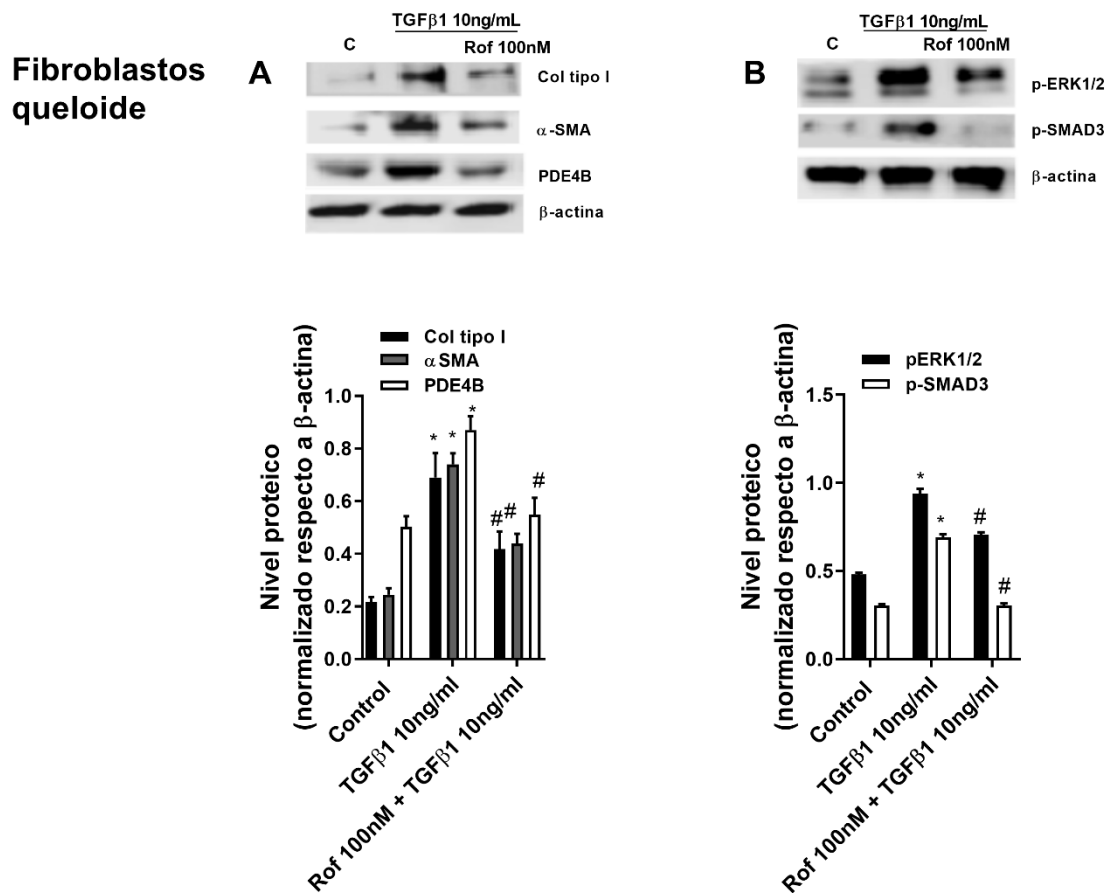


Figura 29: Roflumilast disminuye la expresión de marcadores de la transición de fibroblasto a miofibroblasto (FMT) y la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2) y

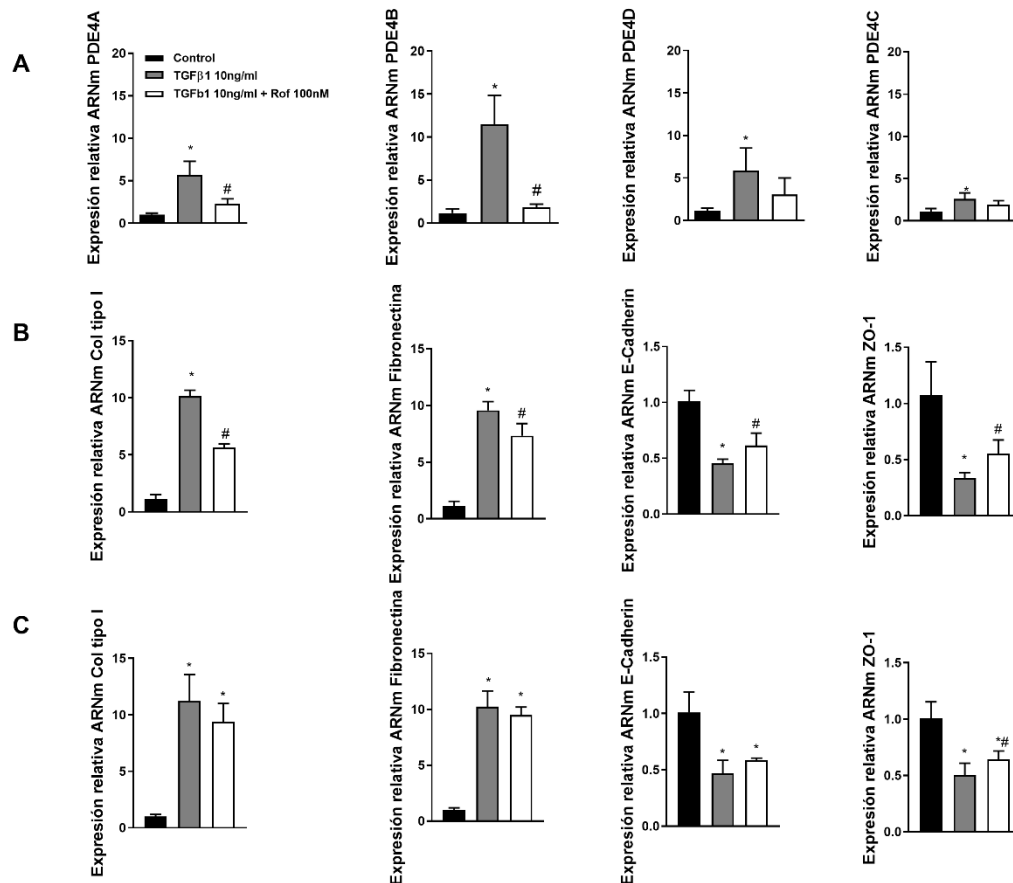
**SMAD3 inducida por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  1 (TGF $\beta$ 1) en fibroblastos extraídos de tejido queloide.** Los fibroblastos se aislaron de la dermis de muestras de tejido queloide. Las células se incubaron durante 30 minutos con roflumilast (100 nM) y luego se estimularon con TGF $\beta$ 1 10 ng/ml durante 48 horas (A) o 30 minutos (B). La expresión de colágeno tipo I (Col tipo I),  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), fosfodiesterasa 4B (PDE4B), p-ERK1/2 y p-SMAD3 se analizó mediante la técnica Western blot y se cuantificó mediante densitometría con respecto al control interno  $\beta$ -actina. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de n = 3 experimentos independientes. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \* P <0,05 frente al control; #P <0,05 frente a TGF $\beta$ 1.

#### 4.2.5 Estudio de los efectos de roflumilast en la expresión de las isoformas de PDE4 y de los marcadores de la transición epitelial mesenquimal (TEM) en un modelo 3D de epidermis

Tras la formación del modelo 3D de epidermis, se procedió al estudio de la expresión de las diferentes isoformas de la PDE4 y de los marcadores de la TEM tras estimular a las células con TGF $\beta$ 1 y tratarlas con roflumilast. Salvo en el caso de la **Figura 30C**, donde primero se indujo la TEM al tratar a las células durante 24 h con el estímulo y posteriormente añadir el fármaco 24 h más, el modelo 3D de epidermis fue incubado con el inhibidor de PDE4 durante 30 min y posteriormente estimulado con TGF $\beta$ 1 durante 48 h.

Coincidiendo con los experimentos realizados en muestras de tejido humano, y como se muestra en la **Figura 30A**, las isoformas de la PDE4 A, B, C y D, se sobre-expresan en el modelo 3D de epidermis, siendo, la PDE4B, la isoforma con mayor expresión génica. Roflumilast, consiguió revertir dicho efecto siendo estadísticamente significativo *versus* TGF $\beta$ 1 para la PDE4A y la PDE4B.

En el caso de los marcadores de la TEM, tanto el Col tipo I como la fibronectina aumentaron su expresión y la E-cadherina y la ZO-1 la disminuyeron al tratar a las células durante 48 h con el estímulo. Roflumilast, disminuyó la expresión de los marcadores mesenquimales y aumentó la de los marcadores epiteliales de manera significativa *versus* estímulo salvo en el experimento donde primero se había inducido la TEM. En este último caso, el inhibidor de la PDE4 solo consiguió revertir la expresión de la ZO-1 (**Figura 26B y C**).



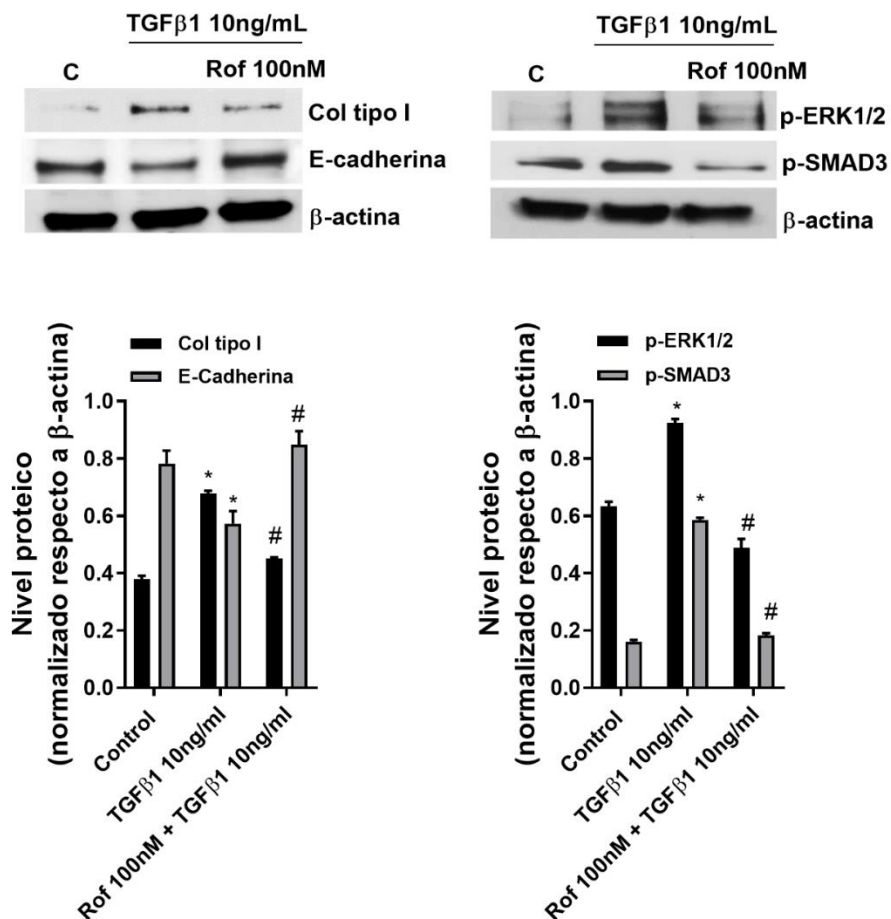
**Figura 30: La fosfodiesterasa 4 B (PDE4B) es la isoforma más sobre-expresada tras estimular modelos 3D de epidermis con el factor de crecimiento transformante  $\beta$  1 (TGF $\beta$ 1) y roflumilast revierte dicha expresión además de la expresión de marcadores de la transición epitelio mesenquimal (TEM) y de la transición mesenquimal epitelial (TME).** Para la formación del modelo 3D de epidermis, se sembraron fibroblastos dérmicos de ratón (BALB/3T3) y se irradiaron con luz UV. Se sembraron los queratinocitos y se cultivaron durante 21 días. Se incubó durante 30 minutos con roflumilast (100 nM) y luego se estimuló con TGF $\beta$ 1 10 ng/ml durante 48 horas para la TEM o se estimularon durante 24 horas con TGF $\beta$ 1, se incubaron durante 30 minutos con roflumilast (100 nM) y luego se estimularon con TGF $\beta$ 1 10 ng/ml otras 24 horas para la transición mesenquimal epitelial (TME). Las isoformas de fosfodiesterasa 4 (PDE4), PDE4A, PDE4B, PDE4D y PDE4C se analizaron mediante RT-PCR (A). Los marcadores de la TEM (B) y de la TME (C), colágeno tipo I (Col tipo I), fibronectina, E-cadherina y *zonula occludens 1* (ZO-1) se analizaron mediante RT-PCR. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM de n = 3 experimentos independientes. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \* P <0,05 frente al control; #P <0,05 frente a TGF $\beta$ 1.

#### 4.2.6 Estudio de los efectos de roflumilast en la expresión de los marcadores de la TEM, y en la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 en queratinocitos

Por otro lado, también se realizó el análisis de la expresión, esta vez a nivel proteico, de los marcadores de la TEM en queratinocitos, además de las rutas aguas debajo de TGF $\beta$ 1. Las células fueron tratadas con el fármaco durante 30 min y

posteriormente estimuladas con TGFβ1 durante 30 min más para p-ERK1/2 y p-SMAD3 o 48 h en el caso de col tipo I y E-cadherina.

Como se muestra en la **Figura 31**, el Col tipo I aumentó su expresión proteica y la E-cadherina la disminuyó al tratar a las células con el estímulo. De la misma manera, aumentaron las fosforilaciones tanto de ERK1/2 como de SMAD3. Roflumilast, disminuyó la expresión y la fosforilación de las proteínas correspondientes y la aumento en el caso de la E-cadherina siendo estadísticamente significativo *versus* TGFβ1 para todas ellas.



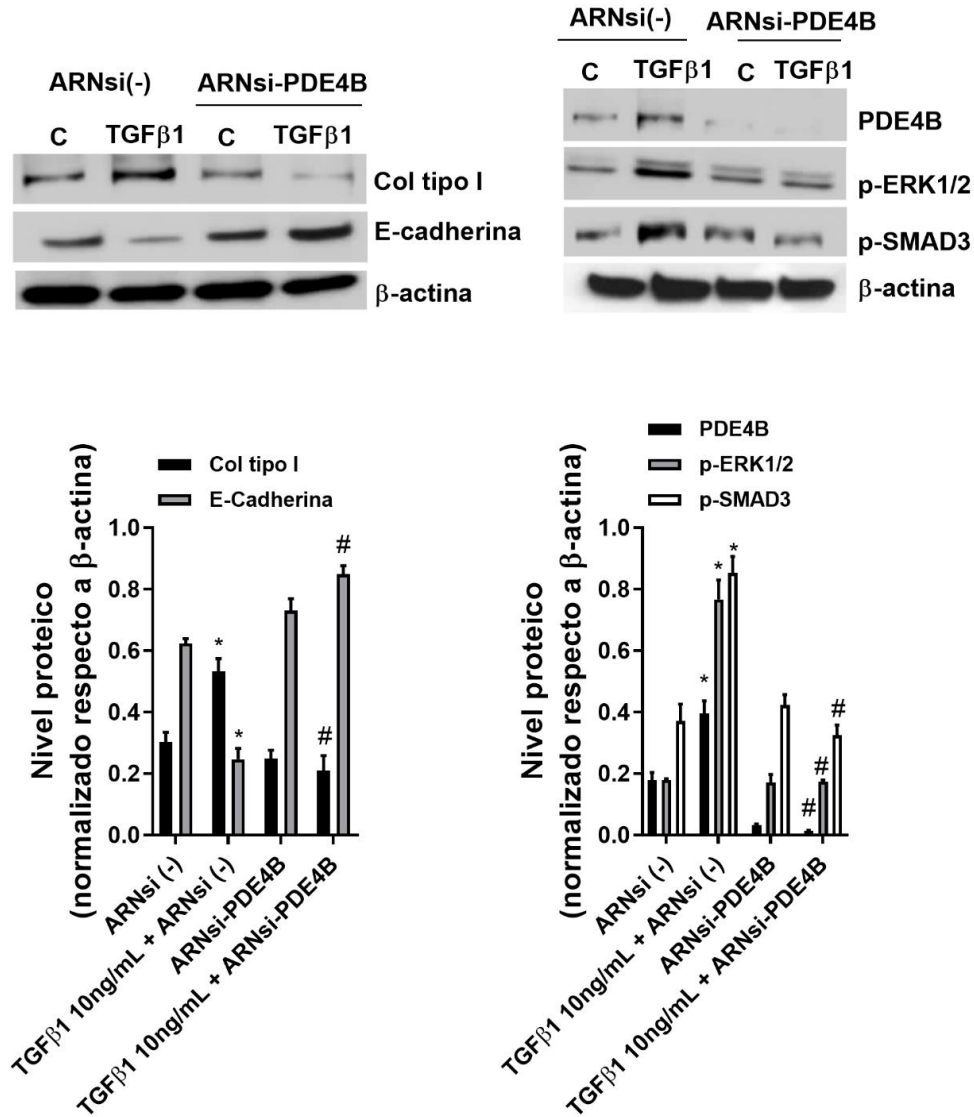
**Figura 31: Roflumilast revierte la expresión de marcadores de la transición epitelio mesenquimal (TEM) y la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2) y SMAD3.** Los queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK) se incubaron durante 30 minutos con roflumilast (100 nM) y luego se estimularon con el factor de crecimiento transformante β 1 (TGFβ1) 10 ng/ml durante 48 horas para el análisis de colágeno tipo I (Col tipo I) y E-cadherina o 30 minutos para el análisis de p-ERK1 / 2 y p-SMAD3. La expresión de proteínas se analizó mediante la técnica Western blot

y se cuantificó mediante densitometría con respecto al control interno  $\beta$ -actina. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de  $n = 3$  experimentos independientes. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*  $P < 0,05$  frente al control; # $P < 0,05$  frente a TGF $\beta$ 1.

#### 4.2.7 Estudio del papel de la fosfodiesterasa 4 B (PDE4B) en la transición epitelial mesenquimal (TEM) y en la ruta canónica y no canónica de TGF $\beta$ 1 en queratinocitos

Tras examinar el efecto de roflumilast en el modelo 3D de epidermis y en queratinocitos, y además corroborar que la isoforma más sobre-expresada de la PDE4 en este caso también era la PDE4B, se procedió al silenciamiento de dicha isoforma con ARNsi en queratinocitos.

Las células fueron incubadas con ARNsi(-) o ARNsi-PDE4B durante 6 h. A continuación, se estimuló con TGF $\beta$ 1 durante 30 min para el análisis de PDE4B, p-ERK1/2 y p-SMAD3 o durante 48 h para los marcadores de la TEM. Gracias al estudio de la expresión proteica de la PDE4B, y como se observa en la **Figura 32**, se pudo confirmar que el silenciamiento se había producido con éxito. Además, TGF $\beta$ 1 consiguió aumentar la expresión de Col tipo I y disminuir la de E-cadherina y aumentó la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 pero solo en las células que se habían incubado previamente con ARNsi(-). En el caso de las células que habían sido tratadas con ARNsi-PDE4B, el estímulo no consiguió originar la TEM ni producir un aumento en la fosforilación de las proteínas implicadas en las rutas de señalización aguas debajo de TGF $\beta$ 1. El análisis resultó estadísticamente significativo para todos los casos al comparar las células tratadas con ARNsi(-) y estimuladas con TGF $\beta$ 1 *versus* el tratamiento con ARNsi-PDE4B y TGF $\beta$ 1.



**Figura 32:** La fosfodiesterasa 4 B (PDE4B) interviene en la expresión de los marcadores de la transición epitelio mesenquimal (TEM) y en la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2) y de SMAD3 inducida por el factor de crecimiento transformante β 1 (TGFβ1) en queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK). Las células fueron silenciadas para PDE4B mediante ARN interferente (ARNsi-PDE4B) o con silenciamiento control (ARNsi(-)) y se estimularon durante 48 h con TGFβ1 10 ng/ml para el análisis de colágeno tipo I (Col tipo I) y E-cadherina o 30 minutos para el análisis de PDE4B, p-ERK1/2 y p-SMAD3. La expresión de proteínas se analizó mediante la técnica Western blot y se cuantificó mediante densitometría con respecto al control interno β-actina. Los resultados se expresan como la media ± SEM de n = 3 experimentos independientes. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0,05 vs. control ARNsi(-)/ARNsi-PDE4B; #P <0.05 vs. ARNsi(-) TGFβ1.

#### 4.3 Análisis de la expresión e interacción de la PDE4B y p-ERK1/2 en diferentes modelos de fibrosis cutánea

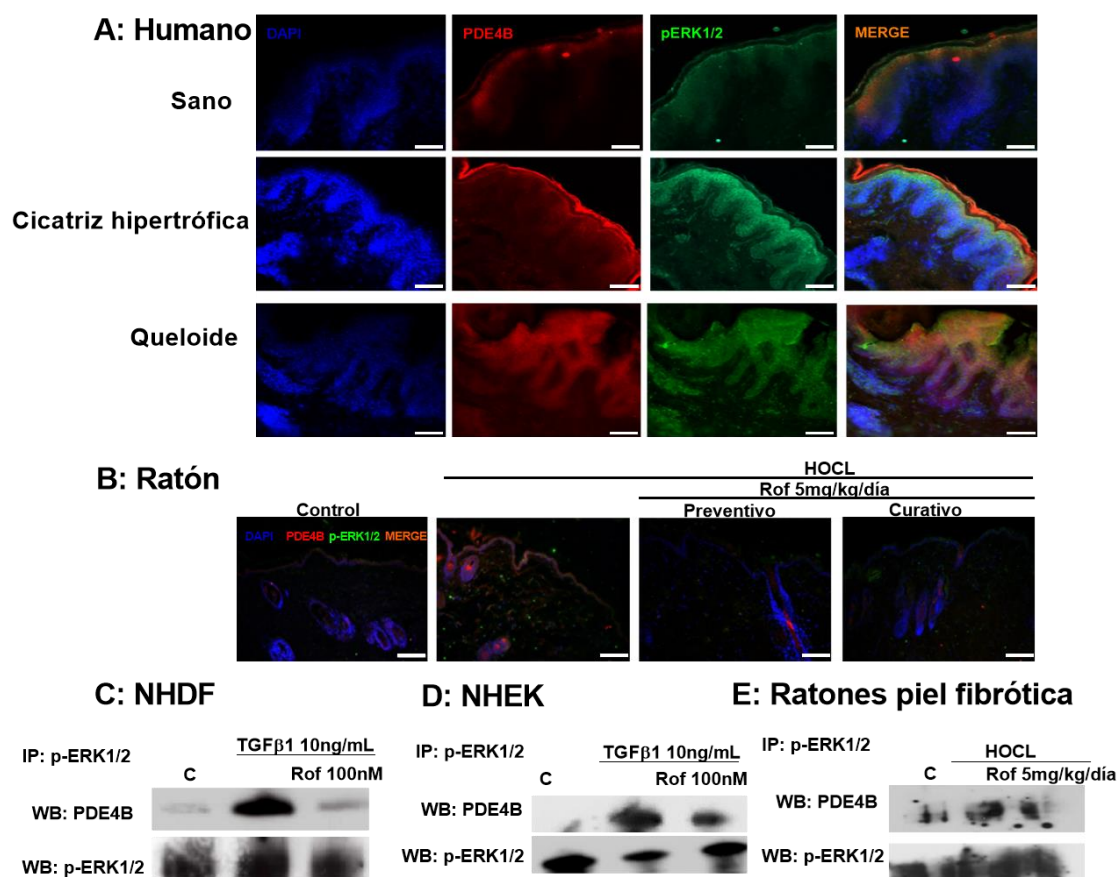
Con el objetivo de estudiar la expresión e interacción entre la PDE4B y p-ERK1/2, se realizaron técnicas de inmunoanálisis en diferentes modelos de fibrosis cutánea.

Por un lado, se llevó a cabo la co-inmunofluorescencia de la PDE4B y de p-ERK1/2 en los cortes de tejido de origen humano de piel sana, cicatrices hipertróficas y queloides además del modelo animal, y, por otro lado, se realizó la co-inmunoprecipitación de estas mismas proteínas en fibroblastos y queratinocitos primarios humanos y del modelo animal.

Como se muestra en la **Figura 33A**, la expresión tanto de la PDE4B como de p-ERK1/2 está incrementada en las cicatrices hipertróficas y en los queloides. Además, esta expresión se puede ver en la dermis y en la epidermis. Con respecto al modelo animal, el HOCL también generó un incremento en la expresión de ambas proteínas, y, roflumilast, consiguió restablecerla a niveles similares a los ratones control tanto en el modelo preventivo como en el modelo curativo. La expresión de PDE4B y de p-ERK1/2 en este caso, también se pudo observar en la dermis y en la epidermis como ocurre en los cortes de tejido de las cicatrices hipertróficas y los queloides (**Figura 33B**).

Asimismo, gracias a la co-inmunoprecipitación y posterior western blot, se pudo observar que la PDE4B y p-ERK1/2 interaccionan tanto en los cultivos de fibroblastos dérmicos y queratinocitos epidérmicos como en el modelo animal (**Figura 33C, D y E**).





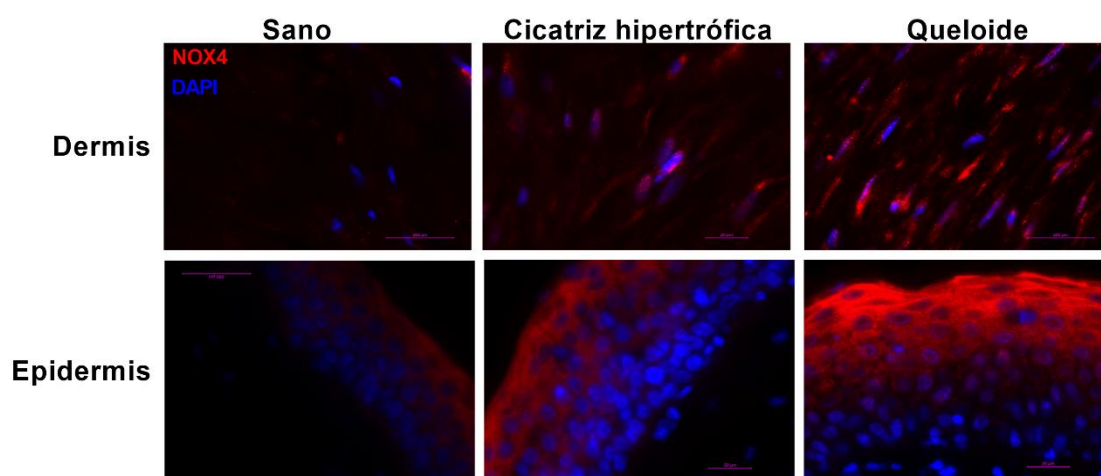
**Figura 33: Roflumilast disminuye la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2) y su interacción con la fosfodiesterasa 4 B (PDE4B).** Se utilizaron 24 ratones divididos en tres grupos homogéneos (n = 8): control, HOCL, roflumilast/HOCL. Se administraron 100 µl de HOCL (0,1 mg/ml) por vía subcutánea diariamente durante 6 semanas a los grupos correspondientes. El tratamiento farmacológico se inició el día 1 (modelo preventivo) o una vez establecida la fibrosis cutánea (modelo terapéutico). El fármaco se administró por vía oral, con sonda a una dosis de 5 mg/kg/d. La expresión de p-ERK1/2 y PDE4B se analizó mediante co-inmunofluorescencia en piel de donantes sanos, pacientes con cicatrices hipertróficas y tejido queloide (A) y en el modelo animal (B). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal Leica TCS SP2. Escala 100 µm. Los cortes de tejido se marcaron con anticuerpos para PDE4B (rojo) y PDE4B (verde). Se incubaron fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) y queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK) durante 30 minutos con roflumilast (100 nM), y luego se estimularon con el factor de crecimiento transformante β 1 (TGFβ1) 10 ng/ml durante 30 minutos. Se extrajeron las proteínas del experimento en NHDF (C) y en NHEK (D) además del modelo animal (E) y se inmunoprecipitó con un anticuerpo contra p-ERK1/2. La expresión de PDE4B se analizó mediante la técnica Western blot.

#### 4.4 Análisis del estrés oxidativo en fibrosis cutánea, los efectos de roflumilast y el papel de la fosfodiesterasa 4 B (PDE4B)

Para estudiar la generación de ERO, así como la expresión de NOX4 y la actividad de Nrf2 en diferentes modelos de fibrosis cutánea se procedió a la realización de inmunofluorescencias, western blots, medición de la fluorescencia DCF, y medición de la luminiscencia en la línea celular KeratinoSens.

#### 4.4.1 Estudio de la expresión de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) en piel

Con el objetivo de estudiar la expresión de NOX4 en cortes de tejido cutáneo de pacientes con cicatrices hipertróficas y queloides *versus* sanos se realizó una inmunofluorescencia (**Figura 34**). Las imágenes de la dermis y de la epidermis muestran como la expresión de dicha proteína esta incrementa en cicatrices hipertróficas y en queloides en ambas capas de la piel, siendo aparentemente mayor en el caso de los queloides.

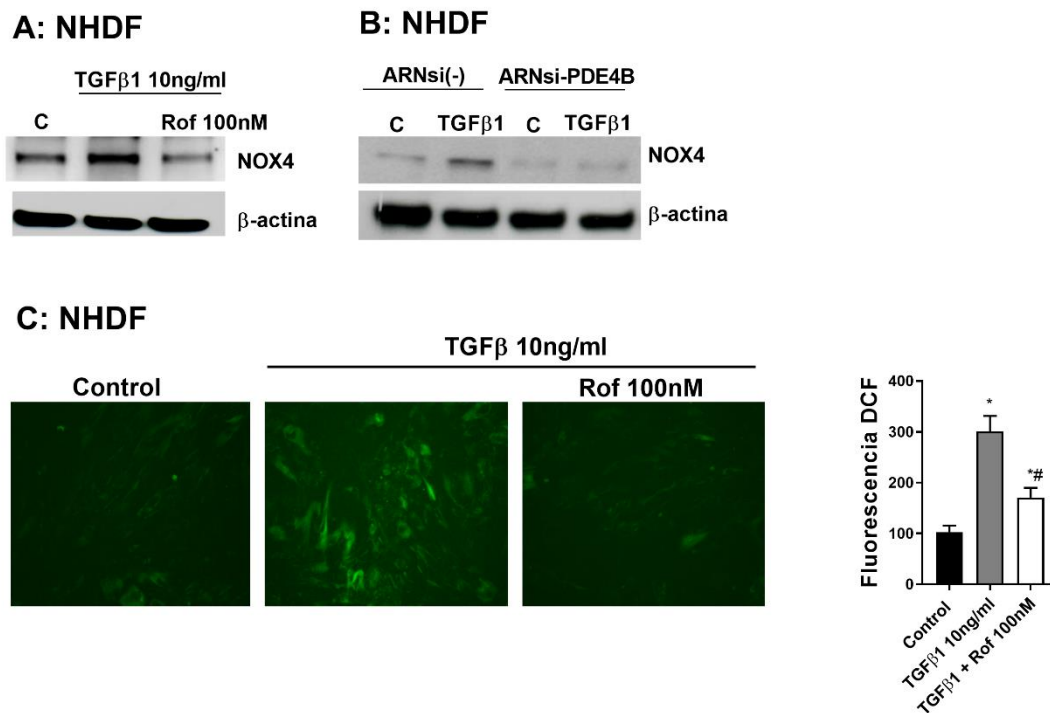


**Figura 34:** La NADPH oxidasa 4 (NOX4) está sobre-expresada tanto en la dermis como en la epidermis de tejido cutáneo de pacientes con queloides y cicatrices hipertróficas. La expresión de NOX4 se analizó mediante inmunofluorescencia en piel de donantes sanos, pacientes con cicatrices hipertróficas y tejido queloide. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal Leica TCS SP2. Los cortes de tejido se marcaron con el anticuerpo para NOX4 (rojo).

#### 4.4.2 Estudio de la expresión de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) y el papel de roflumilast y la PDE4B en fibroblastos

Tras observar el incremento en la expresión de NOX4 en las cicatrices hipertróficas y los queloides, se llevó a cabo el estudio de esta misma proteína en NHDF. Por un lado, para examinar el efecto de roflumilast, las células se incubaron con el fármaco durante 30 min y después se estimularon con TGF $\beta$ 1 durante 48 h. Por otro lado, para corroborar que dicho efecto se debe a la inhibición de la PDE4B, las células se incubaron con ARNsi(-) o ARNsi-PDE4B durante 6 h, y después se estimularon con TGF $\beta$ 1 durante 48 h. Además, se midió la fluorescencia de DCF que es proporcional a la generación de las ERO.

Como se muestra en la **Figura 35B**, la expresión de NOX4 aumenta cuando se estimula a las células con TGFβ1 salvo en el caso de las que se habían incubado previamente con ARNsi-PDE4B. Este último hallazgo está en concordancia con los resultados obtenidos al tratar a las células con roflumilast, donde la expresión de NOX4 es similar al control (**Figura 35A**). En el caso de la fluorescencia DCF esta incrementó al tratar a las células con el estímulo y roflumilast consiguió revertir dicho efecto (**Figura 35C**).

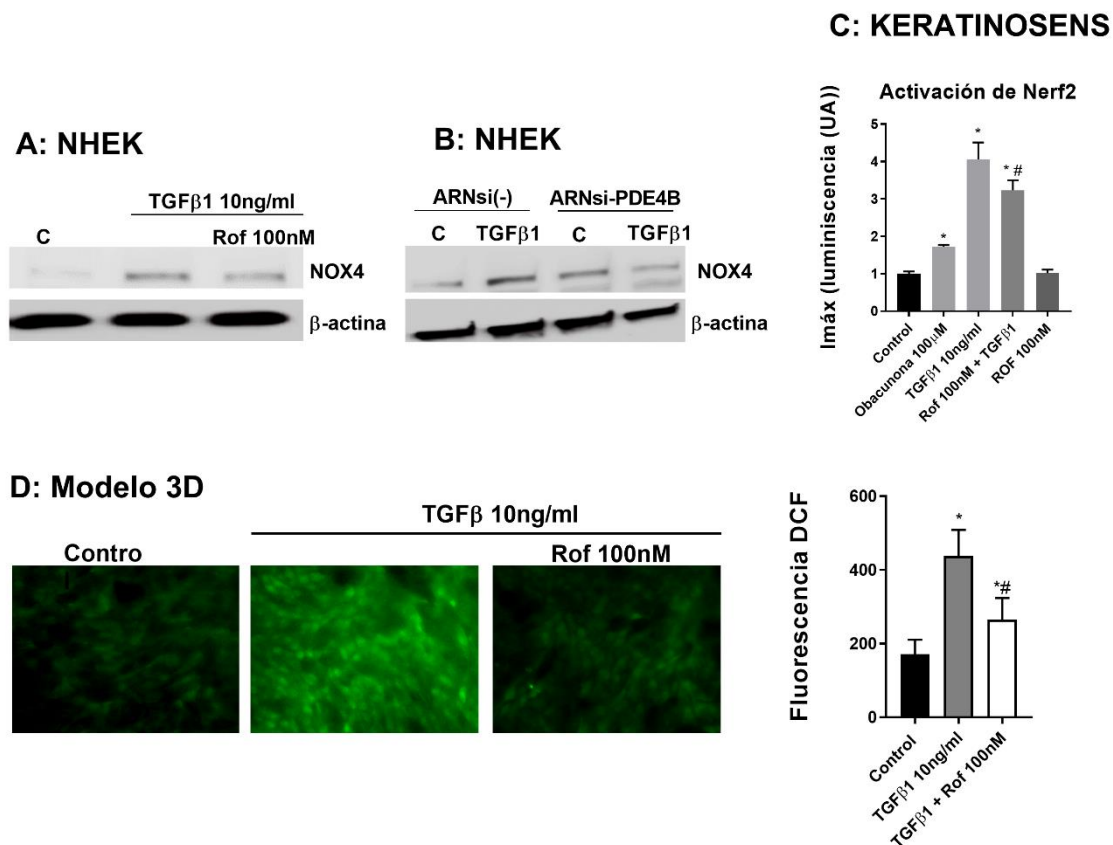


**Figura 35: Roflumilast disminuye la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la expresión de la NADPH oxidasa 4 (NOX4).** Los fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) se incubaron durante 30 minutos con roflumilast (100 nM) y luego se estimularon con el factor de crecimiento transformante β 1 (TGFβ1) 10 ng/ml durante 48 horas (A) o se silenciaron para PDE4B mediante ARN interferente (ARNsi-PDE4B) o con silenciamiento control (ARNsi(-)) y se estimularon durante 48 h con TGFβ1 10 ng/ml (B) para el análisis de la expresión de NOX4. La expresión a nivel proteico se analizó mediante la técnica Western blot. (C) Imágenes representativas de la fluorescencia DCF positiva en NHDF. Medida de la intensidad de fluorescencia de DCF. Los resultados se expresan como la media ± SEM de n = 3 experimentos independientes. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \* P <0,05 frente al control; #P <0,05 frente a TGFβ1.

#### 4.4.3 Estudio de la expresión de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) y el papel de roflumilast y la PDE4B en queratinocitos

Además de los experimentos en fibroblastos, también se llevaron a cabo experimentos en NHEK, la línea celular keratinoSens y el modelo 3D de epidermis. En el caso de las NHEK, estas se incubaron con el fármaco durante 30 min y después se estimularon con TGFβ1 durante 48 h. Por otro lado, las células se incubaron con ARNsi(-) o ARNsi-PDE4B durante 6 h, y después se estimularon con TGFβ1 durante 48 h. Ambos experimentos sirvieron para el análisis de la expresión proteica de NOX4. También se midió la fluorescencia DFC en el modelo 3D de epidermis. Y, por último, se midió el efecto de roflumilast sobre la actividad de Nrf2 gracias a la línea celular keratinoSens. En este caso, las células se incubaron durante 30 min con roflumilast u Obacunona, y posteriormente se estimularon con TGFβ1 durante 48 h.

Igual que ocurría con los NHDF, la expresión proteica de NOX4 se vio incrementada al tratar a las células con TGFβ1 excepto en el caso de los NHEK que habían sido estimulados con ARNsi-PDE4B (**Figura 36B**). En relación con lo anterior, el inhibidor de la PDE4 también redujo dicha expresión (**Figura 36A**). En el caso de las ERO, como se puede observar en la **Figura 36D**, la generación de estas especies aumenta en un modelo 3D de epidermis al ser estimulado con TGFβ1. Roflumilast, disminuye la generación de las ERO siendo estadísticamente significativo frente al estímulo. Además, la expresión de los genes antioxidantes dependientes del factor transcripcional Nrf2 también se incrementó al tratar a las células con TGFβ1 como se puede observar en la **Figura 36C**, y, roflumilast, la disminuyó de manera estadísticamente significativa *versus* estímulo. Obacunona, que se utilizó como control positivo al tratarse de un compuesto natural que activa a Nrf2, incrementó la actividad de este factor transcripcional con una diferencia significativa en comparación al control. Asimismo, se midió el efecto *per se* del inhibidor de la PDE4 y se comprobó que el fármaco no produce ningún efecto sobre la activación de Nrf2 de manera natural.



**Figura 36: Roflumilast disminuye la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) al inhibir la expresión de NADPH oxidasa 4 (NOX4).** Los queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK) se incubaron durante 30 minutos con roflumilast (100 nM) y luego se estimularon con el factor de crecimiento transformante β 1 (TGFβ1) 10 ng/ml durante 48 horas (A) o se silenciaron para PDE4B mediante ARN interferente (ARNsi-PDE4B) o con silenciamiento control (ARNsi(-)) y se estimularon durante 48 h con TGFβ1 10 ng/ml (B) para el análisis de la expresión de NOX4. La expresión a nivel proteico se analizó mediante la técnica Western blot. (C) Keratinosens es una línea celular que contiene el gen de la luciferasa bajo el control transcripcional de un promotor constitutivo fusionado con el elemento de respuesta antioxidante (ARE). Las células se incubaron durante 30 minutos con roflumilast (100 nM) u obacunona (100 µM) y luego se estimularon con TGFβ1 10 ng/ml durante 48 horas. Medida de la actividad luciferasa. (D) Para la formación del modelo 3D de epidermis, se sembraron fibroblastos dérmicos de ratón (BALB/3T3) y se irradiaron con luz UV. Se sembraron los queratinocitos y se cultivaron durante 21 días. Se incubó durante 30 minutos con roflumilast (100 nM) y luego se estimuló con TGFβ1 10 ng/ml durante 48 horas. Imágenes representativas de la fluorescencia DCF positiva en modelo 3D de epidermis. Medida de la intensidad de fluorescencia de DCF. Los resultados se expresan como la media ± SEM de n = 3 experimentos independientes. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \* P <0,05 frente al control; #P <0,05 frente a TGFβ1.

#### 4.5 Estudio *in vitro* del mecanismo de acción de roflumilast

Para elucidar el mecanismo de acción del inhibidor de la PDE4 se llevó a cabo el análisis proteico de experimentos *in vitro* tras estimular con TGFβ1 y tratar a las células con diferentes fármacos cuyo mecanismo de acción es conocido además de roflumilast.

#### 4.5.1 Análisis del mecanismo de acción de roflumilast en NHDF

En el caso de los NHDF, estos fueron tratados con el inhibidor de la PDE4, SIS3, KT5720, NAC, sanguinerine, PD98059 o combinaciones de los mismos durante 30 min y posteriormente estimulados con TGF $\beta$ 1 otros 30 min.

En el caso de la ruta canónica de TGF $\beta$ 1, y como se muestra en la **Figura 37A**, roflumilast consiguió inhibir la fosforilación de SMAD3 provocada por el estímulo de la misma manera que lo hizo SIS3, inhibidor de dicha proteína. Además, roflumilast, no consiguió revertir la fosforilación de SMAD3 al tratar a las células, además de con TGF $\beta$ 1, con una combinación de este y KT5720, inhibidor de la PKA. Por otro lado, y de forma parecida al resultado comentado anteriormente, el inhibidor de la PDE4 no consiguió disminuir la fosforilación de SMAD3 cuando las células se tratan con TGF $\beta$ 1 y una combinación de roflumilast y sanguinerine, inhibidor de PPM1A. En el caso de las células tratadas con NAC, inhibidor de la generación de ERO, o con el inhibidor de la PDE4, sí que se consiguió revertir la fosforilación de SMAD3 inducida por TGF $\beta$ 1.

También se llevó a cabo el análisis de una de las rutas no canónicas de TGF $\beta$ 1. En este caso, se analizó la fosforilación de ERK1/2. Como se observa en la **Figura 37B**, roflumilast consiguió revertir la fosforilación de dicha proteína de manera similar a PD98059, inhibidor específico de la ruta MEK/ERK. Por otro lado, como ocurrió con p-SMAD3, el inhibidor de la PDE4 no consiguió disminuir la fosforilación de ERK1/2 en el caso de las células tratadas, además de con el estímulo, con una combinación de roflumilast y KT5720. De la misma manera, el fármaco en estudio tampoco consiguió revertir el efecto de TGF $\beta$ 1 en ERK1/2 cuando las células se tratan con una combinación de este y sanguinerine. En el caso de los experimentos con NAC y roflumilast, ambos fármacos disminuyeron la fosforilación de ERK1/2 a pesar del tratamiento con TGF $\beta$ 1.

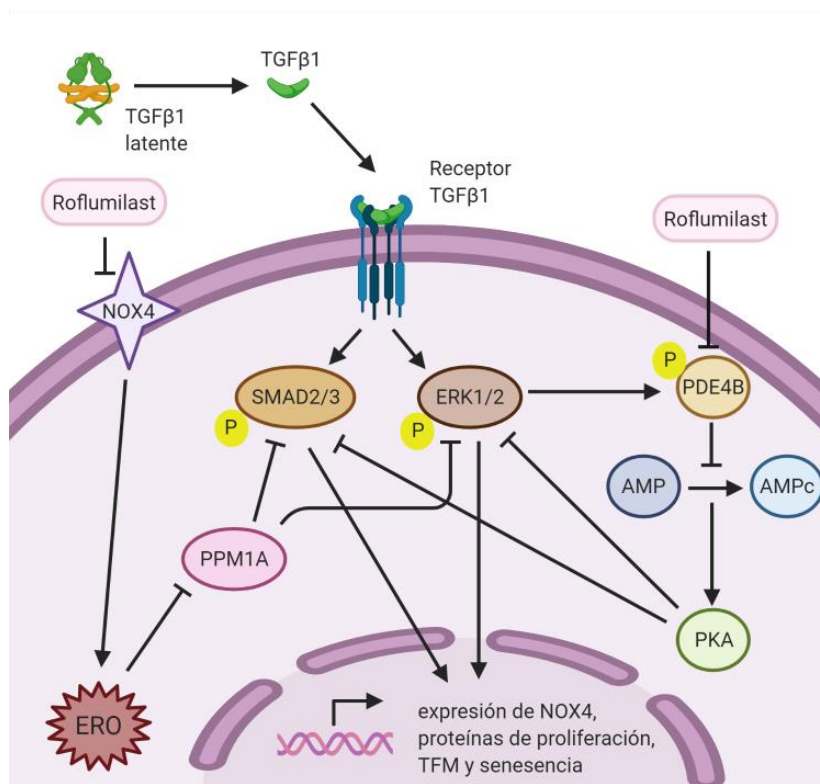
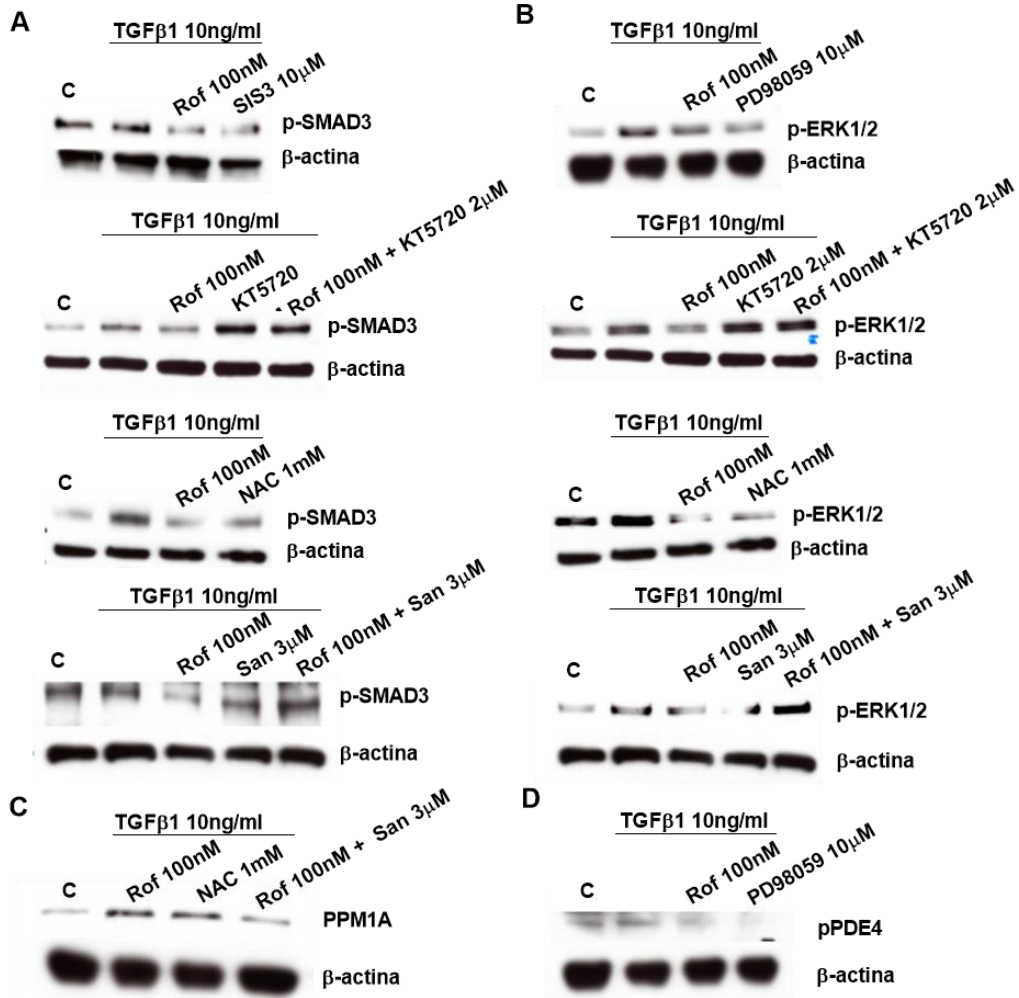
En relación con los estudios llevados a cabo sobre la generación de las ERO, que además inhiben a PPM1A, inhibidor de la fosforilación tanto de SMAD2/3 como de ERK1/2, se llevó a cabo el análisis de la expresión de esta proteína cuando las células habían sido tratadas con roflumilast, NAC o una combinación de roflumilast y

sanguinerine y estimuladas con TGF $\beta$ 1. Como se muestra en la **Figura 37C**, tanto el inhibidor de la PDE4 como NAC aumentaron la expresión de PPM1A, sin embargo, roflumilast, no consiguió dicho efecto cuando se trataba a las células con una combinación de este y sanguinerine.

Como se observa en la **Figura 37D**, la fosforilación de la PDE4 disminuyó al tratar a las células con roflumilast o PD98059.

Además, se ha propuesto un modelo de mecanismo de acción para roflumilast en fibroblastos dérmicos. Brevemente, el fármaco inhibe a la PDE4 y por tanto aumenta la concentración intracelular de AMPc con la consecuente activación de la PKA. Este hecho provoca una disminución en la fosforilación de ERK1/2 y por lo tanto también en la interacción de esta proteína con la PDE4, tanto por la activación, como ya se ha dicho, de la PKA como por la disminución en la generación de ERO al disminuir la expresión de NOX4. La activación de la PKA y la disminución en la generación de ERO también disminuyen la fosforilación de SMAD2/3. Todos estos eventos, ayudan a reducir mecanismos celulares como la proliferación y senescencia, así como la TFM (**Figura 37E**).







**Figura 37: Roflumilast actúa inhibiendo tanto la vía canónica dependiente de SMAD como las vías independientes o no canónicas de SMAD en fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF).** Las células se incubaron durante 30 minutos con roflumilast (100 nM), SIS3 (10  $\mu$ M), KT5720 (2  $\mu$ M), NAC (1 mM), sanguinerine (3  $\mu$ M), PD98059 (10  $\mu$ M), roflumilast (100 nM) y KT5720 (2  $\mu$ M), roflumilast (100 nM) y sanguinerine (3  $\mu$ M), y luego se estimularon con el factor de crecimiento transformante  $\beta$  1 (TGF $\beta$ 1) 10 ng/ml durante 30 minutos. La expresión de SMAD3 fosforilada (p-SMAD3) (A), quinasa regulada por señales extracelular fosforilada (p-ERK1/2) (B), proteína fosfatasa 1A (PPM1A) (C) y fosfodiesterasa 4 fosforilada (pPDE4) (D) se analizaron mediante la técnica Western blot. (E) Propuesta del mecanismo de acción de roflumilast. El inhibidor de la PDE4 aumenta la concentración intracelular del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) con la consecuente activación de la *protein kinasa A* (PKA). Esto a su vez, inhibe la fosforilación de ERK1/2 y de SMAD2/3. Además, el fármaco reduce la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) a través de la NADPH oxidasa 4 (NOX4), hecho que también inhibe la fosforilación de ERK1/2 y SMAD2/3. Creada con Biorender.

#### 4.5.2 Análisis del mecanismo de acción de roflumilast en NHEK

Una vez aclarado el mecanismo de acción del inhibidor de la PDE4 en NHDF, se procedió al análisis proteico de p-SMAD3, p-ERK1/2, PPM1A y pPDE4 en NHEK tras tratar a las células con roflumilast, SIS3, KT5720, NAC, sanguinerine, PD98059 o combinaciones de los mismos durante 30 min y ser estimuladas posteriormente con TGF $\beta$ 1 otros 30 min.

En el caso de la ruta dependiente de SMAD de TGF $\beta$ 1, y como se muestra en la **Figura 38A**, tanto Roflumilat, como SIS3, NAC y PD98059 consiguieron disminuir la fosforilación de SMAD3 a pesar de tratar a las células con el estímulo. De nuevo, como ocurrió en los NHDF, el inhibidor de la PDE4 no consiguió disminuir la expresión de p-SMAD3 cuando las células son tratadas con una combinación de este y KT5720. Sin embargo, en el caso de las NHEK, roflumilast sí que logró disminuir la fosforilación de esta proteína a pesar del tratamiento con TGF $\beta$ 1 y su combinación con sanguinerine, que produce el efecto contrario.

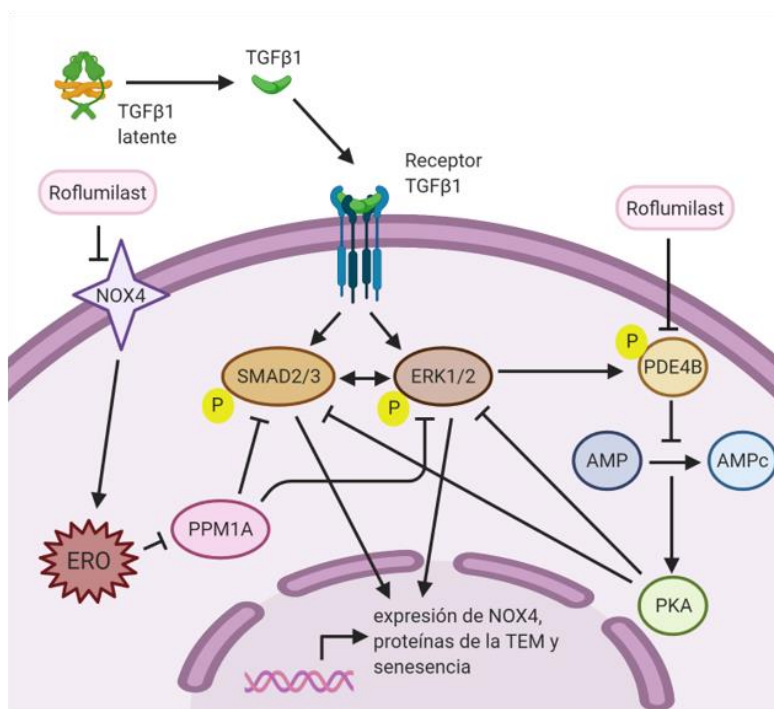
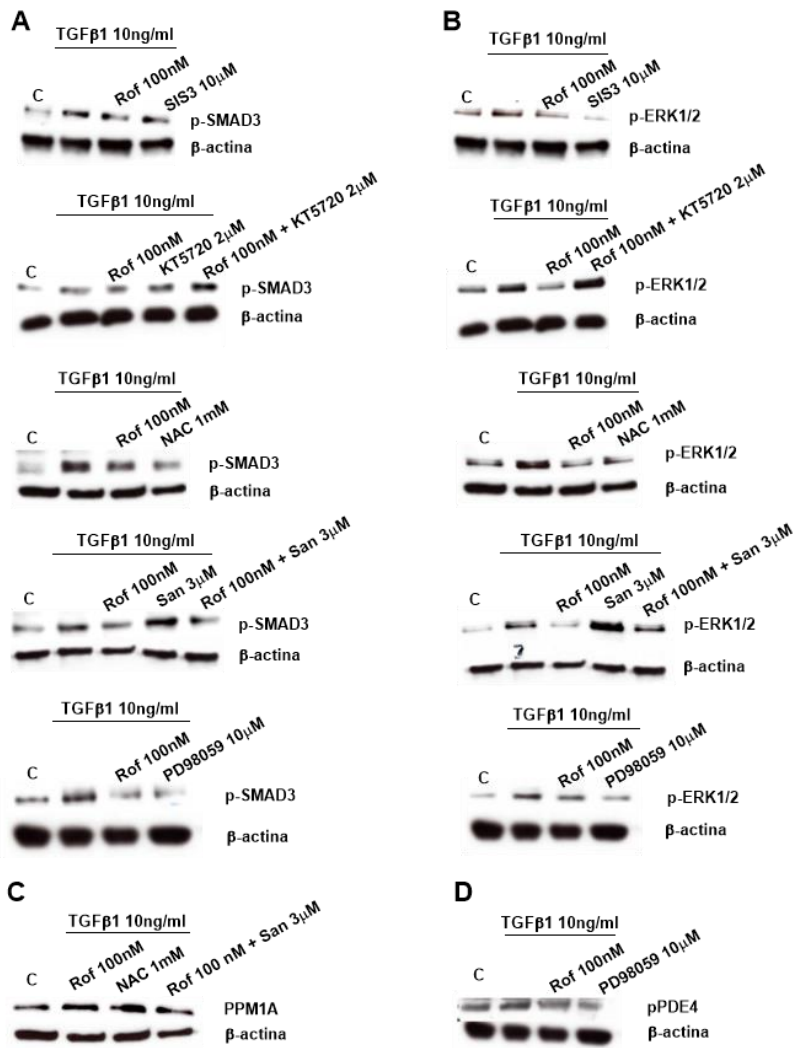
Con respecto a la ruta MEK/ERK, ruta no dependiente de SMAD3 de TGF $\beta$ 1, roflumilast, SIS3, NAC y PD98059 consiguieron disminuir la fosforilación de ERK1/2 a pesar de haber tratado a las células con el estímulo. Como ocurrió en el caso de p-SMAD3, el fármaco en estudio no consiguió revertir la expresión de p-ERK1/2 cuando las células eran tratadas con TGF $\beta$ 1 y una combinación de roflumilast y KT5720, que produjo el resultado contrario. En cambio, a pesar de que sanguinerine incrementó la

fosforilación de ERK1/2, esta disminuyó al tratar a las células, además de con el estímulo, con una combinación de roflumilast y sanguinerine (**Figura 38B**).

Como se muestra en la **Figura 38C**, tanto roflumilast como NAC aumentaron la expresión de PPM1A. Sin embargo, el inhibidor de la PDE4 no logró el mismo efecto cuando las células fueron tratadas con TGF $\beta$ 1 y una combinación de este y sanguinerine.

En el caso de la fosforilación de la PDE4, que se encuentra incrementada al tratar a las células con TGF $\beta$ 1, tanto roflumilast como PD98059 consiguieron disminuirla (**Figura 38D**).

Asimismo, como se observa en la **Figura 38E**, se ha propuesto un mecanismo de acción para roflumilast en queratinocitos. El inhibidor de la PDE4 aumenta la concentración intracelular de AMPc y por lo tanto provoca la activación de la PKA. Consecuentemente, hay una disminución en la fosforilación de SMAD2/3 y de ERK1/2 y por lo tanto también hay una reducción en la interacción de esta última proteína con la PDE4. La disminución en la fosforilación de estas SMAD2/3 y de ERK1/2 se debe tanto por la activación, como ya se ha dicho, de la PKA como por la disminución en la generación de ERO al disminuir la expresión de NOX4. Estos hechos, ayudan a reducir mecanismos celulares tales como la TEM y la senescencia.



**Figura 38: Roflumilast actúa inhibiendo tanto la vía canónica dependiente de SMAD como las vías independientes o no canónicas de SMAD en queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK).** Las células se incubaron durante 30 minutos con roflumilast (100 nM), SIS3 (10  $\mu$ M), KT5720 (2  $\mu$ M), NAC (1 mM), sanguinerine (3  $\mu$ M), PD98059 (10  $\mu$ M), roflumilast (100 nM) y KT5720 (2  $\mu$ M), roflumilast (100 nM) y sanguinerine (3  $\mu$ M), y luego se estimularon con el factor de crecimiento transformante  $\beta$  1 (TGF $\beta$ 1) 10 ng/ml durante 30 minutos. La expresión de SMAD3 fosforilada (p-SMAD3) (A), quinasa regulada por señales extracelular fosforilada (p-ERK1/2) (B), proteína fosfatasa 1A (PPM1A) (C) y fosfodiesterasa 4 fosforilada (pPDE4) (D) se analizaron mediante la técnica Western blot. (E) Propuesta del mecanismo de acción de roflumilast. El inhibidor de la PDE4 es capaz de aumentar la concentración intracelular del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y por lo tanto activar a la *protein kinasa A* (PKA). Esto a su vez, inhibe la fosforilación de ERK1/2 y de SMAD2/3. Además, el fármaco reduce la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) a través de la NADPH oxidasa 4 (NOX4), hecho que también disminuye la fosforilación de ERK1/2 y de SMAD2/3. Creada con BioRender.

#### 4.6 Estudio *in vitro* de la proliferación y senescencia

A continuación, se quisieron investigar los efectos de roflumilast, así como el papel de la PDE4, en mecanismos celulares tan importantes para el mantenimiento de la población de fibroblastos y/o miofibroblastos en procesos fibróticos como son la proliferación y la senescencia.

##### 4.6.1 Análisis de la proliferación y senescencia en NHDF y fibroblastos de queloide

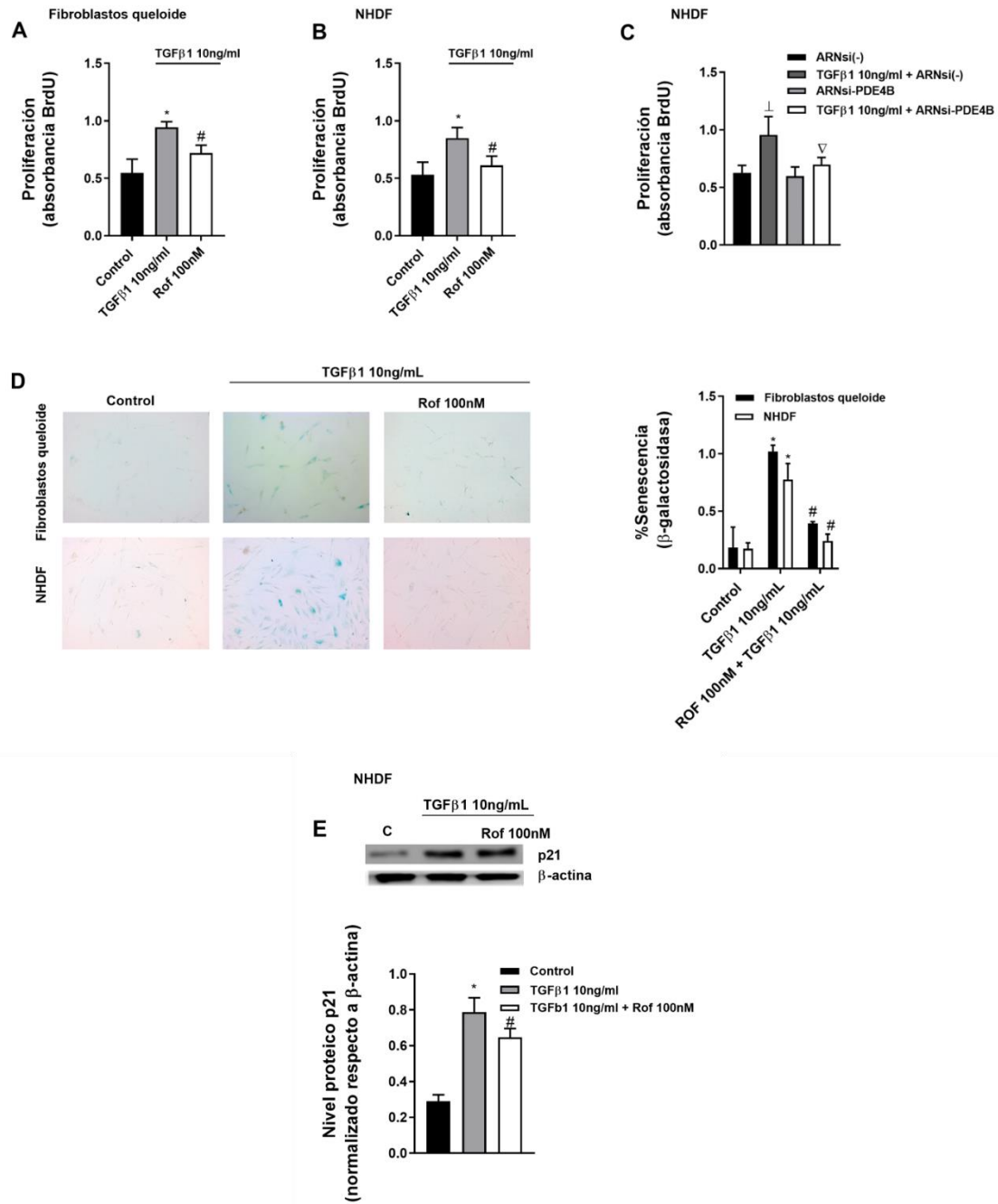
Para aclarar el papel de roflumilast en la proliferación y senescencia de fibroblastos dérmicos se procedió a la realización de los siguientes experimentos. Por un lado, en el caso de la proliferación, tanto los NHDF como los fibroblastos extraídos de tejido queloide, fueron tratados durante 30 min con el fármaco y a continuación estimulados con TGF $\beta$ 1 durante 48 h. Asimismo, en el caso de las NHDF y bajo las mismas condiciones experimentales, se procedió al análisis proteico de p21. Además, con la intención de corroborar que los efectos de roflumilast son debidos a la inhibición de la PDE4, los NHDF también fueron tratados con ARNsi(-) o ARNsi-PDE4B durante 6 h y posteriormente estimulados con TGF $\beta$ 1 durante 48 h. Por otro lado, y para el estudio de la senescencia, los NHDF y los fibroblastos de queloide fueron tratados con el fármaco en estudio durante 30 min y a continuación estimulados con TGF $\beta$ 1 durante 72 h.

Como se muestra en la **Figura 39A y B**, el estímulo consiguió incrementar la proliferación de los fibroblastos dérmicos y, roflumilast, revirtió dicho efecto siendo estadísticamente significativo *versus* TGF $\beta$ 1.

Asimismo, el estímulo, no consiguió incrementar la proliferación de los NHDF cuando estos habían sido incubados con el ARNsi-PDE4B, mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto a las células también estimuladas con TGF $\beta$ 1 e incubadas con ARNsi(-) (**Figura 39C**).

Con respecto a la senescencia, y como se observa en la **Figura 39D**, TGF $\beta$ 1 incrementó la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa, y, roflumilast, revirtió dicho efecto tanto en los NHDF como en los fibroblastos extraídos de tejido queloide.

Además, y en concordancia a lo anterior, la expresión proteica de p21 también se incrementó al tratar a los NHDF con el estímulo, y el fármaco disminuyó dicha expresión de manera estadísticamente significativa con respecto a TGF $\beta$ 1 (**Figura 39E**).



**Figura 39: Roflumilast inhibe la hiperproliferación y la senescencia de los fibroblastos dérmicos humanos estimulados con TGFβ1.** Los fibroblastos se aislaron de la dermis de muestras de tejido queloide. Los fibroblastos de origen queloide (A) y los fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) (B, E) se incubaron durante 30 minutos con roflumilast (100 nM), y luego se estimularon con el factor de crecimiento transformante β 1 (TGFβ1) 10 ng/ml durante 48 horas. (C) Los NHDF se silenciaron para PDE4B mediante ARN interferente (ARNsi-PDE4B) o con silenciamiento control (ARNsi(-)) y se estimularon durante 48 h con TGFβ1 10 ng/ml. La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo de bromodesoxiuridina (BrdU) durante 48 h. (D) Las células se tiñeron, después de 72 h de estimulación con TGFβ1 10 ng/ml, en presencia o ausencia de roflumilast, para determinar la actividad β-galactosidasa asociada a la senescencia. Se tomaron imágenes microscópicas (aumento de 40X). El gráfico muestra el porcentaje de células que expresan β-galactosidasa (células teñidas de azul) con respecto al número total de células por campo. La expresión de la proteína p21 se analizó mediante la técnica Western blot y se cuantificó mediante densitometría con respecto al control interno β-actina. Los resultados se expresan como la media ± SEM de n = 3 experimentos independientes. Las

comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0,05 frente al control; # P <0,05 frente a TGFβ1; † P <0.05 vs. Control ARNsi(-)/ARNsi-PDE4B; ▽ P <0.05 vs. ARNsi(-) TGFβ1.

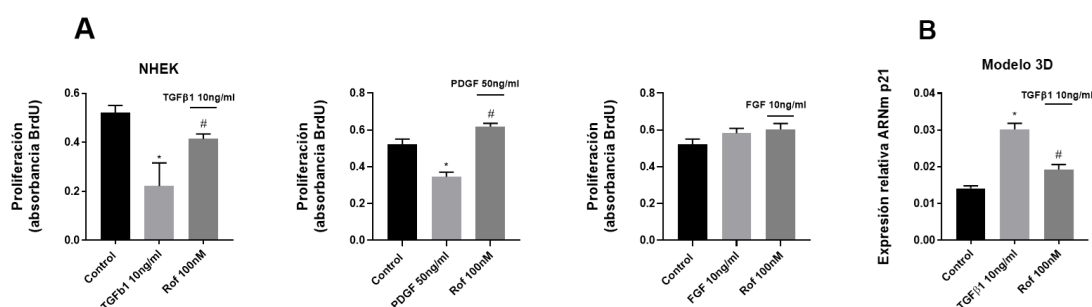
#### 4.6.2 Análisis de la proliferación y senescencia en NHEK y un modelo 3D de epidermis

Tras elucidar el papel de roflumilast y por consiguiente de la PDE4 en la proliferación y senescencia de fibroblastos dérmicos se procedió a la realización de más experimentos con el mismo objetivo en NHEK y el modelo 3D de epidermis.

En este caso, los NHEK fueron incubados con roflumilast durante 30 min y posteriormente estimulados con TGFβ1, PDGF o FGF durante 48 h para el estudio de la proliferación. El modelo 3D de epidermis, también se incubó durante 30 min con el fármaco y a continuación se estimuló únicamente con TGFβ1 durante 72 h, esta vez para el estudio de la senescencia en base al análisis de la expresión génica de p21.

Como se muestra en la **Figura 40A**, tanto TGFβ1 como PDGF disminuyeron la proliferación de los NHEK, pero FGF no produjo efecto alguno. Roflumilast contrarrestó el efecto de los estímulos incrementando la proliferación de los NHEK mostrando una diferencia estadísticamente significativa *versus* TGFβ1 y PDGF.

La expresión génica de p21 se incrementó en el modelo 3D de epidermis tras ser incubado con el estímulo, y, roflumilast, revirtió este efecto mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto a TGFβ1 (**Figura 40B**).



**Figura 40: Roflumilast previene la disminución de la proliferación de los queratinocitos dérmicos humanos y el incremento en la expresión de p21 en el modelo 3D de epidermis.** (A) Los queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK) se incubaron durante 30 minutos con roflumilast (100 nM), y luego se estimularon con el factor de crecimiento transformante β 1 (TGFβ1) 10 ng/ml, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) durante 48 horas. La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo de bromodesoxiuridina (BrdU) durante 48 h.

(B) Para la formación del modelo 3D de epidermis, se sembraron fibroblastos dérmicos de ratón (BALB/3T3) y se irradiaron con luz UV. Se sembraron los queratinocitos y se cultivaron durante 21 días. Se incubó durante 30 minutos con roflumilast (100 nM) y luego se estimuló con TGF $\beta$ 1 10 ng/ml durante 72 horas. La expresión de p21 se analizó mediante RT-PCR. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de n = 3 experimentos independientes. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \* P <0,05 frente al control; #P <0,05 frente a TGF $\beta$ 1.

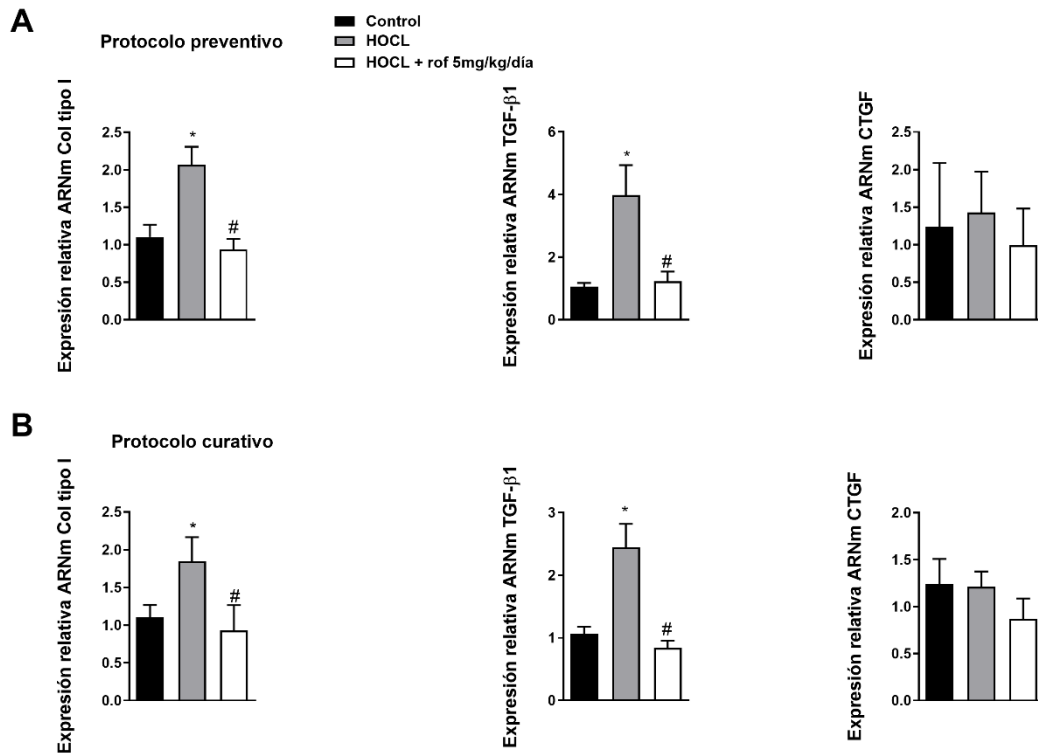
#### 4.7 Estudio de los efectos de roflumilast en un modelo *in vivo* de fibrosis cutánea

Para el análisis de los efectos de roflumilast en el modelo animal de fibrosis cutánea, se procedió al estudio, tanto a nivel proteico como genético, de marcadores involucrados en patologías que cursan con fibrosis. Además, se evaluó la integridad del tejido gracias a la tinción hematoxilina-eosina, que, por otro lado, también sirvió para estudiar el grosor de la piel. Asimismo, se hizo un análisis de la concentración de Col a través de la concentración de hidroxiprolina, de la expresión de  $\alpha$ SMA por inmunohistoquímica y de esta junto la PDE4B gracias a la co-inmunofluorescencia de ambas proteínas, y, por último, se evaluó el volumen de daño fibrótico tras el análisis de las imágenes de TC.

##### 4.7.1 Análisis *in vivo* de la expresión de marcadores de fibrosis

En lo que respecta al análisis de la expresión génica de marcadores fibróticos tales como Col tipo I, TGF $\beta$ 1 y CTGF, y tal y como se observa en la **Figura 41**, la expresión de Col tipo I y TGF $\beta$ 1 se incrementó en el modelo de esclerodermia en ratones. No fue así para CTGF, que no mostro diferencias estadísticamente significativas *versus* control. Roflumilast, disminuyó la expresión de estos marcadores tanto en el modelo curativo como en el preventivo a niveles similares al grupo control.





**Figura 41: Roflumilast inhibe la expresión de marcadores de fibrosis cutánea en un modelo animal de esclerosis sistémica.** Se utilizaron 24 ratones divididos en tres grupos homogéneos (n = 8): control, HOCL, roflumilast/HOCL. Se administraron 100 µl de HOCL (0,1 mg/ml) por vía subcutánea diariamente durante 6 semanas a los grupos correspondientes. El tratamiento farmacológico se inició el día 1 (modelo preventivo) o una vez establecida la fibrosis cutánea (modelo terapéutico). El fármaco se administró por vía oral, con sonda a una dosis de 5 mg/kg/d. El análisis de la expresión de colágeno tipo I (Col tipo I), el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1) y el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) se realizó mediante RT-PCR para el protocolo preventivo (A) y para el protocolo terapéutico (B). Los resultados se expresan como la media ± SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \* P <0,05 frente al control; #P <0,05 frente a TGFβ1.

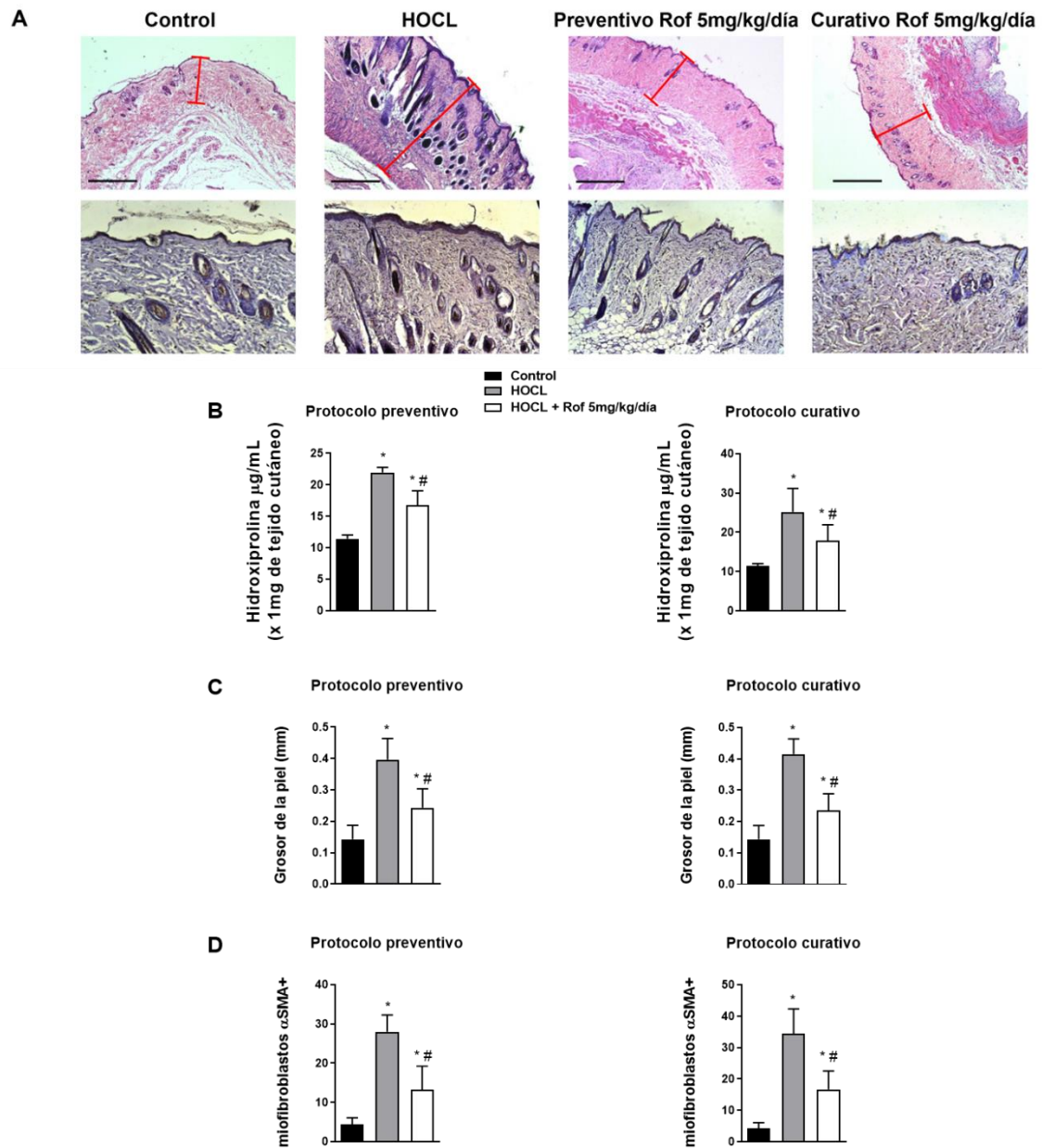
#### 4.7.2 Estudio del nivel de fibrosis, así como de la integridad del tejido *in vivo*

Como ya se ha mencionado anteriormente, también se quiso comprobar la integridad del tejido, el grosor de la piel, la concentración de Col y la expresión de αSMA.

En la **Figura 42A** se muestran imágenes representativas tanto de la tinción hematoxilina-eosina como de la inmunohistoquímica de αSMA. Como se puede observar en la medida del grosor de la piel, en el caso del grupo HOCL, esta aumenta notablemente con respecto al grupo control. Con lo que respecta a los ratones que habían sido tratados con roflumilast, el grosor de la piel fue menor que el grupo HOCL.

El análisis estadístico se muestra en la **Figura 42C**. Además, el marcaje para  $\alpha$ SMA, fue mayor en el grupo HOCL en comparación al resto de grupos, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y HOCL, y HOCL *versus* tratamientos curativo y preventivo (**Figura 42A y D**).

La medición de la hidroxiprolina resultó mayor en el grupo de ratones a los que se había administrado únicamente HOCL. Estos, mostraron diferencias estadísticamente significativas *versus* control, pero también *versus* tratamiento curativo y preventivo (**Figura 42B**).

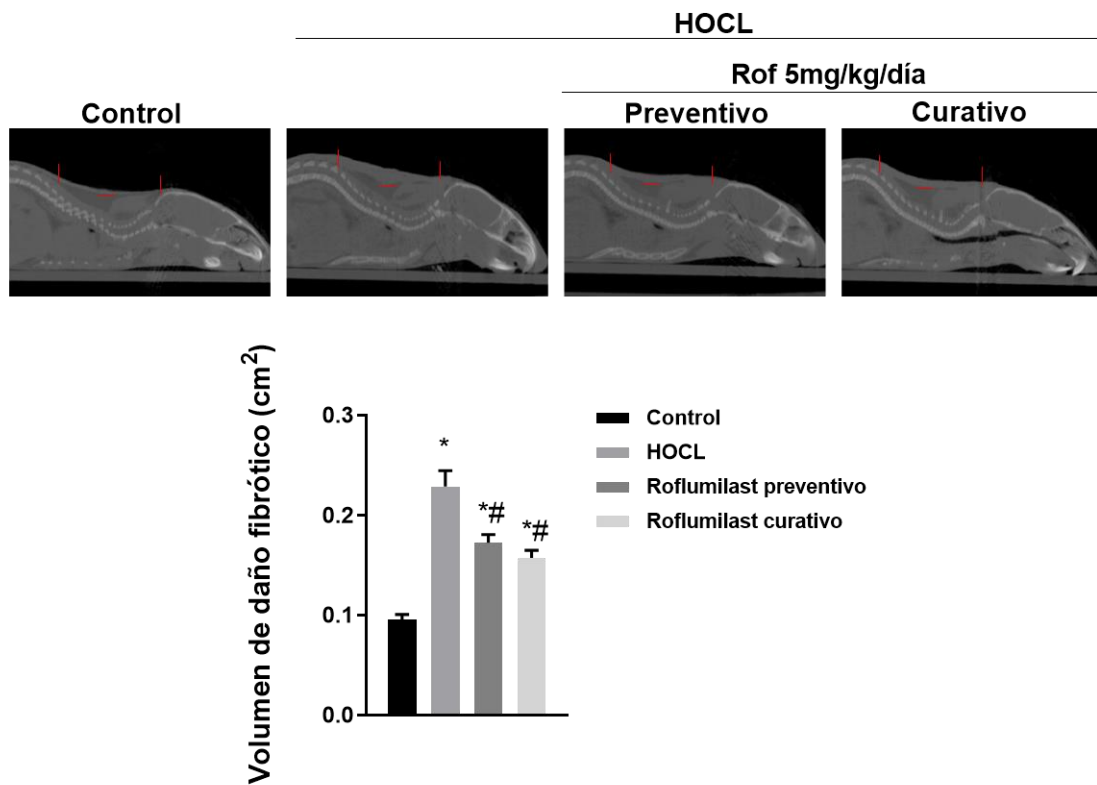


**Figura 42: Roflumilast mitiga las características básicas de la fibrosis cutánea, como son el aumento de la deposición de colágeno, la hiperproliferación de miofibroblastos y el engrosamiento de la piel en un modelo animal de esclerosis sistémica.** Se utilizaron 24 ratones divididos en tres grupos homogéneos ( $n = 8$ ): control, HOCL, roflumilast/HOCL. Se administraron 100  $\mu\text{l}$  de HOCL (0,1 mg/ml) por vía subcutánea diariamente durante 6 semanas a los grupos correspondientes. El tratamiento farmacológico se inició el día 1 (modelo preventivo) o una vez establecida la fibrosis cutánea (modelo terapéutico). El fármaco se administró por vía oral, con sonda, a una dosis de 5 mg/kg/d. (A) Imágenes representativas del tejido cutáneo para los grupos control, HOCL, protocolo preventivo y protocolo terapéutico sometidos a tinción hematoxilina-eosina (arriba) e inmunohistoquímica para  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha\text{SMA}$ ) (abajo). Concentración de hidroxiprolina en piel para el protocolo preventivo (B) y terapéutico (E). Medición del espesor de la piel para el protocolo preventivo (C) y terapéutico (F). Número de células  $\alpha\text{SMA}+$  por campo para el protocolo preventivo (D) y terapéutico (G). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*  $P < 0,05$  frente al control; # $P < 0,05$  frente a TGF $\beta$ 1.

#### 4.7.3 Análisis de las imágenes de tomografía computarizada

Con la finalidad de medir el volumen de daño fibrótico en el tejido cutáneo para los diferentes grupos del modelo animal, y a fin de certificar que se había inducido la fibrosis cutánea, se tomaron imágenes de TC.

Como se muestra en la **Figura 43**, el volumen de daño fibrótico fue significativamente mayor en el grupo de ratones HOCL. Este grupo también mostró diferencias estadísticamente significativas con los grupos tratadas con roflumilast.



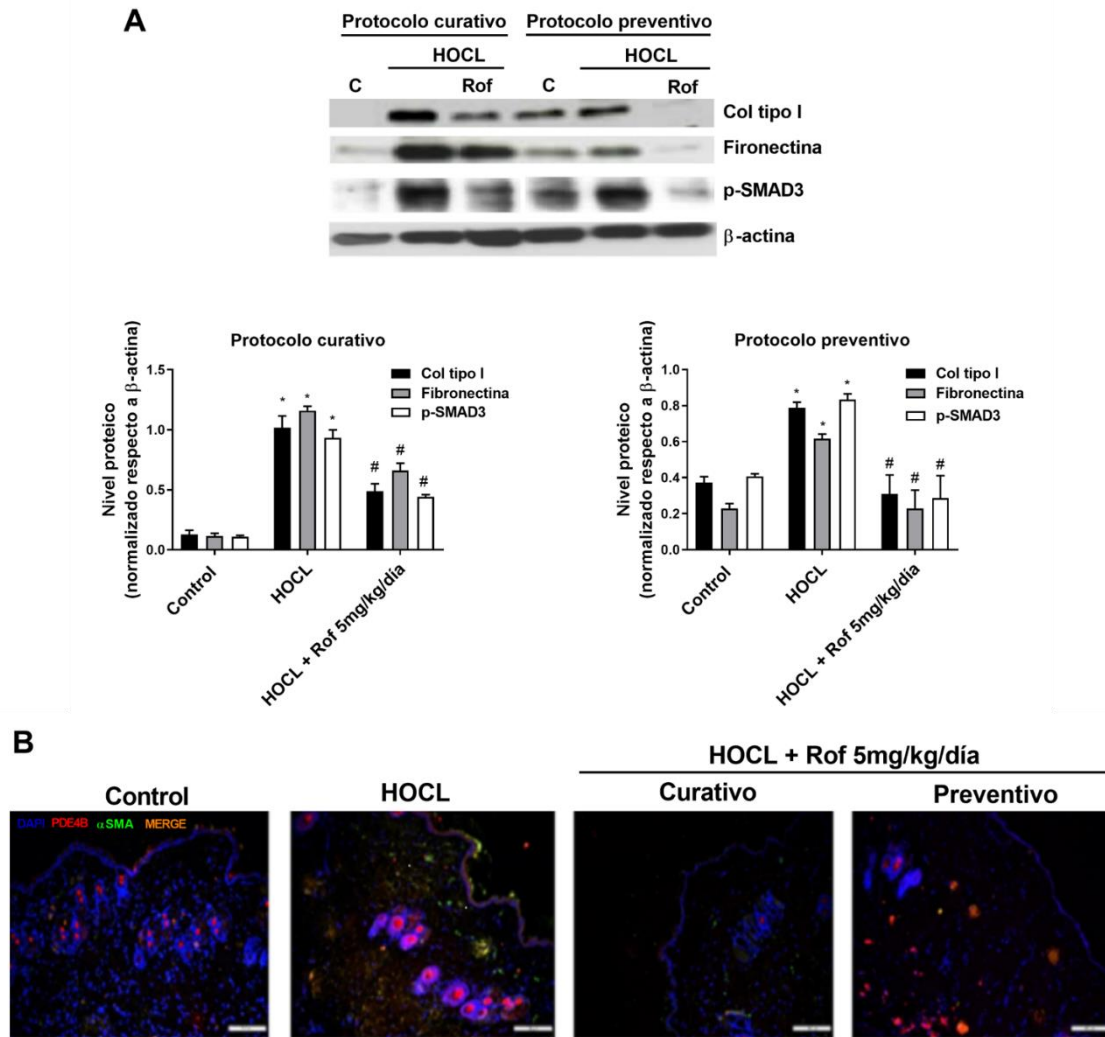
**Figura 43: Roflumilast reduce el volumen de lesión fibrótica en un modelo animal de esclerosis sistémica.** Se utilizaron 24 ratones divididos en tres grupos homogéneos (n = 8): control, HOCL, roflumilast/HOCL. Se administraron 100 µl de HOCL (0,1 mg/ml) por vía subcutánea diariamente durante 6 semanas a los grupos correspondientes. El tratamiento farmacológico se inició el día 1 (modelo preventivo) o una vez establecida la fibrosis cutánea (modelo terapéutico). El fármaco se administró por vía oral, con sonda, a una dosis de 5 mg/kg/d. Se adquirieron imágenes de micro tomografía computarizada (TC) el día 41. Medición del volumen de la lesión fibrótica en el modelo animal. Los resultados se expresan como media ± SEM. El ANOVA de una vía fue seguido por la prueba de Bonferroni post hoc. \* P <0,05 frente al control; #P <0,05 frente a HOCL.

#### 4.7.4 Análisis del papel de la PDE4 en la expresión de marcadores fibróticos y la fosforilación de SMAD3

Para finalizar los experimentos del modelo animal, se procedió al análisis de la expresión proteica de marcadores de la fibrosis tales como Col tipo I y Fibronectina, así como la fosforilación de SMAD3. Además, a fin de corroborar la sobre-expresión de  $\alpha$ SMA y de la PDE4 en el modelo animal, se llevó a cabo una co-inmunofluorescencia.

En concordancia a los experimentos *in vitro*, hubo una sobre-expresión de Col tipo I y Fibronectina en los animales a los que se les había inducido la fibrosis cutánea. Asimismo, la fosforilación de SMAD3 también se incrementó en este grupo. Roflumilast, tanto en el tratamiento preventivo como en el curativo, consiguió disminuir la expresión de estos marcadores de fibrosis, así como la fosforilación de SMAD3, mostrando diferencias estadísticamente significativas *versus* HOCL (**Figura 44A**).

Tal y como se muestra en la **Figura 44B**, tanto  $\alpha$ SMA como la PDE4B estaban sobre-expresadas en la epidermis y la dermis de los animales a los que se les había administrado únicamente HOCL. Además, el fármaco consiguió disminuir dicha expresión en ambos modelos, el preventivo y el curativo.



**Figura 44: Roflumilast disminuye la expresión de marcadores de fibrosis en un modelo animal de esclerosis sistémica.** Se utilizaron 24 ratones divididos en tres grupos homogéneos ( $n = 8$ ): control, HOCL, roflumilast/HOCL. Se administraron 100  $\mu$ l de HOCL (0,1 mg/ml) por vía subcutánea diariamente durante 6 semanas a los grupos correspondientes. El tratamiento farmacológico se inició el día 1 (modelo preventivo) o una vez establecida la fibrosis cutánea (modelo terapéutico). El fármaco se administró por vía oral, con sonda, a una dosis de 5 mg/kg/d. (A) La expresión proteica de colágeno tipo I (Col tipo I), Fibronectina y p-SMAD3 se analizó mediante la técnica Western blot y se cuantificó mediante densitometría con respecto al control interno  $\beta$ -actina. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \* $P < 0,05$  frente al control; #  $P < 0,05$  frente a HOCL. (B) La expresión de fosfodiesterasa 4 B (PDE4B) y  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) se analizó mediante co-inmunofluorescencia. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal Leica TCS SP2. Escala 100  $\mu$ m. Los cortes de tejido se marcaron con anticuerpos para PDE4B (rojo) y  $\alpha$ SMA (verde).







## **5 DISCUSIÓN**



La hipótesis de este trabajo de tesis doctoral está centrada en el posible papel de la PDE4 en la fibrosis cutánea, así como en el potencial papel de los inhibidores de la PDE4 como fármacos antifibróticos en los desórdenes fibróticos de la piel. Los inhibidores de la PDE4 han sido aprobados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas como la EPOC, psoriasis y artritis psoriásica. Sin embargo, esta clase de fármacos presenta un perfil bajo de seguridad derivado de los efectos adversos gastrointestinales que, a menudo, provocan la discontinuación del tratamiento (103). Estudios recientes han mostrado que la inhibición selectiva de la isoforma PDE4B carece de estos efectos adversos, por lo que hoy en día, la industria farmacéutica está dirigiendo los esfuerzos en el desarrollo de nuevas moléculas selectivas inhibitoras de la PDE4B (127).

Aunque se conocen los efectos antifibróticos de los inhibidores de la PDE4 (117,128–132), no existe evidencia de su papel en los desórdenes fibróticos de la piel como las cicatrices hipertróficas y los queloides. Por ello, este trabajo de tesis doctoral ha profundizado en el análisis de la expresión y distribución de las diferentes isoformas de PDE4 en tejido cutáneo sano y fibrótico, así como la potencial utilidad de la inhibición de la PDE4 y la PDE4B en los procesos fibróticos cutáneos tanto *in vitro* como *in vivo*, descifrando los diferentes mecanismos de acción que pueden explicar dichos efectos antifibróticos.

Los resultados originales de esta tesis doctoral se resumen en tres puntos; A) Las diferentes isoformas de PDE4 se encuentran sobre-expresadas en tejido cutáneo fibrótico, siendo la isoforma con mayor expresión la PDE4B, mostrando una localización predominante en fibroblastos/miofibroblastos y en queratinocitos. B) La inhibición farmacológica de PDE4 con roflumilast y la supresión genética de la PDE4B muestran efectos antifibróticos, inhibiendo la activación de fibroblastos y queratinocitos, la deposición de MEC, estrés oxidativo, además de su proliferación y senescencia tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. C) La inhibición de la PDE4B es capaz de bloquear las fosforilaciones de ERK1/2 y SMAD3 y de inhibir el estrés oxidativo generado por NOX4, lo cual redundará en una disminución de la expresión de moléculas fibróticas tanto en fibroblastos de la dermis como en queratinocitos. Los resultados de esta tesis doctoral no se han observado previamente y señalan a la

PDE4B como una diana farmacológica potencial para tratar los procesos fibróticos cutáneos comunes a diferentes patologías dérmicas como son las cicatrices hipertróficas, queloides o la ES.

El análisis de expresión génica y proteica de las isoformas de la PDE4 mostró una sobre-expresión en las cicatrices hipertróficas y en el tejido queloide *versus* piel sana. Estas diferencias en la expresión también resultaron estadísticamente significativas al comparar los dos tipos de cicatrices aberrantes entre sí, siendo, el tejido queloide, quien muestra una mayor sobre-expresión de la PDE4A, PDE4B, PDE4C y PDE4D. Además, estos hallazgos también se han podido observar en el modelo 3D de epidermis tras ser estimulado con TGF $\beta$ 1. En todos los casos, la PDE4B fue la isoforma de la PDE4 más sobre-expresada, lo que sugiere que una inhibición específica de esta isoforma podría resultar beneficioso para patologías que cursan con fibrosis cutánea al reducirse así los efectos secundarios. Futuros estudios, por lo tanto, podrían probar los efectos de inhibidores específicos de la PDE4B como el BI 1015550 en fibrosis cutánea. Este compuesto se encuentra actualmente en un ensayo clínico en fase II para la FPI (Identificador de ClinicalTrials.gov: NCT04419506).

No existe bibliografía previa acerca de la expresión de las isoformas de la PDE4 en fibrosis cutánea pero sí en otros tipos de fibrosis como la fibrosis pulmonar y hepática. En el caso de la fibrosis pulmonar un estudio previo ha demostrado que en una línea celular de células epiteliales de pulmón (A549) estimuladas con TGF $\beta$ 1 hubo una sobre-expresión de la PDE4A y la PDE4D, mientras que la PDE4B y PDE4C no mostraron diferencias estadísticamente significativas (133). En la fibrosis hepática, otros grupos de investigación han realizado estudios en modelos animales de rata donde ha quedado probado el incremento en la expresión de la PDE4A, PDE4B y la PDE4D (134,135).

Tanto nuestros resultados, como los mencionados anteriormente, sugieren un papel clave de la PDE4 en la fibrosis tisular (133–135), por lo que la inhibición de la PDE4 tanto farmacológicamente como genéticamente podría inhibir la fibrosis cutánea tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se han descrito números marcadores de fibrosis en la literatura. Sin embargo, la acumulación y sobre-expresión de componentes de la MEC, como son el Col tipo I y la fibronectina, son comunes en la mayoría de ellos. Asimismo, el aumento de factores de crecimiento profibróticos como son el TGF $\beta$ 1 y CTGF también están presentes de forma universal en los diferentes procesos fibróticos. La acumulación de miofibroblastos, caracterizada por la expresión de fibras de  $\alpha$ SMA y componentes de la MEC, confiere a este tipo celular características intermedias entre fibroblasto y células de musculo liso, lo que permite un mayor poder migratorio e invasivo, así como la capacidad de crear un entorno fibrótico mediante la secreción de MEC. Estas células se originan, entre otros tipos celulares, a partir de los fibroblastos residentes que sufren la TFM. Además, durante los procesos fibróticos, las células epiteliales pierden su fenotipo, adquiriendo capacidad invasiva, mediante la TEM, lo que les confiere un fenotipo de miofibroblasto con las características ya comentadas. Los marcadores más usados para describir estos procesos son la pérdida de expresión de marcadores epiteliales tales como la E-cadherina y ZO-1, así como el aumento de marcadores mesenquimales como N-cadherina,  $\alpha$ SMA, y Col tipo I. Tanto la TFM como la TEM son procesos que pueden revertirse estableciendo de nuevo el fenotipo original gracias a la TMF y la TME respectivamente (4,6,7).

En esta tesis doctoral se ha corroborado el incremento de marcadores fibróticos tales como Col tipo I,  $\alpha$ SMA, fibronectina, N-cadherina y TGF $\beta$ 1, pero, además, se ha visto por primera vez que hay una disminución en la expresión de la ZO-1 y la E-cadherina tanto en las cicatrices hipertróficas como en los queloides. Otros autores han descrito previamente el incremento en la expresión de Col tipo I,  $\alpha$ SMA, fibronectina y TGF $\beta$ 1 tanto en las cicatrices hipertróficas como en los queloides (80,81,136,137). El análisis de marcadores fibróticos es importante para poder diagnosticar correctamente este tipo de procesos de cicatrización anormales ya que existe controversia entre los autores (137). Actualmente el diagnóstico se realiza de forma visual, de manera subjetiva por la valoración de un facultativo. En este sentido, hubo un estudio en el que se analizaron histológicamente un total de 568 queloides, los cuales habían sido diagnosticados visualmente. Los investigadores concluyeron que solo el 81% resultaron ser queloides finalmente, y que del 19% restante, el 6% se

trataba de cicatrices hipertróficas (138). Nuestros resultados muestran una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de Col tipo I,  $\alpha$ SMA, fibronectina, TGF $\beta$ 1, ZO-1 y E-cadherina, siendo mayor para los marcadores de fenotipo mesenquimal e inferior para los marcadores de fenotipo epitelial en el caso de los queloides *versus* cicatrices hipertróficas. Estos hallazgos sugieren que estas proteínas podrían utilizarse como biomarcadores para el diagnóstico diferencial de estas afecciones.

Con respecto a los experimentos *in vitro*, nuestros resultados muestran como TGF $\beta$ 1 induce la TFM, incrementando la expresión de Col tipo I, calponina,  $\alpha$ SMA, CTGF, FAP, fibronectina, IGFBP3 y PAI-1 en NHDF, y como roflumilast previene el aumento en la expresión de estos marcadores de la TFM. Además, este trabajo doctoral muestra como TGF $\beta$ 1 incrementa la expresión de Col tipo I y fibronectina y disminuye la de E-cadherina y ZO-1 en el modelo 3D de epidermis y como el inhibidor de la PDE4 previene los cambios en la expresión de estos marcadores de la TEM. Estos últimos hallazgos se corroboraron con la medición en la expresión de Col tipo I y E-cadherina en NHEK tras estimular a las células con TGF $\beta$ 1 y tratarlas con roflumilast, donde se obtuvieron los mismos resultados. Por lo tanto, el inhibidor de la PDE4 podría disminuir la población de miofibroblastos al prevenir la TFM y la TEM.

Los resultados expuestos anteriormente son novedosos ya que no existe bibliografía previa acerca de la TFM o la TEM en fibroblastos de la dermis o queratinocitos, respectivamente, estimulados con TGF $\beta$ 1 y tratados con roflumilast. Existe un estudio en el que los investigadores aislaron fibroblastos de piel de individuos sanos y de pacientes con ES y probaron los efectos de rolipram sobre marcadores de la TFM tras estimular a las células con TGF $\beta$ 1. Los autores concluyeron que el inhibidor de la PDE4 de primera generación no era capaz de prevenir la TFM al no mostrar diferencias estadísticamente significativas *versus* TGF $\beta$ 1 en la expresión de PAI-1 y Col tipo I (139). Otro estudio investigó el efecto de rolipram sobre la ruta canónica dependiente de SMAD aguas debajo de TGF $\beta$ 1 en la línea celular de células epiteliales de pulmón A549. Los investigadores llegaron a la conclusión de que el inhibidor de la PDE4 era capaz de prevenir la TEM pero de una manera independiente a esta ruta molecular, ya que el fármaco no fue capaz de inhibir la fosforilación ni de SMAD2 ni de SMAD3 (133). No existe bibliografía previa acerca del efecto de rolipram

en las rutas moleculares aguas abajo de TGF $\beta$ 1 en fibroblastos. Nuestros resultados muestran como roflumilast inhibe la fosforilación tanto de ERK1/2 como de SMAD3 en NHDF. Así pues, futuros estudios, podrían elucidar el mecanismo de acción de rolipram en fibroblastos de la dermis ya que un mecanismo de acción diferente aguas abajo de TGF $\beta$ 1 para rolipram y roflumilast podría explicar la controversia entre estos y nuestros resultados.

Con respecto al estudio de la TMF, nuestros resultados muestran como roflumilast disminuye la expresión de todos los marcadores estudiados excepto la de CTGF. El inhibidor de la PDE4 tampoco fue capaz de revertir la expresión de este factor de crecimiento en el modelo animal de fibrosis cutánea inducida por HOCL. Aun así, estas evidencias sugieren que el fármaco es capaz de revertir la TFM y promover por tanto la TMF.

Experimentos previos de nuestro grupo demostraron que roflumilast sí que era capaz de revertir la expresión de CTGF en un modelo animal de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (117).

CTGF, es un agente profibrótico cuya expresión es inducida por TGF $\beta$  en el tejido de granulación dérmico (140). Existe controversia en los efectos de este factor de crecimiento según el tipo celular. Por ejemplo, en un estudio que se hizo sobre fibroblastos de córnea, CTGF no consiguió incrementar la expresión de  $\alpha$ SMA por lo que no fue capaz de inducir la TFM (141). En otro estudio que se hizo sobre fibroblastos de la cápsula de Tenon, esta proteína sí que incrementó la expresión de  $\alpha$ SMA, Col tipo I y fibronectina (142). Sería interesante, por lo tanto, dado estos hallazgos y nuestros resultados, estudiar los efectos de CTGF en fibroblastos de la dermis, ya que la sobre-expresión aislada de esta proteína puede que no tenga efectos relevantes sobre los mecanismos celulares que inducen la fibrosis cutánea.

Otro estudio con células epiteliales de la córnea, elucidó la ruta molecular aguas abajo de TGF $\beta$ 1 que inducía la expresión de CTGF en este tipo celular, llegando a la conclusión de que se trataba de la ruta Ras/MEK/ERK (140). Como se ha mencionado con anterioridad, nuestros resultados demuestran que roflumilast disminuye la fosforilación de ERK1/2 y de SMAD3 en NHDF a pesar de tratar a las células con TGF $\beta$ 1,

por lo que la ruta molecular aguas debajo de TGF $\beta$ 1 que induce la expresión de este factor de crecimiento en este tipo celular no es ni la ruta Ras/MEK/ERK ni la ruta canónica dependiente de SMAD. Futuros estudios podrían investigar que ruta de señalización es la que induce la expresión de CTGF en los fibroblastos de la dermis.

Con respecto al estudio de la TME en el modelo 3D de epidermis, nuestros resultados sugieren que roflumilast solo es capaz de revertir la disminución en la expresión de la ZO-1 y no de la E-cadherina. El fármaco tampoco revirtió el incremento en la expresión de fibronectina y Col tipo 1. Estudios futuros podrían investigar la expresión de más marcadores de la TME como N-cadherina o vimentina o la incubación, en este caso, del modelo 3D de epidermis, una vez inducida la TEM, con roflumilast, durante periodos de tiempo más prolongados. En este sentido se sabe, por ejemplo, que en la TEM, en el caso de las células epiteliales de mama, la disminución en la expresión de la ZO-1 a nivel proteico ocurre en los primeros estadios de la transición inducida por TGF $\beta$ 1 (24h) pero, sin embargo, la E-cadherina disminuye su expresión a los 3 días (143), hecho que también podría estar ocurriendo en la TME y que podría explicar que la expresión de E-cadherina no aumente con el fármaco a las 24h.

Por otro lado, este trabajo doctoral muestra que la inhibición con el ARNsi de la PDE4B previene la TFM al disminuir la expresión de Col tipo I y  $\alpha$ SMA en NHDF, y que también inhibe la TEM al reducir la expresión de Col tipo I e incrementar la de E-cadherina en NHEK. Además, en ambos tipos celulares, el silenciamiento de la PDE4B redujo la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la PDE4B está involucrada en la TEM y en la TFM inducida por TGF $\beta$ 1. Además, gracias a estos experimentos, se ha podido corroborar que los efectos de roflumilast se deben a la inhibición de la PDE4.

La inhibición de la PDE4 se traduce en un incremento del AMPc (115). Nuestro resultados están en concordancia con otros trabajos que han demostrado, por ejemplo, que el incremento de la concentración del AMPc provoca una inhibición de la TEM (144). Otros autores llegaron a la conclusión de que la prostaglandina E2 era



capaz de inhibir la TFM al incrementar la concentración de AMPc en fibroblastos procedentes de cicatrices hipertróficas y estimulados con TGFβ1 (145).

Actualmente se considera que el origen de la fibrosis normalmente se debe a una inflamación persistente ocasionada por diferentes estímulos (8). En los procesos inflamatorios, las células involucradas generan un ambiente hostil gracias a la liberación, entre otros factores de crecimiento y citocinas, de ERO (29). Hay pocos estudios acerca del papel del estrés oxidativo y la formación de queloides y heridas hipertróficas. En este sentido, se ha probado que hay un incremento en la liberación de ERO en este tipo de cicatrizaciones aberrantes en comparación a la piel sana y que además, la generación de estas especies por la vía NOX contribuye a la fisiopatología de las heridas crónicas (86,90). Nuestros resultados muestran por primera vez que hay una sobre-expresión de NOX4 tanto en las cicatrices hipertróficas como en el tejido que loide. Además, la expresión de esta proteína se vio incrementada tanto en la dermis y como en la epidermis. Por otro lado, se ha podido observar el aumento en la generación de las ERO tras estimular a los NHDF y al modelo 3D de epidermis con TGFβ1, y como roflumilast inhibe la generación de ERO en estos modelos *in vitro*. Asimismo, tanto el inhibidor de la PDE4 como el tratamiento de las células con el ARNsi-PDE4B consiguieron prevenir la expresión de NOX4 inducida por TGFβ1 en NDHF y NHEK. Estos resultados sugieren que roflumilast previene la generación de ERO al inhibir la expresión de NOX4, y que, por lo tanto, podría contribuir a la disminución de la generación de ERO en afecciones tales como cicatrices hipertróficas y queloides.

En relación a lo anterior, nuestros resultados demuestran que TGFβ1 activa a Nrf2 *in vitro*, y que, el inhibidor de la PDE4 disminuye dicha activación probablemente al inhibir previamente la generación de ERO vía NOX4. Sobre la expresión de Nrf2, existe un estudio que apunta a que hay una menor expresión de este factor transcripcional en tejido que loide, por lo que sugieren un sistema antioxidante defectuoso y por lo tanto una desregulación a la baja de la apoptosis celular (91). En el caso de la ES, también se ha demostrado una disminución en la expresión de Nrf2 en pacientes y los efectos beneficiosos del tratamiento de fibroblastos de origen murino de un modelo de ES con dimetilfumarato, activador de Nrf2 (146). Otro estudio demostró, además de la disminución tanto en la expresión como en activación de Nrf2

en las biopsias de piel de pacientes con ES, que el silenciamiento de este factor transcripcional resultó en un incremento en la deposición de Col de manera constitutiva y que, el tratamiento de los fibroblastos de piel, además de con TGF $\beta$ 1, con activadores de Nrf2, produjo una disminución en la expresión tanto de  $\alpha$ SMA como de Col (147). Todos estos resultados abren la puerta a estudios futuros donde se podrían probar los efectos de la combinación de roflumilast con un activador de Nrf2 en modelos de fibrosis cutánea.

Además, en el caso de los queloides, hay un mayor acortamiento de los telómeros *versus* piel sana (100), lo que podría relacionarse con un incremento en la generación de ERO y una inducción prematura de la senescencia por estrés oxidativo (99). En relación a estos estudios, y tal y como cabría esperar, nuestros resultados muestran como la senescencia celular aumenta al tratar a las células con TGF $\beta$ 1 en NHDF y fibroblastos extraídos de tejido queloide, y como disminuye cuando se incubaba a las células con roflumilast. Estos efectos del inhibidor de la PDE4 se corroboraron con el análisis proteico y genético de p21 en NHDF y el modelo 3D de epidermis respectivamente.

Por otro lado, ha quedado probado en estudios anteriores, que en el caso de los queloides, hay una sobre-expresión del T $\beta$ RI y T $\beta$ RII y, que el tratamiento con inhibidores de TGF $\beta$ 1 en modelos *in vivo* resulta en una menor aparición de cicatrices, una disminución en la deposición de Col y fibronectina, así como una reducción en la expresión de  $\alpha$ SMA y CTGF (36–38). Además, se sabe que los fibroblastos procedentes de este tipo de tumores benignos fibroproliferativos son más susceptibles a este factor de crecimiento (148). En este sentido, nuestros resultados muestran por primera vez como roflumilast reduce la expresión de  $\alpha$ SMA y de Col tipo I, así como la fosforilación de SMAD3 y de ERK1/2 en fibroblastos extraídos de tejido queloide y estimulados con TGF $\beta$ 1. Estas evidencias sugieren que el fármaco previene la TFM de fibroblastos extraídos de tejido queloide al inhibir tanto la ruta canónica dependiente de SAMD como una de las rutas no canónicas aguas abajo de TGF $\beta$ 1.

En el caso de los queratinocitos, TGF $\beta$ 1 detiene la proliferación de este tipo celular para inducir un cambio fenotípico y aumentar la población de células

mesenquimales (10). Nuestros resultados corroboran que este factor de crecimiento disminuye la proliferación de los NHEK, pero, además, se ha visto que roflumilast, previene esta disminución mostrando diferencias estadísticamente significativas *versus* estímulo.

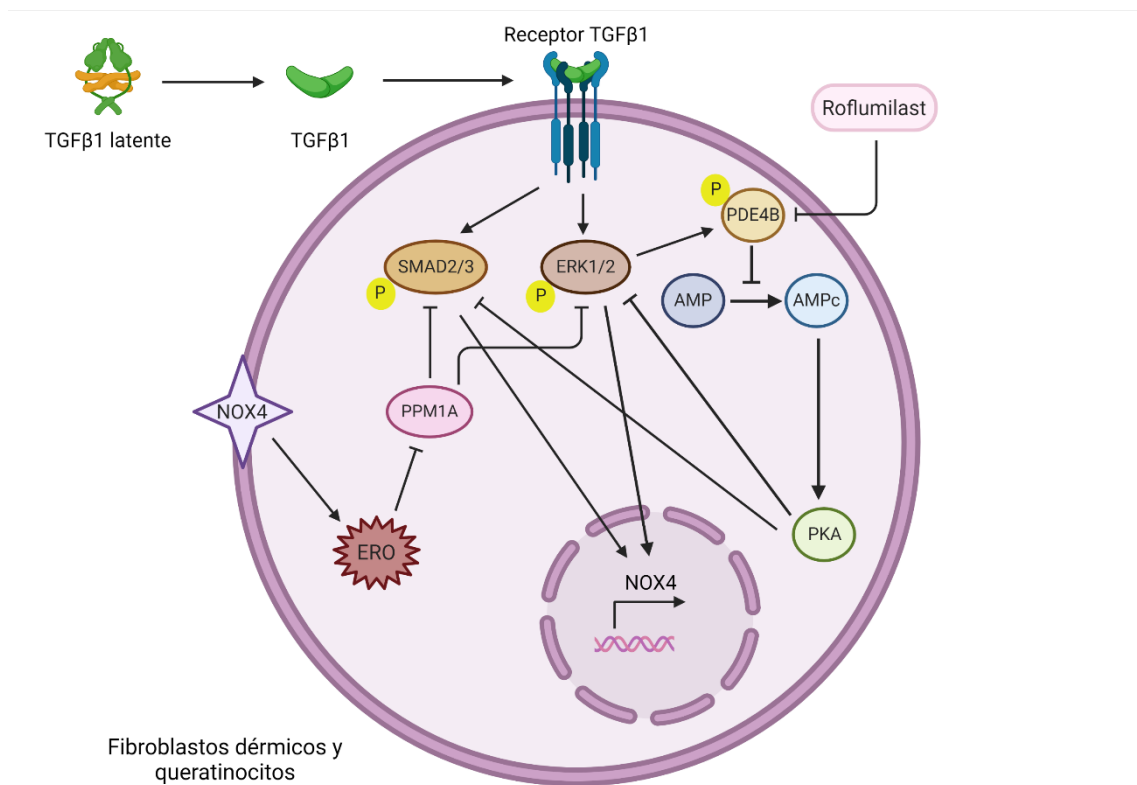
No hay bibliografía acerca de los efectos del PDGF sobre la proliferación en NHEK. Este factor de crecimiento es una glicoproteína que consta de dos cadenas unidas por enlaces disulfuro. Existen dos cadenas, A y B, codificadas por genes diferentes, por lo tanto, existen tres isoformas distintas según la combinación de estas cadenas: PDGF-AA, PDGF-AB y PDGF-BB. Además, estas isoformas no son funcionalmente idénticas (149). Por otro lado, existe controversia acerca de la expresión de los receptores para PDGF en queratinocitos humanos (150,151). Además, existe un estudio sobre los efectos del PDGF sobre queratinocitos de rata en el que los autores llegan a la conclusión de que este factor de crecimiento incrementa la proliferación de este tipo celular (152). Nuestros resultados muestran por primera vez como el PDGF-BB disminuye la proliferación de los NHEK y como roflumilast previene dicho efecto.

Con respecto a los efectos de TGF $\beta$ 1 sobre los fibroblastos, se sabe que este factor de crecimiento incrementa la proliferación tanto de fibroblastos normales como de fibroblastos extraídos de tejido queloide (13,148). Nuestros resultados corroboran el aumento en la proliferación tanto de los NHDF como de los fibroblastos extraídos de tejido queloide, pero, además, se ha podido probar que la proliferación disminuye en ambos tipos celulares al tratar a las células con roflumilast. Asimismo, esta disminución en la proliferación, a pesar de tratar a las células con el estímulo, también se observó al inhibir la expresión de la PDE4B con el ARNsi.

Ya se han probado los efectos beneficiosos del inhibidor de la PDE4 en otros modelos animales de fibrosis (117,134,153), pero nunca se ha investigado en modelos *in vivo* de fibrosis cutánea. Este trabajo doctoral muestra por primera vez que el inhibidor de la PDE4 previene, pero también revierte, el incremento en el engrosamiento de la piel y el volumen de daño fibrótico inducido por el HOCL en ratones. Además, también disminuye, tanto en modelo preventivo como en modelo

curativo, el depósito de Col y la expresión de Col tipo I tanto a nivel proteico como genético. Asimismo, el inhibidor de la PDE4 previene y revierte el incremento en la expresión de TGFβ1, αSMA y fibronectina, así como la incremento en la fosforilación de SMAD3. Estos hallazgos sugieren que el uso de roflumilast podría resultar beneficioso como tratamiento para patologías que cursen con fibrosis cutánea.

Gracias a los experimentos con otros compuestos, los cuales tienen un mecanismo de acción conocido, se ha podido elucidar el mecanismo de acción de roflumilast en NHDF y NHEK estimulados con TGFβ1 (**Figura 45**).



**Figura 45: Mecanismo de acción de roflumilast.** El inhibidor de la PDE4 es capaz de aumentar la concentración intracelular del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y por lo tanto activar a la *protein kinase A* (PKA). Esto a su vez, inhibe la fosforilación de ERK1/2 y de SMAD2/3. Además, el fármaco reduce la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) a través de la NADPH oxidasa 4 (NOX4), hecho que también disminuye la fosforilación de ERK1/2 y de SMAD2/3. Creada con BioRender.

Como ya se sabía, el fármaco actúa inhibiendo a la PDE4, lo que aumenta la concentración del AMPc intracelular activando por tanto a la PKA (113,115). Nuestros resultados están en concordancia con lo anterior ya que, al incubar a las células, además de con el fármaco, con TGFβ1 y KT5720, inhibidor de la PKA, roflumilast no

consigue reducir ni la fosforilación de SMAD3 ni de ERK1/2. Por lo tanto, la inhibición de estas rutas de señalización aguas abajo de TGFβ1 por roflumilast esta mediada por la activación de la PKA.

Al igual que ocurre con las células epiteliales de bronquio (118), nuestros resultados muestran que en el caso de los NHDF y de los NHEK, el fármaco inhibe tanto la fosforilación de SMAD3 como de ERK1/2 al igual que SIS3 y PD98059, inhibidores de estas rutas de señalización respectivamente. Además, en el caso de los queratinocitos, se ha visto que cuando se incubaba a las células con SIS3 la fosforilación de ERK1/2 disminuye, y, de la misma manera, cuando se incubaba a las células con PD98059, la fosforilación de SMAD3 también es menor *versus* TGFβ1. Es decir que, en el caso de las células epiteliales de la piel, la inhibición de la fosforilación de una de estas proteínas provoca además los mismos efectos en la otra, por lo que cabría estudiar una posible interacción entre las mismas.

Como se ha mencionado anteriormente, roflumilast disminuye la generación de ERO y la expresión de NOX4 tanto en los NHDF como en los NHEK. En relación a estos resultados, cabría esperar un aumento de la expresión de PPM1A, ya que esta proteína es inhibida por las ERO. Esta tesis doctoral muestra que el inhibidor de la PDE4 es capaz de incrementar la expresión de PPM1A probablemente al reducir la generación de las ERO, ya que los resultados son similares al tratar a las células con NAC, inhibidor de las ERO. Además, la generación de ERO, está relacionada con la fosforilación de SMAD3 y ERK1/2, ya que, al tratar a las células con sanguinerine, inhibidor de PPM1A, y roflumilast, la fosforilación de dichas proteínas está incrementada con respecto al control.

Además, ya se ha probado con anterioridad la interacción entre la PDE4B y ERK1/2 y que, dicha interacción, conlleva la activación de esta isoforma de la PDE4 tras ser fosforilada por ERK1/2 (110). Nuestros resultados corroboran que estas proteínas interaccionan tanto en los NHDF como en los NHEK tras ser estimuladas con TGFβ1, y en el modelo *in vivo* de fibrosis cutánea inducida por HOCL. Además, se ha visto que la fosforilación de la PDE4B disminuye cuando las células se tratan además de con TGFβ1 con roflumilast, tal y como ocurre con PD98059. Estos resultados muestran como

roflumilast disminuye indirectamente la fosforilación de la PDE4B al disminuir la fosforilación de ERK1/2 a través de la PKA y reducir la generación de ERO.

Otros autores, incluidos nuestro grupo, han demostrado los efectos beneficiosos de roflumilast en diferentes tipos de fibrosis como la fibrosis pulmonar o la fibrosis hepática (117–119,134,153), pero, hasta la fecha, no existen evidencias de los efectos del inhibidor de la PDE4 sobre modelos de fibrosis cutánea. Además, tanto en el caso de la ES como de las cicatrices hipertróficas y los queloides, actualmente existen una variedad de tratamientos, pero, por lo general, ninguno de ellos resulta completamente efectivo (14,20,21,41,44,57–59,68,69,154). En este trabajo doctoral, han quedado demostrados los efectos beneficios de roflumilast sobre diferentes modelos tanto *in vitro* como *in vivo* de fibrosis cutánea. Todos estos hallazgos, por lo tanto, abren paso a estudios futuros de roflumilast como posible tratamiento de afecciones que cursen con fibrosis cutánea ya que el fármaco mitiga las principales características de esta sintomatología como son la excesiva deposición de Col y el incremento en la población de fibroblastos y miofibroblastos.







## **6 CONCLUSIÓN**



- Todas las isoformas de la PDE4 están sobre-expresadas en tejido queloide, cicatrices hipertróficas y en un modelo 3D de epidermis tras ser estimulado con TGFβ1, siendo la PDE4B la que más incrementa dicha expresión.
- El silenciamiento *in vitro* de la PDE4B en queratinocitos y fibroblastos dérmico mitiga la TEM así como la TFM, además de disminuir tanto la fosforilación de SMAD2/3 como de ERK1/2, la expresión de NOX4 y la proliferación de fibroblastos.
- Roflumilast previene la TFM y revierte la expresión de marcadores mesenquimales una vez inducida la transición a miofibroblasto *in vitro*.
- El inhibidor de la PDE4 previene la TEM en un modelo 3D de epidermis y revierte la disminución en la expresión de la ZO-1 una vez inducida la transición al fenotipo mesenquimal por TGFβ1.
- Roflumilast disminuye la generación de ERO vía NOX4.
- El mecanismo de acción de roflumilast se basa en la inhibición de la PDE4 con la consecuente activación de la PKA, lo que conlleva la inhibición tanto de la ruta canónica dependiente de SMAD, así como de la ruta no canónica MAPK/ERK en queratinocitos y fibroblastos de piel.
- Roflumilast previene, pero también revierte, la fibrosis cutánea en un modelo animal de ES.



## **7 BIBLIOGRAFÍA**



1. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur.* 2017;58(1-2):81-94.
2. Khavkin J, Ellis DAF. Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plast Surg Clin N Am.* mayo de 2011;19(2):229-34.
3. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol EJD.* agosto de 2002;12(4):390-9; quiz 400-1.
4. Urban ML, Manenti L, Vaglio A. Fibrosis--A Common Pathway to Organ Injury and Failure. *N Engl J Med.* 02 de 2015;373(1):95-6.
5. Shroff A, Mamalis A, Jagdeo J. Oxidative Stress and Skin Fibrosis. *Curr Pathobiol Rep.* 1 de diciembre de 2014;2(4):257-67.
6. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* enero de 2008;214(2):199-210.
7. Stone RC, Pastar I, Ojeh N, Chen V, Liu S, Garzon KI, et al. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2016;365(3):495-506.
8. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF- $\beta$  signaling in fibrosis. *Growth Factors Chur Switz.* octubre de 2011;29(5):196-202.
9. Hettiarachchi SU, Li Y-H, Roy J, Zhang F, Puchulu-Campanella E, Lindeman SD, et al. Targeted inhibition of PI3 kinase/mTOR specifically in fibrotic lung fibroblasts suppresses pulmonary fibrosis in experimental models. *Sci Transl Med.* 28 de octubre de 2020;12(567):eaay3724.
10. Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGF $\beta$  signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov.* octubre de 2012;11(10):790-811.
11. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 13 de junio de 2003;113(6):685-700.
12. Ramirez H, Patel SB, Pastar I. The Role of TGF $\beta$  Signaling in Wound Epithelialization. *Adv Wound Care.* 1 de julio de 2014;3(7):482-91.
13. Finnsen KW, McLean S, Di Guglielmo GM, Philip A. Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. *Adv Wound Care.* junio de 2013;2(5):195-214.
14. Andrews JP, Marttala J, Macarak E, Rosenbloom J, Uitto J. Keloids: The paradigm of skin fibrosis – pathomechanisms and treatment. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* abril de 2016;51:37-46.
15. Smith GP, Chan ESL. Molecular pathogenesis of skin fibrosis: insight from animal models. *Curr Rheumatol Rep.* febrero de 2010;12(1):26-33.

16. Pedroza M, To S, Assassi S, Wu M, Tweardy D, Agarwal SK. Role of STAT3 in skin fibrosis and transforming growth factor beta signalling. *Rheumatol Oxf Engl*. 01 de 2018;57(10):1838-50.
17. Makino K, Makino T, Stawski L, Lipson KE, Leask A, Trojanowska M. Anti-connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) monoclonal antibody attenuates skin fibrosis in mice models of systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 13 de 2017;19(1):134.
18. Babalola O, Mamalis A, Lev-Tov H, Jagdeo J. NADPH oxidase enzymes in skin fibrosis: molecular targets and therapeutic agents. *Arch Dermatol Res*. mayo de 2014;306(4):313-30.
19. Canady J, Arndt S, Karrer S, Bosserhoff AK. Increased KGF Expression Promotes Fibroblast Activation in a Double Paracrine Manner Resulting in Cutaneous Fibrosis. *J Invest Dermatol*. 1 de marzo de 2013;133(3):647-57.
20. Daoussis D, Liossis S-N. Treatment of systemic sclerosis associated fibrotic manifestations: Current options and future directions. *Mediterr J Rheumatol*. 28 de marzo de 2019;30(1):33-7.
21. Sobolewski P, Maślińska M, Wieczorek M, Łagun Z, Malewska A, Roszkiewicz M, et al. Systemic sclerosis – multidisciplinary disease: clinical features and treatment. *Reumatologia*. 2019;57(4):221-33.
22. Khanna D, Furst DE, Clements PJ, Allanore Y, Baron M, Czirjak L, et al. Standardization of the Modified Rodnan Skin Score for Use in Clinical Trials of Systemic Sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord*. 1 de enero de 2017;2(1):11-8.
23. Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy C, Trojanowska M. Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *J Invest Dermatol*. enero de 1998;110(1):47-51.
24. Nikitorowicz-Buniak J, Denton CP, Abraham D, Stratton R. Partially Evoked Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Is Associated with Increased TGFβ Signaling within Lesional Scleroderma Skin. *PLoS ONE*. 28 de julio de 2015;10(7):e0134092.
25. Pilewski JM, Liu L, Henry AC, Knauer AV, Feghali-Bostwick CA. Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins 3 and 5 Are Overexpressed in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Contribute to Extracellular Matrix Deposition. *Am J Pathol*. febrero de 2005;166(2):399-407.
26. Hamaguchi Y, Fujimoto M, Matsushita T, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Elevated Serum Insulin-like Growth Factor (IGF-1) and IGF Binding Protein-3 Levels in Patients with Systemic Sclerosis: Possible Role in Development of Fibrosis. *J Rheumatol*. 1 de diciembre de 2008;35(12):2363-71.



27. Zhao H, Yang K, Liu Q, Hu J, Wu W, Wang J. Expression of calponin-1 and its pathogenic role in systemic sclerosis. *J South Med Univ.* 20 de marzo de 2019;39(3):279-85.
28. Wang P-H, Huang B-S, Horng H-C, Yeh C-C, Chen Y-J. Wound healing. *J Chin Med Assoc JCMA.* 2018;81(2):94-101.
29. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev.* 01 de 2019;99(1):665-706.
30. DermNet NZ – All about the skin | DermNet NZ [Internet]. [citado 10 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://www.dermnetnz.org/>
31. Childs DR, Murthy AS. Overview of Wound Healing and Management. *Surg Clin North Am.* febrero de 2017;97(1):189-207.
32. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* mayo de 2007;127(5):998-1008.
33. Nangole FW, Agak GW. Keloid pathophysiology: fibroblast or inflammatory disorders? *JPRAS Open.* 5 de noviembre de 2019;22:44-54.
34. Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Perspective Article: Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen.* 2005;13(1):7-12.
35. Buschke S, Stark H-J, Cerezo A, Präzel-Wunder S, Boehnke K, Kollar J, et al. A decisive function of transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling in tissue morphogenesis and differentiation of human HaCaT keratinocytes. *Mol Biol Cell.* 15 de marzo de 2011;22(6):782-94.
36. Chin GS, Liu W, Peled Z, Lee TY, Steinbrech DS, Hsu M, et al. Differential Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptors I and II and Activation of Smad 3 in Keloid Fibroblasts. *Plast Reconstr Surg.* agosto de 2001;108(2):423-9.
37. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci.* marzo de 1995;108 ( Pt 3):985-1002.
38. Järvinen TAH, Ruoslahti E. Target-seeking antifibrotic compound enhances wound healing and suppresses scar formation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14 de diciembre de 2010;107(50):21671-6.
39. Brunner G, Blakytyn R. Extracellular regulation of TGF-beta activity in wound repair: growth factor latency as a sensor mechanism for injury. *Thromb Haemost.* agosto de 2004;92(2):253-61.
40. Lindley LE, Stojadinovic O, Pastar I, Tomic-Canic M. Biology and Biomarkers for Wound Healing. *Plast Reconstr Surg.* septiembre de 2016;138(3 Suppl):18S-28S.

41. Marneros AG, Krieg T. Keloids – clinical diagnosis, pathogenesis, and treatment options. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges.* 2004;2(11):905-13.
42. Kassi K, Kouame K, Kouassi A, Allou A, Kouassi I, Kourouma S, et al. Quality of life in black African patients with keloid scars. *Dermatol Rep.* 22 de octubre de 2020;12(2):8312.
43. Lee S-S, Yosipovitch G, Chan Y-H, Goh C-L. Pruritus, pain, and small nerve fiber function in keloids: A controlled study. *J Am Acad Dermatol.* 1 de diciembre de 2004;51(6):1002-6.
44. Asano Y. Recent advances in the treatment of skin involvement in systemic sclerosis. *Inflamm Regen [Internet].* 12 de junio de 2017 [citado 3 de agosto de 2020];37. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5725888/>
45. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Goldin J, Roth MD, Furst DE, et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med.* 22 de junio de 2006;354(25):2655-66.
46. Tashkin DP, Roth MD, Clements PJ, Furst DE, Khanna D, Kleerup EC, et al. Mycophenolate Mofetil versus Oral Cyclophosphamide in Scleroderma-related Interstitial Lung Disease: Scleroderma Lung Study II (SLS-II), a double-blind, parallel group, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* septiembre de 2016;4(9):708-19.
47. Jordan S, Distler JHW, Maurer B, Huscher D, van Laar JM, Allanore Y, et al. Effects and safety of rituximab in systemic sclerosis: an analysis from the European Scleroderma Trial and Research (EUSTAR) group. *Ann Rheum Dis.* junio de 2015;74(6):1188-94.
48. Daoussis D, Liossis S-NC, Tsamandas AC, Kalogeropoulou C, Kazantzi A, Sirinian C, et al. Experience with rituximab in scleroderma: results from a 1-year, proof-of-principle study. *Rheumatol Oxf Engl.* febrero de 2010;49(2):271-80.
49. Khanna D, Denton CP, Jahreis A, van Laar JM, Frech TM, Anderson ME, et al. Safety and efficacy of subcutaneous tocilizumab in adults with systemic sclerosis (faSScinate): a phase 2, randomised, controlled trial. *The Lancet.* 25 de junio de 2016;387(10038):2630-40.
50. Rice LM, Padilla CM, McLaughlin SR, Mathes A, Ziemek J, Goummih S, et al. Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. *J Clin Invest.* 1 de julio de 2015;125(7):2795-807.
51. Sullivan KM, Goldmuntz EA, Keyes-Elstein L, McSweeney PA, Pinckney A, Welch B, et al. Myeloablative Autologous Stem-Cell Transplantation for Severe Scleroderma. *N Engl J Med.* 04 de 2018;378(1):35-47.

52. van Laar JM, Farge D, Sont JK, Naraghi K, Marjanovic Z, Larghero J, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation vs intravenous pulse cyclophosphamide in diffuse cutaneous systemic sclerosis: a randomized clinical trial. *JAMA*. 25 de junio de 2014;311(24):2490-8.
53. Sullivan KM, Goldmuntz EA, Keyes-Elstein L, McSweeney PA, Pinckney A, Welch B, et al. Myeloablative Autologous Stem-Cell Transplantation for Severe Scleroderma. *N Engl J Med* [Internet]. 3 de enero de 2018 [citado 2 de septiembre de 2020]; Disponible en: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/nejmoa1703327>
54. Bruni T, Varone F. The adoption of nintedanib in systemic sclerosis: the SENSCLIS study. *Breathe* [Internet]. junio de 2020 [citado 1 de septiembre de 2020];16(2). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7341613/>
55. Acharya N, Sharma SK, Mishra D, Dhooria S, Dhir V, Jain S. Efficacy and safety of pirfenidone in systemic sclerosis-related interstitial lung disease—a randomised controlled trial. *Rheumatol Int*. 1 de mayo de 2020;40(5):703-10.
56. Mustoe TA, Cooter RD, Gold MH, Hobbs FDR, Ramelet A-A, Shakespeare PG, et al. International clinical recommendations on scar management. *Plast Reconstr Surg*. agosto de 2002;110(2):560-71.
57. Ogawa R, Akita S, Akaishi S, Aramaki-Hattori N, Dohi T, Hayashi T, et al. Diagnosis and Treatment of Keloids and Hypertrophic Scars—Japan Scar Workshop Consensus Document 2018. *Burns Trauma* [Internet]. 27 de diciembre de 2019 [citado 23 de julio de 2020];7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6933735/>
58. Mokos ZB, Jović A, Grgurević L, Dumić-Čule I, Kostović K, Čeočić R, et al. Current Therapeutic Approach to Hypertrophic Scars. *Front Med* [Internet]. 20 de junio de 2017 [citado 27 de julio de 2020];4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5476971/>
59. Darzi MA, Chowdri NA, Kaul SK, Khan M. Evaluation of various methods of treating keloids and hypertrophic scars: a 10-year follow-up study. *Br J Plast Surg*. 1 de enero de 1992;45(5):374-9.
60. Puri N, Talwar A. The Efficacy of Silicone Gel for the Treatment of Hypertrophic Scars and Keloids. *J Cutan Aesthetic Surg*. 2009;2(2):104-6.
61. Anzarut A, Olson J, Singh P, Rowe BH, Tredget EE. The effectiveness of pressure garment therapy for the prevention of abnormal scarring after burn injury: a meta-analysis. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 1 de enero de 2009;62(1):77-84.
62. Shepherd JP, Dawber RP. The response of keloid scars to cryosurgery. *Plast Reconstr Surg*. diciembre de 1982;70(6):677-82.

63. Zouboulis CC, Blume U, Büttner P, Orfanos CE. Outcomes of Cryosurgery in Keloids and Hypertrophic Scars: A Prospective Consecutive Trial of Case Series. *Arch Dermatol*. 1 de septiembre de 1993;129(9):1146-51.
64. Rusciani L, Rossi G, Bono R. Use of cryotherapy in the treatment of keloids. *J Dermatol Surg Oncol*. junio de 1993;19(6):529-34.
65. van Leeuwen MCE, Bulstra AEJ, Ket JCF, Ritt MJPF, van Leeuwen PAM, Niessen FB. Intralesional Cryotherapy for the Treatment of Keloid Scars: Evaluating Effectiveness. *Plast Reconstr Surg Glob Open* [Internet]. 8 de julio de 2015 [citado 9 de septiembre de 2020];3(6). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4494507/>
66. Trislina Perdanasari A, Lazzeri D, Su W, Xi W, Zheng Z, Ke L, et al. Recent Developments in the Use of Intralesional Injections Keloid Treatment. *Arch Plast Surg*. noviembre de 2014;41(6):620-9.
67. Niessen FB, Spauwen PH, Schalkwijk J, Kon M. On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review. *Plast Reconstr Surg*. octubre de 1999;104(5):1435-58.
68. Poetschke J, Gauglitz GG. Current options for the treatment of pathological scarring. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG*. mayo de 2016;14(5):467-77.
69. Marshall CD, Hu MS, Leavitt T, Barnes LA, Lorenz HP, Longaker MT. Cutaneous Scarring: Basic Science, Current Treatments, and Future Directions. *Adv Wound Care*. 1 de febrero de 2018;7(2):29-45.
70. Sclafani A, Gordon L, Chadha M, Romo T. Prevention of Earlobe Keloid Recurrence with Postoperative Corticosteroid Injections Versus Radiation Therapy A Randomized, Prospective Study and Review of the Literature. *Dermatol Surg*. junio de 1996;22(6):569-74.
71. Yosipovitch G, Widijanti Sugeng M, Goon A, Chan YH, Goh CL. A comparison of the combined effect of cryotherapy and corticosteroid injections versus corticosteroids and cryotherapy alone on keloids: a controlled study. *J Dermatol Treat*. junio de 2001;12(2):87-90.
72. Trislina Perdanasari A, Lazzeri D, Su W, Xi W, Zheng Z, Ke L, et al. Recent Developments in the Use of Intralesional Injections Keloid Treatment. *Arch Plast Surg*. noviembre de 2014;41(6):620-9.
73. Haurani MJ, Foreman K, Yang JJ, Siddiqui A. 5-Fluorouracil treatment of problematic scars. *Plast Reconstr Surg*. enero de 2009;123(1):139-48; discussion 149-151.
74. Srivastava S, Patil A, Prakash C, Kumari H. Comparison of Intralesional Triamcinolone Acetonide, 5-Fluorouracil, and Their Combination in Treatment of Keloids. *World J Plast Surg*. mayo de 2018;7(2):212-9.

75. Alster TS, Williams CM. Treatment of keloid sternotomy scars with 585 nm flashlamp-pumped pulsed-dye laser. *The Lancet*. 13 de mayo de 1995;345(8959):1198-200.
76. Kuo Y-R, Wu W-S, Jeng S-F, Wang F-S, Huang H-C, Lin C-Z, et al. Suppressed TGF- $\beta$ 1 expression is correlated with up-regulation of matrix metalloproteinase-13 in keloid regression after flashlamp pulsed-dye laser treatment. *Lasers Surg Med*. 2005;36(1):38-42.
77. Kuo Y-R, Jeng S-F, Wang F-S, Chen T-H, Huang H-C, Chang P-R, et al. Flashlamp pulsed dye laser (PDL) suppression of keloid proliferation through down-regulation of TGF-beta1 expression and extracellular matrix expression. *Lasers Surg Med*. 2004;34(2):104-8.
78. Amadeu T, Braune A, Mandarim-de-Lacerda C, Porto LC, Desmoulière A, Costa A. Vascularization Pattern in Hypertrophic Scars and Keloids: A Stereological Analysis. *Pathol - Res Pract*. 1 de enero de 2003;199(7):469-73.
79. Tanaka A, Hatoko M, Tada H, Iioka H, Niitsuma K, Miyagawa S. Expression of p53 family in scars. *J Dermatol Sci*. 1 de febrero de 2004;34(1):17-24.
80. Kischer CW, Wagner HN, Pindur J, Holubec H, Jones M, Ulreich JB, et al. Increased fibronectin production by cell lines from hypertrophic scar and keloid. *Connect Tissue Res*. 1989;23(4):279-88.
81. Friedman DW, Boyd CD, Mackenzie JW, Norton P, Olson RM, Deak SB. Regulation of Collagen Gene Expression in Keloids and Hypertrophic Scars. *J Surg Res*. 1 de agosto de 1993;55(2):214-22.
82. Oliveira GV, Hawkins HK, Chinkes D, Burke A, Tavares ALP, Ramos-e-Silva M, et al. Hypertrophic versus non hypertrophic scars compared by immunohistochemistry and laser confocal microscopy: type I and III collagens<sup>†</sup>. *Int Wound J*. 2009;6(6):445-52.
83. Wang Z, Gao Z, Shi Y, Sun Y, Lin Z, Jiang H, et al. Inhibition of Smad3 expression decreases collagen synthesis in keloid disease fibroblasts. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 1 de noviembre de 2007;60(11):1193-9.
84. Yu H, Bock O, Bayat A, Ferguson MWJ, Mrowietz U. Decreased expression of inhibitory SMAD6 and SMAD7 in keloid scarring. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg JPRAS*. 2006;59(3):221-9.
85. Li C, Zhu H-Y, Bai W-D, Su L-L, Liu J-Q, Cai W-X, et al. MiR-10a and miR-181c regulate collagen type I generation in hypertrophic scars by targeting PAI-1 and uPA. *FEBS Lett*. 2015;589(3):380-9.
86. Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins PJ. TGF- $\beta$  Signaling in Tissue Fibrosis: Redox Controls, Target Genes and Therapeutic Opportunities. *Cell Signal*. enero de 2013;25(1):264-8.

87. Tuan T-L, Wu H, Huang EY, Chong SSN, Laug W, Messadi D, et al. Increased Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Keloid Fibroblasts May Account for their Elevated Collagen Accumulation in Fibrin Gel Cultures. *Am J Pathol.* 1 de mayo de 2003;162(5):1579-89.
88. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Fujimoto M, et al. Connective Tissue Growth Factor Gene Expression in Tissue Sections From Localized Scleroderma, Keloid, and Other Fibrotic Skin Disorders. *J Invest Dermatol.* 1 de abril de 1996;106(4):729-33.
89. Khoo YT, Ong CT, Mukhopadhyay A, Han HC, Do DV, Lim IJ, et al. Upregulation of secretory connective tissue growth factor (CTGF) in keratinocyte-fibroblast coculture contributes to keloid pathogenesis. *J Cell Physiol.* 2006;208(2):336-43.
90. De Felice B, Garbi C, Santoriello M, Santillo A, Wilson RR. Differential apoptosis markers in human keloids and hypertrophic scars fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* julio de 2009;327(1-2):191-201.
91. Lee YJ, Kwon SB, Kim CH, Cho HD, Nam HS, Lee SH, et al. Oxidative Damage and Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Protein Expression in Normal Skin and Keloid Tissue. *Ann Dermatol.* 1 de octubre de 2015;27(5):507-16.
92. Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Role of Cellular Senescence and NOX4-Mediated Oxidative Stress in Systemic Sclerosis Pathogenesis. *Curr Rheumatol Rep.* 5 de diciembre de 2014;17(1):473.
93. Sturrock A, Cahill B, Norman K, Huecksteadt TP, Hill K, Sanders K, et al. Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* abril de 2006;290(4):L661-73.
94. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, et al. NADPH Oxidase-4 Mediates Myofibroblast Activation and Fibrogenic Responses to Lung Injury. *Nat Med.* septiembre de 2009;15(9):1077.
95. Rovillain E, Mansfield L, Caetano C, Alvarez-Fernandez M, Caballero OL, Medema RH, et al. Activation of nuclear factor-kappa B signalling promotes cellular senescence. *Oncogene.* mayo de 2011;30(20):2356-66.
96. Regulski MJ. Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds Compend Clin Res Pract.* junio de 2017;29(6):168-74.
97. Barnes PJ, Baker J, Donnelly LE. Cellular Senescence as a Mechanism and Target in Chronic Lung Diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 de septiembre de 2019;200(5):556-64.
98. Varmeh S, Egia A, McGrouther D, Tahan SR, Bayat A, Pandolfi PP. Cellular Senescence as a Possible Mechanism for Halting Progression of Keloid Lesions. *Genes Cancer.* noviembre de 2011;2(11):1061-6.

99. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci.* 1 de julio de 2002;27(7):339-44.
100. De Felice B, Wilson RR, Nacca M. Telomere shortening may be associated with human keloids. *BMC Med Genet.* 28 de octubre de 2009;10:110.
101. Insel PA, Murray F, Yokoyama U, Romano S, Yun H, Brown L, et al. cAMP and Epac in the regulation of tissue fibrosis. *Br J Pharmacol.* mayo de 2012;166(2):447-56.
102. Schiller M, Verrecchia F, Mauviel A. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-elevating agents inhibit transforming growth factor- $\beta$ -induced SMAD3/4-dependent transcription via a protein kinase A-dependent mechanism. *Oncogene.* diciembre de 2003;22(55):8881-90.
103. Li H, Zuo J, Tang W. Phosphodiesterase-4 Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Front Pharmacol* [Internet]. 17 de octubre de 2018 [citado 14 de septiembre de 2020];9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6199465/>
104. Sanz MJ, Cortijo J, Morcillo EJ. PDE4 inhibitors as new anti-inflammatory drugs: Effects on cell trafficking and cell adhesion molecules expression. *Pharmacol Ther.* 1 de junio de 2005;106(3):269-97.
105. Eskandari N, Mirmosayyeb O, Bordbari G, Bastan R, Yousefi Z, Andalib A. A short review on structure and role of cyclic-3',5'-adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase 4 as a treatment tool. *J Res Pharm Pract.* 2015;4(4):175-81.
106. Pérez-Torres S, Miró X, Palacios JM, Cortés R, Puigdoménech P, Mengod G. Phosphodiesterase type 4 isozymes expression in human brain examined by in situ hybridization histochemistry and[3H]rolipram binding autoradiography. Comparison with monkey and rat brain. *J Chem Neuroanat.* diciembre de 2000;20(3-4):349-74.
107. Houslay MD, Adams DR. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J.* 15 de febrero de 2003;370(Pt 1):1.
108. Houslay MD, Schafer P, Zhang KYJ. Keynote review: Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discov Today.* 15 de noviembre de 2005;10(22):1503-19.
109. Fertig BA, Baillie GS. PDE4-Mediated cAMP Signalling. *J Cardiovasc Dev Dis* [Internet]. 29 de enero de 2018 [citado 16 de septiembre de 2020];5(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5872356/>
110. Baillie GS, MacKenzie SJ, McPhee I, Houslay MD. Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4

- cyclic AMP-specific phosphodiesterases. *Br J Pharmacol.* octubre de 2000;131(4):811-9.
111. Jin S-LC, Conti M. Induction of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4B is essential for LPS-activated TNF- $\alpha$  responses. *Proc Natl Acad Sci.* 28 de mayo de 2002;99(11):7628-33.
  112. Stawiski M, Rusin L, Burns T, Weinstein G, Vorhees JJ. Ro 20-1724: an agent that significantly improves psoriatic lesions in double-blind clinical trials. *J Invest Dermatol.* 1979;73:261-3.
  113. Tenor H, Hatzelmann A, Beume R, Lahu G, Zech K, Bethke TD. Pharmacology, Clinical Efficacy, and Tolerability of Phosphodiesterase-4 Inhibitors: Impact of Human Pharmacokinetics. En: Francis SH, Conti M, Houslay MD, editores. *Phosphodiesterases as Drug Targets* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011 [citado 15 de septiembre de 2020]. p. 85-119. (Handbook of Experimental Pharmacology). Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-17969-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-17969-3_3)
  114. Treves TA, Korczyn AD. Denbufylline in Dementia: A Double-Blind Controlled Study. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 1999;10(6):505-10.
  115. Cortijo Gimeno J, Sánchez EM. Perfil farmacológico del roflumilast. *Arch Bronconeumol.* 1 de enero de 2010;46:19-24.
  116. Wedzicha JA, Calverley PM, Rabe KF. roflumilast: a review of its use in the treatment of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2016;11:81.
  117. Cortijo J, Iranzo A, Milara X, Mata M, Cerdá-Nicolás M, Ruiz-Saurí A, et al. roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor, alleviates bleomycin-induced lung injury. *Br J Pharmacol.* febrero de 2009;156(3):534-44.
  118. Milara J, Peiró T, Serrano A, Guijarro R, Zaragoza C, Tenor H, et al. roflumilast N-oxide inhibits bronchial epithelial to mesenchymal transition induced by cigarette smoke in smokers with COPD. *Pulm Pharmacol Ther.* agosto de 2014;28(2):138-48.
  119. Vecchio D, Acquaviva A, Arezzini B, Tenor H, Martorana PA, Gardi C. Downregulation of NOX4 Expression by roflumilast N-Oxide Reduces Markers of Fibrosis in Lung Fibroblasts. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:745984.
  120. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J.* 1 de octubre de 2000;351(Pt 1):95-105.
  121. Zhang Y, Huang W-R. Sanguinarine induces apoptosis of human lens epithelial cells by increasing reactive oxygen species via the MAPK signaling pathway. *Mol Med Rep.* mayo de 2019;19(5):4449-56.



122. Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Patil BS. Obacunone and obacunone glucoside inhibit human colon cancer (SW480) cells by the induction of apoptosis. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* julio de 2011;49(7):1616-25.
123. Molecular Mechanism Responsible for Fibronectin-controlled Alterations in Matrix Stiffness in Advanced Chronic Liver Fibrogenesis\* - *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. [citado 11 de agosto de 2021]. Disponible en: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)36240-2/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)36240-2/fulltext)
124. Kim SR, Lee KS, Park SJ, Min KH, Lee MH, Lee KA, et al. A novel dithiol amide CB3 attenuates allergic airway disease through negative regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de abril de 2011;183(8):1015-24.
125. Hatzelmann A, Schudt C. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Potential of the Novel PDE4 Inhibitor roflumilast in Vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 1 de abril de 2001;297(1):267-79.
126. Bagnato G, Bitto A, Pizzino G, Irrera N, Sangari D, Cinquegrani M, et al. Simvastatin attenuates the development of pulmonary and cutaneous fibrosis in a murine model of systemic sclerosis. *Rheumatol Oxf Engl.* agosto de 2013;52(8):1377-86.
127. Xing M, Akowuah GA, Gautam V, Gaurav A. Structure-based design of selective phosphodiesterase 4B inhibitors based on ginger phenolic compounds. *J Biomol Struct Dyn.* octubre de 2017;35(13):2910-24.
128. Togo S, Liu X, Wang X, Sugiura H, Kamio K, Kawasaki S, et al. PDE4 inhibitors roflumilast and rolipram augment PGE2 inhibition of TGF- $\beta$ 1-stimulated fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* junio de 2009;296(6):L959-969.
129. Cutolo M, Soldano S, Montagna P, Martinelli G, Tardito S, Corallo C, et al. Apremilast interferes with the TGF $\beta$ 1-induced transition of human skin fibroblasts into profibrotic myofibroblasts: in vitro study. *Rheumatology.* 1 de diciembre de 2020;59(12):3927-38.
130. Selige J, Hatzelmann A, Dunkern T. The differential impact of PDE4 subtypes in human lung fibroblasts on cytokine-induced proliferation and myofibroblast conversion. *J Cell Physiol.* agosto de 2011;226(8):1970-80.
131. Matsuhira T, Nishiyama O, Tabata Y, Kaji C, Kubota-Ishida N, Chiba Y, et al. A novel phosphodiesterase 4 inhibitor, AA6216, reduces macrophage activity and fibrosis in the lung. *Eur J Pharmacol.* 15 de octubre de 2020;885:173508.
132. Pan JB, Hou YH, Zhang GJ. Rolipram attenuates bleomycin A5-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respirol Carlton Vic.* septiembre de 2009;14(7):975-82.
133. Kolosionek E, Savai R, Ghofrani HA, Weissmann N, Guenther A, Grimminger F, et al. Expression and Activity of Phosphodiesterase Isoforms during Epithelial

- Mesenchymal Transition: The Role of Phosphodiesterase 4. *Mol Biol Cell*. 15 de noviembre de 2009;20(22):4751-65.
134. Essam RM, Ahmed LA, Abdelsalam RM, El-Khatib AS. Phosphodiesterase-1 and 4 inhibitors ameliorate liver fibrosis in rats: Modulation of cAMP/CREB/TLR4 inflammatory and fibrogenic pathways. *Life Sci*. 1 de abril de 2019;222:245-54.
  135. Gobejishvili L, Barve S, Breitkopf-Heinlein K, Li Y, Zhang J, Avila DV, et al. Rolipram Attenuates Bile Duct Ligation-Induced Liver Injury in Rats: A Potential Pathogenic Role of PDE4. *J Pharmacol Exp Ther*. octubre de 2013;347(1):80-90.
  136. Supp DM, Hahn JM, Glaser K, McFarland KL, Boyce ST. Deep and superficial keloid fibroblasts contribute differentially to tissue phenotype in a novel in vivo model of keloid scar. *Plast Reconstr Surg*. junio de 2012;129(6):1259-71.
  137. Limandjaja GC, Belien JM, Scheper RJ, Niessen FB, Gibbs S. Hypertrophic and keloid scars fail to progress from the CD34-/ $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)+ immature scar phenotype and show gradient differences in  $\alpha$ -SMA and p16 expression. *Br J Dermatol*. 2020;182(4):974-86.
  138. Gulamhuseinwala N, Mackey S, Meagher P, Powell B. Should excised keloid scars be sent for routine histologic analysis? *Ann Plast Surg*. febrero de 2008;60(2):186-7.
  139. Maier C, Ramming A, Bergmann C, Weinkam R, Kittan N, Schett G, et al. Inhibition of phosphodiesterase 4 (PDE4) reduces dermal fibrosis by interfering with the release of interleukin-6 from M2 macrophages. *Ann Rheum Dis*. 1 de junio de 2017;76(6):1133-41.
  140. Secker GA, Shortt AJ, Sampson E, Schwarz QP, Schultz GS, Daniels JT. TGF $\beta$  stimulated re-epithelialisation is regulated by CTGF and Ras/MEK/ERK signalling. *Exp Cell Res*. 1 de enero de 2008;314(1):131-42.
  141. Folger PA, Zekaria D, Grotendorst G, Masur SK. Transforming Growth Factor- $\beta$ -Stimulated Connective Tissue Growth Factor Expression during Corneal Myofibroblast Differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1 de octubre de 2001;42(11):2534-41.
  142. Zhang J, Gao P, Ye W, Xiao Y. Functional Characteristics of Connective Tissue Growth Factor on Human Tenon's Capsule Fibroblast. *Curr Eye Res*. 1 de enero de 2014;39(1):53-61.
  143. Lindley LE, Briegel KJ. Molecular characterization of TGF $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in normal finite lifespan human mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 3 de septiembre de 2010;399(4):659-64.
  144. Xing D, Bonanno JA. Effect of cAMP on TGF $\beta$ 1-Induced Corneal Keratocyte-Myofibroblast Transformation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. febrero de 2009;50(2):626-33.

145. Zhao J, Shu B, Chen L, Tang J, Zhang L, Xie J, et al. Prostaglandin E2 inhibits collagen synthesis in dermal fibroblasts and prevents hypertrophic scar formation in vivo. *Exp Dermatol*. agosto de 2016;25(8):604-10.
146. Kavian N, Mehlal S, Jeljeli M, Saidu NEB, Nicco C, Cerles O, et al. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway Controls Fibrosis and Autoimmunity in Scleroderma. *Front Immunol*. 16 de agosto de 2018;9:1896.
147. Wei J, Zhu H, Lord G, Bhattachayya M, Jones BM, Allaway G, et al. Nrf2 exerts cell-autonomous anti-fibrotic effects: compromised function in systemic sclerosis and therapeutic rescue with a novel heterocyclic chalcone derivative. *Transl Res J Lab Clin Med*. mayo de 2017;183:71-86.e1.
148. Bettinger DA, Yager DR, Diegelmann RF, Cohen IK. The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Plast Reconstr Surg*. octubre de 1996;98(5):827-33.
149. Martin P, Hopkinson-Woolley J, McCluskey J. Growth factors and cutaneous wound repair. *Prog Growth Factor Res*. 1 de enero de 1992;4(1):25-44.
150. Formanek M, Knerer B, Temmel A, Thurnher D, Millesi W, Kornfehl J. Oral keratinocytes derived from the peritonsillar mucosa express the proinflammatory cytokine IL-6 without prior stimulation. *J Oral Pathol Med*. 1998;27(5):202-6.
151. Tan SH, Pal M, Tan MJ, Wong MHL, Tam FU, Teo JWT, et al. Regulation of Cell Proliferation and Migration by TAK1 via Transcriptional Control of von Hippel-Lindau Tumor Suppressor. *J Biol Chem*. 3 de julio de 2009;284(27):18047-58.
152. Safari M, Ghahari L, Zoroufchi MDBHZ. Effects of epidermal growth factor, platelet derived growth factor and growth hormone on cultured rat keratinocytes cells in vitro. *Pak J Biol Sci PJBS*. julio de 2014;17(7):931-6.
153. Milara J, Morcillo E, Monleon D, Tenor H, Cortijo J. roflumilast Prevents the Metabolic Effects of Bleomycin-Induced Fibrosis in a Murine Model. *PLoS ONE*. 20 de julio de 2015;10(7):e0133453.
154. Ojeh N, Bharatha A, Gaur U, Forde AL. Keloids: Current and emerging therapies. *Scars Burns Heal [Internet]*. 10 de agosto de 2020 [citado 3 de septiembre de 2020];6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7418256/>



## **8 ABREVIATURAS**



5-FU	5-fluorouracilo
AC	Adenilato ciclasa
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
ARNsi	ARN de interferencia
BCA	Ácido bicinconónico
BMP	Proteína morfogénica de hueso
BSA	Albúmina de suero bovino
CEIC	Comité Ético de Investigaciones Clínicas
CFM	Ciclofosfamida
CI50	Concentración inhibitoria 50
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Col	Colágeno
Ct	Ciclo umbral
TC	Tomografía computarizada
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo
CHGUV	Consortio Hospital General Universitario de Valencia
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
EMA	Agencia Europea del Medicamento
EPI	Enfermedad pulmonar intersticial
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ES	Esclerosis sistémica
ESD	Esclerosis sistémica difusa
ESL	Esclerosis sistémica limitada
FAP	Proteína activadora de fibroblastos
FBS	Suero fetal bovino

FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
FSAS	Fenotipo secretor asociado a la senescencia
FVC	Capacidad vital forzada
H2DCF-DA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina-1
IGFBP3	Proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina
IL-6	Interleucina 6
LAP	Péptido asociado latente
LTBP	Proteína de unión al TGFβ latente
LLC	Complejo grande de latencia
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MEC	Matriz extracelular
MMF	Mofetilo
MMP	Metaloproteinasas de matriz
mRSS	Puntuación de Rodnan modificado
MTX	Metotrexato
NaCl	Cloruro de Sodio
NaClO	Hipoclorito de sodio
NHDF	Fibroblastos primarios dérmicos humanos normales
NHEK	Queratinocitos primarios humanos normales
NOR	N-óxido roflumilast
NOX	NADPH oxidasas
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ion superóxido
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDE	Fosfodiesterasas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDL	Láser de colorante pulsado
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Difluoruro de polivinilideno



RISC	Complejo proteico de silenciamiento-inducido por ARN
RTX	Rituximab
SA- $\beta$ gal	$\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia
SSF	Suero salino fisiológico 0,9%
TAC	Acetónido de triamcinolona
TCMH	Trasplante de células madre hematopoyéticas
TCZ	Tocilizumab
TEM	Transición epitelio mesenquimal
TEndM	Transición endotelio mesenquimal
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
tPA	Activador tisular del plasminógeno
T $\beta$ RI	Receptor de TGF $\beta$ tipo I
T $\beta$ RII	Receptor TGF $\beta$ tipo II
UCR	<i>Upstream conserved regions</i>
UFR	Unidades de fluorescencia relativa
uPA	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
ZO-1	<i>Zonula occludens 1</i>
$\alpha$ -SMA	Actina de músculo liso



## **9 ANEXO I**



## APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Esta Comisión tras evaluar en su reunión de 25 de Mayo de 2016 el Proyecto de Investigación:

Título:	NEW PDEI DRUGS IN WOUNDS: PROFILING OF TOP-N53 AND TOP-N44 IN IN VITRO, ISOLATED ORGANS AND IN VIVO MODELS		
I.P.:	Julio Cortijo Gimeno	Servicio/Unidad	Unidad de docencia e investigación CHGUV

Acuerda respecto a esta documentación:

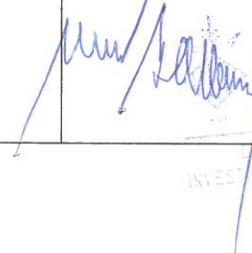
- Que cumple con los requisitos exigidos por esta Comisión para su realización, por tanto se decide su APROBACIÓN.

Los miembros que evaluaron esta documentación:

	Presente	Ausente	Disculpa
Vocales			
Dr. Jose vte Bagan Sebastian	X		
Dr. Carlos Camps Herrero			x
Dra. Goitzane Marcaida Benito	x		
Dr. Carlos Sánchez Juan	X		
Dña. Anna Martí Monros			x
Dr. Emilio López Alcina	x		
Dr. Rafael Paya Serrano	x		
Dr. Miguel Garcia del Toro	x		
Dr. Miguel Armengot Carceller	x		
Dr. Jose Luis Sanchez Carazo	x		
Dr. Francisco Ridocci Soriano	x		
Dra. Empar Lurbe Ferrer			x
Dª Amparo Muñoz Izquierdo			x
Dra. Amparo Esteban Reboll			x
Secretario			
Dra. Dolores Lopez Alarcón	x		

Lo que comunico a efectos oportunos a  
miércoles, 25 de mayo de 2016:

Fdo. Dr. Jose vte Bagan Sebastian  
Presidente de la Comisión de Investigación:



CONSORCIO  
HOSPITAL GENERAL  
UNIVERSITARI  
VALENCIA  
FUNDACIÓN  
INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA



## **10 ANEXO II**





## **AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2017/VSC/PEA/00062**

Vista la solicitud realizada en fecha **24/03/17** con nº reg. entrada **14264** por D/D<sup>a</sup>. **Pilar Campins Falcó**, Vicerrectora de Investigación y Política Científica, centro usuario **ES462500001003**, para realizar el procedimiento:

***“Modelo murino de fibrosis cutánea (HOCl model): estudio comparativo de IPD4, corticoides y combinaciones”***

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

### **AUTORIZO:**

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2017/VSC/PEA/00062** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de Valencia**

Responsable del proyecto: **Julio Cortijo Gimeno**

Establecimiento: **Animalario Facultad de Medicina – Campus Blasco Ibañez**

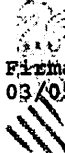
Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca



Firmado por Rogelito Illanes Ribas el  
03/05/2017 11:57:40  
**GENERALITAT  
VALENCIANA**





