

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

REGENERACIÓN PULMONAR EN LA EPOC  
MEDIANTE ADMINISTRACIÓN DE LGF  
Efecto sobre un modelo animal inducido con CdCl<sub>2</sub>

TESIS DOCTORAL

LOURDES MARTÍNEZ GALÁN  
MADRID, 2011

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

REGENERACIÓN PULMONAR EN LA EPOC  
MEDIANTE ADMINISTRACIÓN DE LGF  
Efecto sobre un modelo animal inducido con CdCl<sub>2</sub>

TESIS DOCTORAL  
LOURDES MARTÍNEZ GALÁN  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

DIRECTOR: GERMÁN PECES-BARBA ROMERO  
Laboratorio de Neumología Experimental  
Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz  
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias  
(CIBERES)

Madrid, 1 de Septiembre de 2011

El **Dr. Germán Peces-Barba Romero**, Doctor en Medicina, Jefe Asociado del Servicio de Neumología de la Fundación Jiménez Díaz, Profesor asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, en calidad de director de tesis, certifica que:

La tesis doctoral titulada **REGENERACIÓN PULMONAR EN LA EPOC MEDIANTE ADMINISTRACIÓN DE LGF, EFECTO SOBRE UN MODELO ANIMAL INDUCIDO CON CdCl<sub>2</sub>**, presentada por **D<sup>a</sup> Lourdes Martínez Galán**, licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección, habiendo controlado directamente tanto los métodos utilizados como el análisis de los resultados.



Dr. Germán Peces-Barba Romero

## AGRADECIMIENTOS

Siempre piensas que nunca llegará este momento, el momento en el que te sientas delante del ordenador dispuesta a escribir los agradecimientos de tu tesis. Entonces te acuerdas de aquellas imágenes de las películas en las que los escritores están sentados delante de su ordenador, incapaces de escribir ni una sola letra. Pensando, quienes serán los protagonistas, qué otros personajes aparecerán, esos momentos destacados en el desarrollo de la historia... ¡Y es que a veces resulta tan difícil resumir en una simple hoja todo lo que quieres decir!

Recuerdo mis andanzas después de acabar la carrera, llena de vitalidad y ganas de hacer grandes descubrimientos. De repente, me vi delante del Dr. Peces-Barba dispuesto a abrirme las puertas al mundo de la investigación y la ciencia. Gracias Germán y Fundación Conchita Rábago por esta oportunidad.

En el laboratorio cada día había una nueva aventura que vivir y aparecían nuevos personajes (os lo digo desde el cariño). Carmen vivía en Neumo desde el origen de los tiempos, nunca nadie logró saber si dormía allí o no. Pilar y yo llegamos a la vez a aquel mundo extraño. Pronto llegaron Jimena y Laura y empezó a sonar aquella famosa frase de “Vale, pero una rápida que...”. Bernar, Paola y Berta parecía como si siempre hubiesen formado parte del grupo, pero la familia crecía y empezamos a pasar cada vez más tiempo juntos. La casa estaba siempre llena con ese ir y venir constante de gente en busca de un pH-metro, ayuda, una vía de escape o esas inolvidables comidas. Sandra, ¿por qué no llegaste antes?

Pero los que siempre habéis formado parte del libro de mi vida, mamá, papá, nana, Jesús. Sin vosotros ningún capítulo hubiese sido posible. Gracias por ayudarme a pasar página.

A Carmelo, aserejé y la jefa, egque no se me ocurre cómo agradecerles su ayuda en el desenlace de esta historia.

Hace algún tiempo leí “Buscador es alguien que busca, no necesariamente alguien que encuentra”. Aunque no siempre he encontrado los resultados que deseaba, siempre habéis estado ahí para rellenar esos huecos.

La investigación es como el vino, hay momentos dulces, amargos, pero hay que tener paciencia y dedicación para obtener una buena cosecha.

# Resumen

---

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una enfermedad en auge con afectación a nivel pulmonar y sistémico, cuyo diagnóstico tardío retrasa su tratamiento hasta fases avanzadas de la enfermedad, causando la muerte en la mayoría de los casos. No existe hasta la fecha ningún tratamiento que haya demostrado la capacidad de recuperar o regenerar la función pulmonar perdida por esta enfermedad. En esta tesis se estudia la capacidad regenerativa del factor de crecimiento de hígado (LGF) sobre el pulmón de un modelo animal de EPOC desarrollado en ratas Wistar macho con instilación intratraqueal de CdCl<sub>2</sub>. El modelo reproduce los datos histológicos y funcionales de la EPOC, con afectación de la función pulmonar (descenso de la capacidad inspiratoria, distensibilidad pulmonar, capacidad vital forzada y flujo espiratorio forzado) y presencia de fibrosis (aumento de hidroxiprolina y elastina) y de enfisema (aumento del área interna alveolar y la distancia media entre las paredes alveolares). Se administró LGF a una parte de los animales, confirmando que se revertía la enfermedad a nivel de fibrosis y afectación funcional, y observando una mejora en la histología del enfisema.

Se ha comprobado que el tabaco, principal causante de la EPOC, genera desajustes en el pulmón a nivel inflamatorio, de actividad oxidativa y de destrucción-reparación tisular, niveles íntimamente relacionados entre sí. Basándonos en estos desajustes, comprobamos la posible actuación del LGF, eliminando el exceso de proteínas de matriz y restituyendo ésta por una matriz correctamente organizada, permitiendo de este modo un correcto funcionamiento del pulmón. Para ello valoramos la actuación de las metaloproteasas, MMP-2 y MMP-12, y de los miofibroblastos. No se observaron variaciones de estas proteasas ni de su inhibidor TIMP-1, lo que nos indica que el LGF, aunque actúa eliminando el exceso de proteínas de la matriz extracelular, lo hace independientemente de esta vía. Esta hipótesis se ve apoyada por el mayor número de macrófagos y el bajo nivel de TNF $\alpha$  encontrado tanto en los individuos a los que se les administró el CdCl<sub>2</sub>, como a los tratados con LGF.

Aunque aún debemos averiguar el mecanismo de actuación del LGF, podemos asegurar es que este factor de crecimiento parece ser eficaz en el tratamiento de la EPOC, puesto que eliminando la fibrosis es capaz de mejorar la función pulmonar en estadíos avanzados de la enfermedad.

## SUMMARY

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is an on the increase disease with pulmonary and systemic involvement, whose late diagnosis delays the treatment to advanced stages, being the cause of the dead. To date, there is no treatment with probed capacity to recover or regenerate the lost pulmonary function due to this disease. The regenerative capacity of Liver Growth Factor (LGF) is studied in this thesis, on lungs of an animal model of COPD where male Wistar rats were intratracheal instilled with CdCl<sub>2</sub>. This model shows the same histological and functional data than COPD, with pulmonary function affectation (reduced inspiratory capacity, compliance, forced vital capacity and forced expiratory flow), fibrosis (increased hydroxyproline and elastin) and emphysema (increased alveolar internal area and mean linear intercept). LGF was only administrated to a part of the animals, showing its capacity to reverse the disease, at least the fibrosis and the functional affectation, and to improve the emphysema histology.

It is confirmed that tobacco, the main cause of COPD, causes lung disorders at different but deeply connected levels such as inflammation, oxidative action and tissue destruction-reparation. According to these disorders, we checked the potential role of LGF, removing the excess of matrix proteins thanks to the action of two metalloproteases, MMP-2 and MMP-12, and replacing it by a well-organized one, in this case due to the myofibroblasts, which allow a correct lung function. The invariable values of these proteases and its inhibitor TIMP-1, shows that LGF acts removing the matrix proteins using a different mechanism of action. On the other hand, this hypothesis is confirmed by the great number of macrophages, the main cells producers of these proteases, and the low level of TNF $\alpha$  in both the animals with CdCl<sub>2</sub> administration and LGF treatment.

We still need to find out the LGF mechanism of action, but we can assure that this growth factor is an effective treatment to the COPD, because it can improve the pulmonary function by removing the fibrosis in advanced stages of the disease..

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>14</b>
ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC).....	14
MODELO DE EPOC MEDIANTE ADMINISTRACIÓN DE CdCL <sub>2</sub> .....	18
MECÁNICA PULMONAR.....	21
MORFOMETRÍA PULMONAR .....	23
LA MATRIZ EXTRACELULAR EN EL PULMÓN.....	23
Comportamiento de la matriz extracelular tras una agresión pulmonar.....	25
LGF .....	26
MMPs Y TIMPS .....	27
MIOFIBROBLASTOS .....	31
TNF $\alpha$ .....	32
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
1. ELABORACIÓN DEL MODELO ANIMAL.....	37
1.1. Inducción de la lesión .....	37
1.2. Constatación de la lesión .....	38
1.3. Administración de LGF .....	38
2. VALORACIÓN DEL INCREMENTO DE PESO DEL ANIMAL Y DEL PESO DEL PULMÓN .....	39
3. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN PULMONAR .....	39
3.1. Cálculo del volumen pulmonar .....	42
3.2. Curvas de presión-volumen cuasiestáticas.....	42
3.3. Curvas de flujo-volumen.....	42
4. EXTRACCIÓN DEL BLOQUE CARDIO-PULMONAR .....	43
5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....	43
5.1. Análisis de proteínas de matriz mediante métodos colorimétricos...43	
5.1.1. Cuantificación de colágeno .....	43
5.1.2. Cuantificación de elastina .....	44



5.2. Análisis de proteínas de matriz mediante Northern-blot .....	44
5.2.1. Extracción de RNA total .....	44
5.2.2. Obtención de las membranas .....	45
5.2.3. Elaboración y marcaje de las sondas.....	45
5.3. Valoración de proteasas .....	47
5.4. Valoración de alpha-actina .....	48
5.5. Cuantificación de TIMP-1 .....	48
5.6. Cuantificación de TNF $\alpha$ .....	48
7. ANÁLISIS MICROSCÓPICO PULMONAR.....	49
7.1. Valoración del AIA y la L <sub>M</sub> .....	49
7.2. Cuantificación de la cantidad de colágeno mediante rojo sirio .....	50
7.3. Valoración de la respuesta inflamatoria.....	50
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	50

## **RESULTADOS .....**

1. CONSTATACIÓN DE LA LESIÓN .....	52
2. CONFIRMACIÓN DE LA AUSENCIA DE EFECTO NOCIVO DEL LGF .....	53
3. VALORACIÓN DEL PESO DE LOS ANIMALES Y DEL PESO PULMONAR .....	54
4. FUNCIÓN PULMONAR .....	55
5. CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE MATRIZ MEDIANTE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS .....	55
6. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS DE MATRIZ MEDIANTE NORTHERN-BLOT .....	56
7. VALORACIÓN DE PROTEASAS.....	58
8. VALORACIÓN DE ALPHA-ACTINA.....	59
9. CUANTIFICACIÓN DE TIMP-1 .....	60
10. CUANTIFICACIÓN DE TNF $\alpha$ .....	60
11. ESTUDIO MICROSCÓPICO .....	61
12. CORRELACIONES .....	63

<b>DISCUSIÓN</b>	.....	<b>66</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	.....	<b>75</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	.....	<b>77</b>
<b>ARTÍCULOS</b>	.....	<b>92</b>

## ABREVIATURAS

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En algunas ocasiones se ha mantenido la correspondiente abreviatura o traducción en inglés, debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

cDNA	Ácido desoxirribonucleico copia
AIA	Área interna alveolar
RNA	Ácido ribonucleico
BCA	Ácido bicincónico
CD4+	Cluster of differentiation- 4
CI	Capacidad inspiratoria
C <sub>L</sub>	Distensibilidad
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CPT	Capacidad pulmonar total
CRF	Capacidad residual funcional
CVF	Capacidad vital forzada
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EPI-SCAN	Epidemiologic Study of COPD in Spain
EPOC	Enfermedad pulmonary obstructiva crónica
FEF <sub>75%</sub>	Flujo expiratorio forzado al 75%
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GST	Glutation-S-transferasa
HGF	Hepatocyte growth factor
HSP-47	Heat shock protein
HYP	Hidroxirolina
IC	Inspiratory Capacity

ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
i.p.	Intraperitoneal
ITCG	Isotiocianato de guanidina
KGF	Keratinocyte growth factor
LGF	Liver growth factor
$L_M$	Distancia media entre las paredes alveolares
MOPS	Ácido 3-N-morfolino propansulfónico
MMPs	Metaloproteasas
NAC	N-acetilcisteína
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Tampón fosfato salino
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
RT-PCR	Transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa
SSC	Cloruro y citrato sódicos
TCA	Ácido tricloroacético
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
Th <sub>1</sub>	Linfocito T helper-1
TIMPS	Inhibidores de proteasas de tejido
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral
VC	Volumen corriente
VCAM-1	Molécula de adhesión endotelial- 1
VR	Volumen residual
VRE	Volumen de reserva espiratoria
VRI	Volumen de reserva inspiratoria

# Introducción

---

## **ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)**

Según la OMS (2007), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, también conocida como EPOC o COPD es una enfermedad compleja que designa diversas dolencias pulmonares crónicas, que limitan el flujo de aire en los pulmones. Términos tan familiares como bronquitis crónica o enfisema, quedarían englobados en el diagnóstico de la EPOC. Esta enfermedad se caracteriza por una progresiva limitación en el flujo aéreo, y está asociada a una respuesta inflamatoria anormal del pulmón frente a partículas nocivas o gases, principalmente al humo de tabaco.

Los síntomas más comunes son disnea, una excesiva producción de esputo y tos crónica. Sin embargo, la EPOC no es sólo la "tos del fumador", ya que se han observado consecuencias a nivel sistémico, como el *cor pulmonale* y caquexia, y asociación con un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, diabetes, etc. (96, 59).

Se trata de una enfermedad frecuente, costosa y evitable, con importantes implicaciones en la salud. La mortalidad y prevalencia de esta enfermedad son difíciles de calcular, sobre todo por fallos en el diagnóstico y al no ser considerada la principal causa del fallecimiento de los individuos que la padecen. La EPOC cursa lentamente, con una primera fase asintomática, lo que dificulta su diagnóstico y lo retrasa hasta fases en las que la enfermedad es moderada o grave. Según estimaciones recientes de la OMS (2007), actualmente unos 210 millones de personas sufren EPOC, y 3 millones de personas fallecieron por esta causa en 2005. Es la cuarta causa de muerte en la actualidad y la única que se encuentra en aumento dentro de las cinco primeras (4). Según datos obtenidos por el estudio EPI-SCAN (Epidemiologic Study of COPD in Spain) la prevalencia de esta enfermedad en España es del 10.2% en individuos entre los 40 y los 80 años (95). Se trata del octavo país con la mayor mortalidad por esta causa en Europa, registrándose 18000 muertes al año sólo en este país. (94). La OMS vaticina que la EPOC se habrá convertido en la tercera causa de muerte en todo el mundo en 2020.

Los factores de riesgo de EPOC más importantes son los siguientes (2):

- **El tabaco:** se considera la principal causa. La prevalencia detectada en fumadores (15%) es mayor que la encontrada en exfumadores (12.8%) o no fumadores (4.1%) (94). La mortalidad también es mayor en fumadores, y el riesgo de padecer EPOC u otra enfermedad pulmonar se incrementa con la exposición al tabaco, principalmente durante la gestación o la infancia.
- **Presencia de polvo y productos químicos en el medio laboral:** cuando la exposición a estas sustancias irritantes, vapores o polvo ocupacional es suficientemente intensa y prolongada. Se ha detectado una mayor incidencia en agricultores, ganaderos y ciertos sectores de la minería.
- **Polución:** tanto la contaminación del aire exterior como interior, debido a calefacciones, etc. Estudios realizados en Italia y EEUU demuestran un mayor riesgo de padecer enfermedades respiratorias y de morir por esta causa en zonas donde la contaminación es mayor.
- **Estatus socioeconómico:** principalmente debido a malnutrición o exposición a sustancias nocivas.
- **Factores genéticos:** por ejemplo, la deficiencia de  $\alpha$ 1-antitripsina u otros polimorfismos genéticos de enzimas implicadas en reacciones de oxidoreducción e inflamación (SOD, GST). También se han asociado otros factores como la raza, el sexo o la predisposición a la adicción nicotínica (59).
- **Infecciones durante la infancia e infecciones latentes por adenovirus:** podrían incrementar la respuesta inflamatoria.

Se considera que las interacciones de varios de estos mecanismos aumenta la susceptibilidad a desarrollar EPOC. En un estudio realizado por Cottin V y colaboradores (8) en exfumadores, encontraron la presencia conjunta de enfisema y fibrosis pulmonar, además de hipertensión pulmonar. Consideraron por tanto que el tabaco es un factor de riesgo presente en ambas patologías. Además, ambas podrían estar relacionadas con un desencadenante ambiental y/o susceptibilidad génica, jugando el tabaco un papel fundamental. A su vez, Daniil y colaboradores (13), encontraron resultados semejantes en individuos exfumadores y expuestos a compuestos nocivos en el campo. Esta presencia conjunta de ambas patologías, recuerda la expuesta en

artículos anteriores tras la administración de cloruro de cadmio (30), compuesto habitual en ciertos compuestos agrícolas, además de en el tabaco (14, 88).

En relación a la etiopatogenia de la enfermedad juega un papel decisivo la inflamación provocada por el humo del tabaco. La exposición al humo del tabaco provoca un incremento de oxidantes y radicales libres, que hacen aumentar la permeabilidad del epitelio respiratorio a los agentes nocivos contenidos en el tabaco. Este aumento en la permeabilidad es facilitado por el descenso de antioxidantes naturales como el glutatión, que contiene el epitelio respiratorio y que supone una defensa natural. Al facilitar la entrada de estos agentes nocivos, se desencadena una respuesta inmune innata, debido al daño directo que pueden ejercer estos tóxicos y se incrementa la inflamación al liberarse citoquinas y otros mediadores de la inflamación, que atraen a las células del sistema inmune a esta zona. A continuación se activa la respuesta inmune específica, en la que gracias a la presentación del antígeno por parte de células dendríticas y macrófagos fundamentalmente, se activarán linfocitos T cooperadores (CD4+) y citotóxicos (CD8+). En pacientes con EPOC grave se han detectado niveles elevados de linfocitos Th<sub>1</sub>, T citotóxicos y B, aún después de desaparecer el hábito tabáquico, de manera que la perpetuación de la inflamación podría deberse a la persistencia de la respuesta inmune adaptativa por los autoantígenos liberados por el individuo (86, 74).

La inflamación en las vías aéreas, unida a la hipersecreción mucosa causada por la hiperplasia de las células caliciformes del epitelio y a la remodelación de las pequeñas vías aéreas periféricas y de los alveolos, que engrosan su pared (fibrosis) y reducen su diámetro, generan la obstrucción de la vía aérea y por lo tanto un aumento en la resistencia al flujo aéreo. Por otro lado, tanto debido a la respuesta inmune y al descenso en el diámetro de las vías aéreas, las células de las paredes alveolares y del endotelio sufren apoptosis, originando enfisema. (96, 39, 63, 74).

Se ha comprobado que en el desarrollo de la enfermedad el tabaco puede ocasionar desequilibrios en el pulmón a tres niveles (96):



- **Actividad oxidativa-antioxidante:** Tanto el tabaco como la inflamación presentes en la EPOC incrementan el estrés oxidativo, provocando la muerte celular u oxidando antiproteasas.
- **Actividad proteasa-antiproteasa:** En la EPOC se ha demostrado un desequilibrio entre la cantidad de proteasas y antiproteasas, que se explicará en el apartado de MMPs.
- **Destrucción-reparación tisular:** La liberación de numerosos mediadores inflamatorios promueve la quimiotaxis de fibroblastos al pulmón, los cuales se diferencian en miofibroblastos, incrementando la producción de proteínas de matriz y originando fibrosis en las pequeñas vías aéreas. Por otro lado, el enfisema puede considerarse como una respuesta de reparación ineficaz. Cuando la reparación es ineficaz, aparece remodelado, los componentes de la matriz se desorganizan, perdiendo sus características y distribución anatómica originales y provocando un cambio en las propiedades elásticas tisulares.

Parece haber una relación estrecha entre inflamación, estrés oxidativo y proteólisis, contribuyendo todos estos mecanismos al remodelado, es decir a los cambios estructurales en el pulmón, que son en último término los causantes de la disfunción pulmonar (63). También parece intervenir un componente inmune, ya que se ven incrementados los linfocitos B y T (fundamentalmente los CD8+), perpetuando la inflamación y la destrucción (46).

Además de las alteraciones existentes en las vías aéreas, desde un punto de vista patogénico, las alteraciones existentes a nivel del parénquima pulmonar engloban dos conceptos básicos, la fibrosis pulmonar y el enfisema:

- **Fibrosis pulmonar:** Se trata de una respuesta anormal en el proceso de reparación o remodelado del pulmón, tras producirse un daño en éste (99). Tras el daño, se produce la ruptura de la lámina basal y afectación del epitelio alveolar, apareciendo una fase inflamatoria caracterizada por la presencia de edema, incremento de la permeabilidad e infiltrado de neutrófilos principalmente; y una fase de reparación, en la que destacan el infiltrado de fibroblastos y la producción masiva y depósito de componentes de la matriz extracelular (79, 104).

- **Enfisema pulmonar:** Consiste en el agrandamiento de los espacios aéreos distales a los bronquiolos terminales, debido a la destrucción de los tejidos que constituyen sus paredes y a la pérdida de fibras elásticas, provocando la limitación del flujo aéreo. Se encuentran incrementados la capacidad pulmonar residual, el volumen residual, la capacidad pulmonar total y la distensibilidad. Este incremento de la distensibilidad puede deberse al alargamiento de los espacios aéreos o a otras alteraciones de las vías aéreas, asociadas comúnmente al enfisema (fibrosis, hipertrofia del músculo liso y mucus) (89, 4).

Aunque clásicamente se ha incluido en esta definición la ausencia de fibrosis, lo cierto es que la destrucción coexiste con la fibrosis de las paredes alveolares circundantes, con un aumento neto de colágeno y elastina.

Morfológicamente se han descrito dos tipos de enfisema según el patrón de destrucción tisular, el enfisema centroacinar y el panacinar. En el centroacinar la destrucción se da principalmente en la zona central del acino, en los bronquiolos respiratorios y las zonas más adyacentes del parénquima, afectando fundamentalmente a los lóbulos superiores. En el panacinar, la destrucción de los bronquiolos respiratorios o de las paredes alveolares es generalizada y afecta preferentemente a los lóbulos inferiores. Otra diferencia son las alteraciones mecánicas, apareciendo en el panacinar un aumento de la distensibilidad pulmonar, que parece intervenir en la reducción del flujo aéreo y se relaciona con la pérdida de retracción elástica del parénquima. En el centroacinar, el componente inflamatorio de las vías aéreas es mayor y parece ser el causante de la pérdida de flujo aéreo. La menor distensibilidad encontrada se explicaría por la afectación de las pequeñas vías aéreas mencionada anteriormente (80). En los fumadores se detectan ambos tipos de enfisema, destacando el centroacinar (63).

### **MODELO DE EPOC MEDIANTE ADMINISTRACIÓN DE CdCl<sub>2</sub>**

El cadmio es un metal pesado con una vida media elevada, que ha sido ampliamente utilizado en la industria y se encuentra presente en la contaminación, el tabaco o la dieta (51).

El  $\text{CdCl}_2$  comenzó a utilizarse en modelos animales tras conocerse diversos casos de personas que habían sobrevivido a la inhalación accidental de elevadas concentraciones de cadmio y habían desarrollado enfisema (88) y tras comprobar que esta patología también aparecía en trabajadores expuestos a inhalación de cadmio durante prolongados periodos de tiempo (14). Posteriormente cobró fuerza al conocerse diversos datos de interés, como son:

- La mayor cantidad de cadmio encontrada en pacientes enfisematosos, 4 veces mayor, frente a aquellos sin enfisema o enfisema leve (41).
- La elevada cantidad de cadmio que contiene un cigarrillo ( $2\mu\text{g}$ ) (14).
- La mayor cantidad de cadmio que acumulan los fumadores en el organismo, en comparación con los no fumadores, y su elevada permanencia en éste.
- La correlación existente entre la cantidad de cadmio acumulada y la cantidad de tabaco fumado (49).

Todos estos datos hicieron especular a Snider y colaboradores (91) sobre la relación entre el cadmio inhalado a través del tabaco y el enfisema centroacinar del fumador.

Aunque se sabe que la extrapolación de datos obtenidos en modelos animales a patologías humanas no siempre es posible, también es cierto que los modelos animales resultan de gran utilidad para probar distintas terapias, campo en el que se centra nuestra investigación. Además, al tratarse la EPOC de una enfermedad de curso lento, permite un mejor acercamiento a los mecanismos que pueden participar en su desarrollo (68).

El modelo de  $\text{CdCl}_2$  puede ser uno de los más representativos de la enfermedad actual del fumador, utilizándose principalmente en el estudio del papel de las células inflamatorias en la degradación de elastina y otros componentes de la matriz extracelular. Hasta la actualidad, se ha administrado  $\text{CdCl}_2$  a distintos tipos de animales (cobayas, ratas, ratones, etc) y mediante diversas técnicas (aerosolización, instilación orotraqueal e intralobar). El  $\text{CdCl}_2$  se ha utilizado habitualmente para el desarrollo de un modelo de fibrosis o enfisema pulmonar en ratas, caracterizándose por un patrón funcional de descenso del volumen y la distensibilidad pulmonares y del flujo espiratorio (80, 90), un incremento de las proteínas de la matriz extracelular, colágeno y elastina, (90, 26, 30, 25) y el alargamiento de los espacios aéreos alveolares (88, 90, 26

80). Se trata de un modelo en el que se observa fibrosis peribronquiolar y enfisema centroacinar secundario.

Se ha comprobado que la lesión provocada por el  $\text{CdCl}_2$  sigue la siguiente secuencia (30, 12):

- En los primeros días aparecen edema e inflamación: se caracteriza por la destrucción de la membrana basal y las células epiteliales de tipo I, permitiendo el infiltrado celular hacia el intersticio, infiltrado compuesto principalmente por monocitos y polimorfonucleares, que darán paso posteriormente a fibroblastos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos, la proliferación de las células epiteliales de tipo II y el engrosamiento de las células endoteliales.
- A partir del quinto día aproximadamente, se ve incrementado el mRNA de los colágenos tipo I y III. Los fibroblastos son los principales responsables de este aumento.
- Al séptimo día, ya es evidente el remodelado fibrótico, observándose un descenso del volumen pulmonar.

Otros modelos animales que en mayor o menor medida reproducen el perfil morfológico o patológico de la EPOC son:

- **Modelo de bleomicina**

La bleomicina es un agente antitumoral utilizado en el tratamiento de distintos tumores como el linfoma de Hodgkins (33). La administración de bleomicina, al igual que la administración de  $\text{CdCl}_2$ , causa fibrosis pulmonar, cursando ambas del mismo modo. No obstante, elegimos este último modelo por presentar rasgos de enfisema y establecerse de manera más rápida y estable que el modelo de bleomicina (30)

- **Modelo de exposición a humo de tabaco**

Se ha comprobado que la administración crónica a humo de tabaco en animales reproduce muchas de las características de la EPOC en humanos, principalmente a nivel de morfología e inflamación, presentando además estrés oxidativo y afectación sistémica. Sin embargo, no todos los animales parecen presentar la misma

sensibilidad, resultando más susceptibles cobayas y ciertas cepas de ratones como los AKR/J, mientras que las ratas son bastante resistentes (68).

- **Irradiación**

Aunque los efectos son persistentes, las dosis que se han utilizado son diferentes y presenta el inconveniente de la manipulación animal.

- **Modelos transgénicos**

Se han utilizado tanto en el estudio del enfisema como en el de fibrosis. Destacan el ratón *tight skin*, que presenta fallo en el ensamblaje de las fibras elásticas, el ratón *pallid*, con déficit de  $\alpha 1$ -antitripsina y otros con déficit de colagenasas, PDGF, etc. Los animales son tanto *knock out* como *knock in* y presentan el inconveniente de que son difíciles de conseguir y de cruzar (58).

## **MECÁNICA PULMONAR**

### **Volúmenes y capacidades pulmonares**

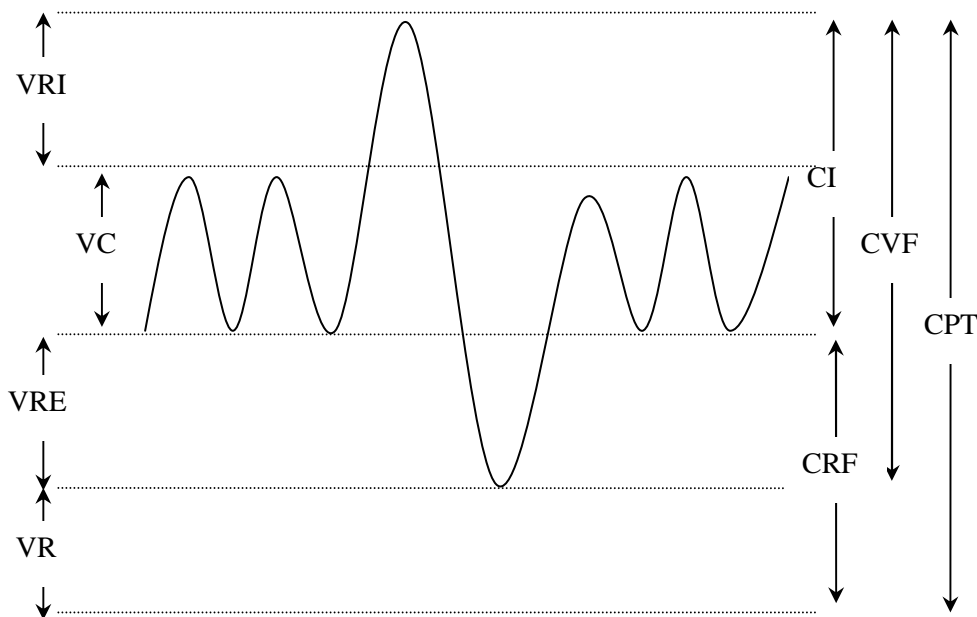
Considerando la respiración normal y la forzada, podemos subdividir el volumen pulmonar total en (62):

- **Volumen corriente (VC):** Es el volumen inspirado y espirado durante la respiración normal.
- **Volumen de reserva inspiratoria (VRI):** Máximo volumen que puede ser adquirido como consecuencia de una inspiración forzada.
- **Volumen de reserva espiratoria (VRE):** Máximo volumen que puede ser exhalado como consecuencia de una espiración forzada.
- **Volumen residual (VR):** Volumen de aire que no puede ser espirado, ni realizando una espiración forzada.

Las capacidades pulmonares que resultan de gran utilidad en las pruebas de función pulmonar son:

- **Capacidad inspiratoria (CI):** Volumen máximo de aire inspirado partiendo de la capacidad residual funcional.

- **Capacidad residual funcional (CRF):** Volumen pulmonar que queda al final de la espiración normal, es decir, a volumen corriente, durante la respiración espontánea o tranquila.
- **Capacidad pulmonar total (CPT):** Volumen total máximo del pulmón, que resulta de sumar la capacidad inspiratoria y la capacidad residual funcional.
- **Capacidad vital forzada (CVF):** Volumen obtenido tras espiración forzada, partiendo de la capacidad pulmonar total.



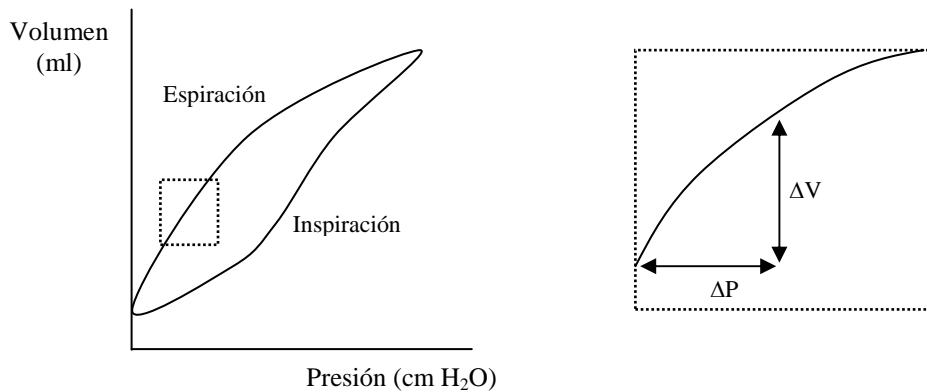
**Figura 1:** Representación de los volúmenes y capacidades pulmonares. VC: Volumen corriente, VRI: Volumen de reserva inspiratoria, VRE: Volumen de reserva espiratoria, VR: Volumen residual, CI: Capacidad inspiratoria, CRF: Capacidad residual funcional, CPT: Capacidad pulmonar total, CVF: Capacidad vital forzada

### Relación presión/volumen: distensibilidad pulmonar

El pulmón aumenta de volumen en respuesta a una presión de distensión (42). Se define como distensibilidad pulmonar ( $C_L$ ) a la relación entre el incremento de volumen y el de presión. Se corresponde con la máxima pendiente de la curva (figura 2), generalmente en la zona correspondiente a la CRF.

El pulmón se compone principalmente de fibras elásticas y de colágeno. Mientras que las fibras elásticas participan en la distensibilidad pulmonar, las fibras de colágeno participan impidiendo que siga aumentando el volumen y se produzca la

ruptura del tejido pulmonar, una vez que el pulmón se ha distendido y los volúmenes son elevados. El surfactante pulmonar también juega un papel importante, ya que es la película líquida que recubre los alveolos y representa la mitad de las fuerzas de retracción pulmonar (57, 79).



**Figura 2:** Curva de presión-volumen pulmonar (izquierda). Ampliación de la zona de máxima pendiente de la curva presión-volumen y representación de la relación entre el volumen y la presión pulmonar (distensibilidad).

## MORFOMETRÍA PULMONAR

Las técnicas morfométricas permiten el estudio del parénquima pulmonar, facilitándonos la valoración de la lesión y establecer su correlación con parámetros funcionales.

Se define como  $L_M$  a la variable que nos permite conocer la distancia media entre las paredes alveolares.

La  $L_M$  y el área interna alveolar (AIA) son variables que proporcionan información sobre el agrandamiento de los espacios aéreos y son directamente proporcionales al grado de enfisema.

## LA MATRIZ EXTRACELULAR EN EL PULMÓN

El tejido conectivo supone el 25% de la masa del pulmón adulto humano. La matriz extracelular del pulmón está compuesta principalmente por colágeno (60-70%), elastina (20-30%), glucosaminoglucanos y fibronectina (79, 101). El colágeno y la

elastina son elementos estructurales, la elastina actúa en la distensibilidad pulmonar que tiene lugar durante la respiración normal y el colágeno limitando el volumen pulmonar; el resto de proteínas, como la fibronectina y la fibrina, participan en la modulación de los procesos que tienen lugar en la matriz, actuando como sustrato para facilitar el desplazamiento del infiltrado celular durante la respuesta inflamatoria (57, 79).

En la matriz extracelular también existen factores de crecimiento, proteasas e inhibidores de proteasas, entre otras enzimas.

La matriz extracelular está por tanto implicada en el mantenimiento de la integridad estructural y en la modulación de la función pulmonar.

➤ **Colágeno pulmonar**

El colágeno es una proteína constituida por 3 cadenas polipeptídicas formando una triple hélice, con zonas ricas en la secuencia Gly-X-Y, donde “X” e “Y” pueden ser prolina o hidroxiprolina. El 20% de los aminoácidos son hidroxiprolina (34, 27).

Encontramos 3 categorías de colágenos: fibrilar, no fibrilar y de bajo peso molecular. En el pulmón los más importantes son los fibrilares (tipo I, II, III, V y XI), que son los encargados del soporte estructural del tejido pulmonar. El colágeno tipo I es el principal componente del tejido conectivo pulmonar, seguido por el colágeno tipo III. Ambos son sintetizados por fibroblastos, células mesoteliales y endoteliales. El colágeno tipo IV, por su parte, es el principal componente de la lámina basal.

➤ **Elastina pulmonar**

Las fibras elásticas están presentes en corazón, pulmón, vasos arteriales y piel. Destacan la elastina y microfibras, como la fibrilina.

La elastina predomina en pleura, septos alveolares y paredes de vasos sanguíneos y vías aéreas. Es una proteína insoluble formada en un 44% por aminoácidos hidrofóbicos. Se sintetiza como un precursor soluble, tropoelastina, a partir de un único gen, sufriendo un procesamiento alternativo para dar las distintas isoformas de tropoelastina (101).

Las fibras elásticas son estructuras muy estables, responsables de la capacidad de retracción elástica del pulmón.



➤ **Otras proteínas de matriz**

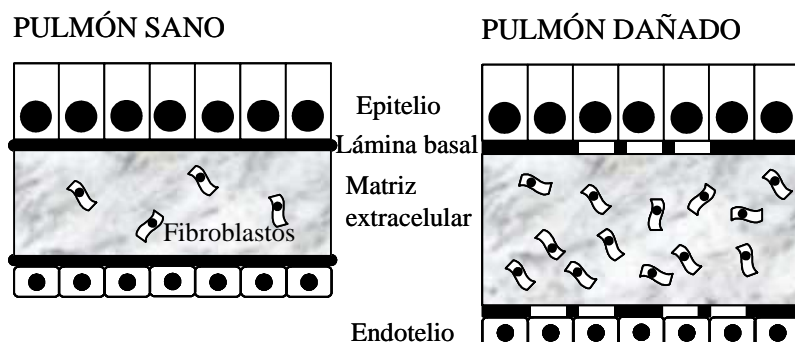
Los proteoglicanos son moléculas de alto peso molecular y componentes integrales de la membrana.

Las fibronectinas son glucoproteínas presentes en plasma y tejido conectivo. La fibronectina celular es secretada en el pulmón por fibroblastos o células epiteliales en respuesta al daño.

La laminina es una glucoproteína asociada a otros componentes de la matriz extracelular, como colágeno tipo IV y proteoglicanos, que se encuentra mayoritariamente en la lámina basal (79).

**Comportamiento de la matriz extracelular tras una agresión pulmonar**

Como ya hemos dicho, la matriz juega un papel primordial en el mantenimiento de la estructura pulmonar y la modulación de la función celular. Tras una agresión, la organización del tejido pulmonar se ve afectada, apareciendo un proceso de ruptura de la lámina basal, proliferación de fibroblastos, aumento en el depósito de componentes de la matriz extracelular y por tanto, alteración en su composición (figura 3). Todo esto provoca un aumento en el peso del pulmón, debido al edema originado por el aumento de la permeabilidad vascular y la entrada de células inflamatorias, como neutrófilos. Ésta sería la fase aguda o inflamatoria, que precede a la fase reparadora, caracterizada por la infiltración de monocitos, reorganización del intersticio y de los espacios alveolares.



**Figura 3:** Representación del tejido pulmonar antes y después de sufrir una lesión. Tras el daño aparece ruptura de la lámina basal e infiltrado y proliferación de fibroblastos, incrementando el depósito de las proteínas de matriz y alterando la arquitectura normal del pulmón.

## LGF

El factor de crecimiento de hígado (LGF o *Liver Growth Factor*) es un mitógeno hepático que presenta actividad tanto *in vivo* como *in vitro*. Este factor de crecimiento fue purificado por el grupo del doctor Díaz-Gil en el año 1986 (15), demostrando posteriormente mediante experimentos químicos e inmunológicos, que el LGF es un complejo albúmina-bilirrubina (16,17). Hasta ahora, el LGF se ha utilizado en diversos experimentos tanto *in vivo* como *in vitro*:

- En un modelo de cirrosis pulmonar inducida por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>), la inyección de LGF hizo disminuir notablemente la acumulación de los componentes de la matriz extracelular (colágeno y reticulina), restaurando las enzimas séricas, la integridad de la arquitectura del hígado y el tejido necrosado, reduciendo los abscesos y mejorando la hemodinámica (20).
- Además, se ha demostrado que el LGF estimula la secreción de TNF- $\alpha$  en células endoteliales en cultivo, pero no estimula ICAM-1 ó VCAM-1. Este incremento en la secreción de TNF- $\alpha$  es el responsable de la actividad mitogénica del LGF (21).
- También se ha demostrado que el LGF es capaz de disminuir la fibrosis de la arteria carótida (reduciendo el colágeno de la pared de la misma en un 50% tras dos semanas de tratamiento, produciendo una sustancial regeneración de la pared arterial, disminuyendo la presión sanguínea y mejorando la función vascular en un modelo de ratas hipertensas (93).
- Por otro lado, el LGF también fue capaz de estimular los botones terminales dopaminérgicos, restaurando parcialmente la función motora en un modelo de Parkinson en ratas (77). También estimula la neurogénesis y la movilización de neuronas (36).
- Estudios recientes han descrito la actividad antifibrótica del LGF en el conducto biliar ligado de ratas, en el cual produce un descenso significativo de la acumulación de la matriz extracelular y recupera la función hepática, a la vez que provoca el descenso de factores clave en el desarrollo de la fibrosis, tales como el TGF- $\beta$  (22).

Además del LGF empleado en este estudio, purificado de suero de ratas, el LGF también ha sido purificado de suero de pacientes con hepatitis (18), comprobando que en ambos casos su estructura química y actividad son muy similares.

El LGF, como ya se ha mencionado previamente, es un complejo albúmina-bilirrubina con una peso molecular de 64000 kD (16), que resulta indetectable en condiciones normales y se ve aumentado en el suero tras daño hepático.

Presenta una dosis efectiva menor que otros factores de crecimiento, llegando a ser eficaz a nivel de microgramos (19, 21). No solo difiere de otros factores de crecimiento a nivel de dosis efectiva, si no que también parece presentar una vía de acción diferente. A este nivel, podemos decir que se ha comprobado su actividad como antioxidante (98, 106), estimulando la mitosis celular vía  $TNF\alpha$  (21) o disminuyendo la cantidad de proteasas y los mediadores de fibrosis (22).

### MMPs Y TIMPS

Las metaloproteasas de la matriz (MMPs) son enzimas que degradan la matriz extracelular en condiciones fisiológicas y patológicas. La mayoría son enzimas extracelulares, aunque algunas están unidas a la membrana (MT1-MMP) o actúan en el interior celular (MMP-2) (66). Su actividad está regulada a 3 niveles: transcripcional, de activación del proenzima y a través de inhibidores que se unen a ellas. (6)

Son endopeptidasas de 28-92 kD con elementos estructurales y funcionales semejantes. Presentan diferentes dominios (60):

- **Propéptido:** se pierde en la activación, Presenta un residuo de cisteína que bloquea la unión del sustrato al centro activo, manteniendo la proteasa en estado inactivo.
- **Centro catalítico:** posee un dominio de unión a  $Zn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  y dominios semejantes a las proteínas de matriz que actúan como sustratos.
- **Extremo carboxilo terminal:** no existe en todas la metaloproteasas (Ej. MMP-7). Es semejante a la familia hemopexina y media la interacción de algunas metaloproteasas con el colágeno (Ej. colagenasas y estromalisina). Es la región que se une a los inhibidores para su inactivación y en el caso de MMP-2 interviene en la activación cuando la proteasa se encuentra unida a la célula, interaccionando con el TIMP-2 cuando está en estado de proenzima.

Son producidas por células del tejido conectivo y células hematopoyéticas, al igual que sus inhibidores tisulares.

<b>SUBGRUPO</b>	<b>MMP</b>	<b>FUENTE</b>	<b>SUSTRATO</b>
COLAGENASAS	MMP-1, MMP-8, MMP-13	Tejido conectivo, neutrófilos	Colágeno I, II, III
GELATINASAS	MMP-2, MMP-9	Monocitos, macrófagos, miofibroblastos, neutrófilos	Colágeno IV, V, VII, X; colágenos I, II, III degradados; Elastina; gelatina
ESTROMALISINAS	MMP-3, MMP-10, MMP-11	Monocitos, macrófagos, células del tejido conectivo	Proteoglucanos, laminina, MMP-9, colagenasas
ELASTASAS	MMP-12	Macrófagos	Elastina, fibronectina
MATRILISINA	MMP-7	Monocitos	Proteoglucanos, MMP-9, colágeno I, II, III, elastina
DE MEMBRANA	MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP		Colágeno I, II, III, MMP-2, elastina, fibronectina, laminina

**Tabla 1:** Clasificación de las principales metaloproteasas conocidas según su estructura.

Son difíciles de extraer mediante detergentes, posiblemente por su unión a proteínas de matriz. En condiciones normales están presentes en bajas concentraciones en el tejido adulto (1-10 µg/g tejido húmedo), lo que dificulta su cuantificación (105).

Las proteasas pueden ser inducidas por citoquinas y factores de crecimiento. A continuación se muestran algunos factores que hacen aumentar o disminuir el número de proteasas (61, 105):

<b>Estimuladores de MMPs</b>	<b>Inhibidores de MMPs</b>
<b>Agentes físicos</b>	<b>TGF-<math>\beta</math></b>
<b>Agentes químicos solubles: ésteres de forbol, oxígeno reactivo, colágeno desnaturalizado, metales, componentes con mercurio...</b>	<b>Ácido retinoico</b>
<b>Adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular</b>	<b>Glucocorticoides</b>
<b>Enzimas y factores de crecimiento: EGF, FGFb, plasmina</b>	<b><math>\alpha_2</math>- macroglobulina (en suero)</b>
	<b>Inhibidores tisulares (TIMPs)</b>
	<b>Inhibidores sintéticos (batimastat, etc)</b>

**Tabla 2:** Clasificación de agentes que estimulan o inhiben la producción de metaloproteasas.

Las metaloproteasas intervienen en procesos biológicos como el desarrollo embrionario, morfogénesis, angiogénesis, apoptosis, ciclo del endometrio y del folículo piloso, o en el remodelado óseo (61), aunque también parecen participar en procesos de cicatrización, remodelado y reparación (66). Se ha observado un incremento de metaloproteasas en circunstancias de daño pulmonar agudo, durante la fase inflamatoria, en enfermedades como la EPOC (47). Durante la fase fibrótica el número de proteasas se ve disminuido (70).

Las MMPs, además de participar en el remodelado de la matriz y la rotura de la lámina basal, también intervienen en la activación o liberación de mediadores como el TNF- $\alpha$  y factores de crecimiento, por lo que juegan un papel importante en la proliferación celular, adhesión, migración, diferenciación, angiogénesis y apoptosis (66).

El incremento de MMP-2 en la fibrosis pulmonar idiopática y en modelos de fibrosis, se ha asociado a la capacidad de esta enzima de romper la lámina basal, permitiendo un mayor infiltrado de fibroblastos y miofibroblastos en el espacio alveolar, y aumentando por tanto la fibrosis (66). Aunque la MMP-9 también rompe la lámina basal, a diferencia de la MMP-2, que es producida por células endoteliales, epiteliales y fibroblastos, la MMP-9 es producida por células inflamatorias, por lo que participa fundamentalmente en el proceso inflamatorio en lugar de en el remodelado (6). También se ha encontrado un incremento de MMP-2 en el enfisema humano (11), hecho

lógico si consideramos la elevada afinidad de esta enzima por la elastina y la gelatina, al presentar un dominio tipo fibronectina II (66).

Otra MMP importante, habitualmente ligada al enfisema es la MMP-12, que degrada la elastina e interviene en el remodelado en enfermedades como la EPOC y el enfisema. Se ha comprobado que el humo del tabaco aumenta el número de macrófagos en el pulmón, y se ha relacionado a éstos con la liberación de MMP-12, que digiere la elastina, actuando los péptidos liberados como factores quimiotácticos de los monocitos al pulmón, alimentando de esta manera el ciclo (47, 67). La liberación de MMP-12 principalmente por macrófagos, también provoca la liberación de TNF- $\alpha$  de la superficie de estas células, estimulando este mediador a las células endoteliales y promoviendo la entrada del infiltrado celular de polimorfonucleares, que a su vez liberarán proteasas, destruyendo la matriz extracelular (11). También se ha comprobado la participación de la MMP-2 en la liberación de TNF- $\alpha$ .

Los TIMPs son proteínas de 22-30 kD que forman complejos equimolares con el sitio activo de las MMPs. En su estructura poseen 12 residuos de cisteína formando 6 puentes disulfuro, que le proporcionan estabilidad frente al pH y la temperatura. También poseen 2 dominios de 3 lazos, cuyo plegamiento es esencial para su funcionalidad y sensibilidad a la reducción o alquilación (60).

Se conocen 4 componentes de esta familia, de los cuales, sólo el TIMP-3 está unido a la matriz extracelular, mientras que el resto son solubles.

Además de inhibir las MMPs, también se ha visto que inhiben la invasión celular y la tumorigénesis *in vitro* y la angiogénesis y la metástasis *in vivo* (61).

El TIMP-1 es una glucoproteína de 30 kD que se encuentra en mayor cantidad que el resto de inhibidores tisulares, lo que facilita su cuantificación. Sólo se une a MMP-2 cuando se encuentra en forma activa, inactivándolo. También se une a pro-MMP-9 (47). Aparece en la zona de la lesión en la fase inflamatoria y fibrótica, parece ser que porque estimula a los fibroblastos para producir MMP-1, que participa en la degradación del colágeno y la re-epitelización; también estimula la producción de matriz extracelular por estas células, promoviendo la fibrosis.

Por su parte, el TIMP-2 es una proteína no glucosilada de 23kD, que se une a pro-MMP-2, e interviene en su activación, al igual que MT1-MMP. Este inhibidor se ve incrementado en el lugar de la lesión durante la fase fibrótica, estimulando la proliferación de fibroblastos, al igual que TIMP-1 (54, 70).

Los inhibidores de proteasas también pueden presentar otras funciones como estimular la apoptosis (TIMP-3) o la supervivencia y el crecimiento celular (TIMP-2) (82).

<b>TIPO</b>	<b>FUENTE/LOCALIZACIÓN</b>	<b>SUSTRATO</b>
TIMP-1	Macrófagos y fibroblastos. Áreas fibróticas	Todas las MMPs excepto MT1-MMP. Se une a pro-MMP-9
TIMP-2	Miofibroblastos.	Todas las MMPs. Se une a pro-MMP-2
TIMP-3	Lámina elástica de vasos y septos alveolares	Todas las MMPs. Se une a pro-MMP-2 y pro-MMP-9
TIMP-4	Epitelio y células plasmáticas	MMP-1, 2, 3, 7, 9. Se une a pro-MMP-2

**Tabla 3:** Clasificación de los inhibidores de metaloproteasas.

Parece ser que la fibrosis tras el daño tisular se debe al sumatorio de distintas acciones (54, 70, 82):

- Descenso de las colagenasas, por lo que habrá mayor cantidad de colágeno al no degradarse.
- Aumento de las gelatinasas, que provocan el infiltrado celular al dañar la lámina basal, y hacen aumentar el colágeno al incrementarse el número de fibroblastos.
- Aumento de los TIMPs, que por un lado inhiben a las MMPs, por lo que desciende la degradación de la matriz extracelular; y por otro estimulan a los fibroblastos, aumentando la cantidad de colágeno.

En general, predominaría un ambiente no degradativo, que podría relacionarse con la conocida hipótesis proteasa-antiproteasa.

### **MIOFIBROBLASTOS**

Si bien es de todos conocidos que las principales células productoras de la matriz extracelular son los fibroblastos, cada día se habla más de la importancia de los

miofibroblastos como principales productores de la matriz extracelular en casos de fibrosis y de su remodelado tras el daño (87, 71). Aunque no existe consenso acerca del origen de estas células, algunos autores consideran que proceden de células madre hematopoyéticas, otros consideran que proceden de la activación de fibroblastos intersticiales, de la desdiferenciación de fibrocitos y miocitos, o de la transición de células epiteliales (24, 108, 87); sobre lo que sí parece haber un acuerdo es sobre la mayor expresión de alfa-actina que presentan los miofibroblastos, lo que los convierte en células con características mixtas entre los fibroblastos y las células del músculo liso, debido a la producción masiva de colágeno y la capacidad de contracción. Los miofibroblastos también incrementan la expresión de TGF-beta, MMP-9 y TIMPs, sin variación de MMP-1 ó 2 (87, 75) y podrían afectar a variables funcionales al colaborar en la contracción del parénquima alveolar y en el descenso de la distensibilidad (75).

### **TNF alpha**

El TNF- $\alpha$  es una potente citoquina inflamatoria identificada por primera vez en tumores en ratones, donde causaba necrosis. Posteriormente se ha visto que participa en la homeostasis y la fisiología celular, estimulando la proliferación y diferenciación celulares y causando apoptosis (32).

Se ha asociado comúnmente a esta citoquina con el infiltrado inflamatorio de diversas enfermedades pulmonares como la fibrosis pulmonar, el asma, EPOC o enfisema. Además, se ha observado que en fumadores que desarrollan EPOC está aumentada, por lo que se considera que los polimorfismos en este polipéptido pueden ser clave en el desarrollo de la enfermedad. (52, 10).

El TNF- $\alpha$  es producido por diferentes células, entre las que destacan los macrófagos. Del mismo modo, numerosos tipos celulares expresan receptores para esta citoquina, lo que provoca diferentes respuestas en función de la dosis, vía de administración o duración del TNF- $\alpha$ . (32).

Se han encontrado efectos antagónicos de esta citoquina en la fibrosis, relacionándola tanto con el incremento en la producción de colágeno como con su descenso (31, 72, 43).



Conociendo la actividad del LGF como antioxidante y antifibrótico en otros modelos de fibrosis, nos preguntamos si este factor de crecimiento sería capaz de revertir o atenuar las lesiones pulmonares en las que la reparación del tejido conectivo es protagonista, lesiones como la fibrosis y el enfisema pulmonar. El LGF es capaz de disminuir la cantidad de colágeno, reorganizar la arquitectura pulmonar, y mejorar en último término la función pulmonar, en ratas con fibrosis y enfisema inducidos por cloruro de cadmio.

# Objetivos

---

El objetivo principal de este trabajo es comprobar si el LGF es capaz de actuar sobre la fibrosis y el enfisema pulmonares previamente establecidos mediante la administración de cloruro de cadmio, lo que abriría la puerta al posible uso de este factor de crecimiento como agente terapéutico en la EPOC. Con el fin de poder abordar este objetivo general, se establecieron una serie de objetivos concretos:

1. Desarrollar un modelo estable que curse conjuntamente con fibrosis y enfisema pulmonar mediante la administración de cloruro de cadmio.
2. Comprobar si el LGF es capaz de mejorar la función pulmonar.
3. Comprobar si el LGF es capaz de actuar sobre la fibrosis pulmonar actuando sobre las proteínas de matriz.
4. Comprobar si el LGF es capaz de retornar a valores normales el área interna alveolar y la distancia media entre las paredes alveolares, parámetros que se ven incrementados debido al enfisema.
5. Establecer la posible vía de acción del LGF sobre el remodelado tisular a través de metaloproteasas y de la síntesis *de novo* de proteínas de matriz.

# Materiales y métodos

## 1. ELABORACIÓN DEL MODELO ANIMAL

El Comité Ético de Experimentación Animal de la Fundación Jiménez Díaz-Capio aprobó todas las experimentaciones realizadas con animales. Para desarrollar el modelo animal de fibrosis pulmonar con enfisema centroacinar se utilizaron 42 ratas macho de raza Wistar, con un peso de 200-230 gr. y 8 semanas de edad. Los grupos de estudio se distribuyeron del siguiente modo:

- **Grupo control:** Ratas instiladas orotraquealmente con 0.5 ml de suero salino fisiológico.
- **Grupo CdCl<sub>2</sub>:** Instiladas orotraquealmente con 0.5 ml de una solución de cloruro de cadmio al 0.025%.
- **Grupo LGF:** Instiladas orotraquealmente con 0.5 ml de una solución de cloruro de cadmio al 0.025% y tratadas con LGF intraperitonealmente.

### 1.1. INDUCCIÓN DE LA LESIÓN

Antes de inducir la lesión, las ratas fueron parcialmente anestesiadas con isofluorano (Forane<sup>®</sup>.Abbott).

La administración de suero salino y cloruro de cadmio se realizó mediante instilación orotraqueal en una única dosis de 0.5 ml de suero salino fisiológico, o bien de una solución de cloruro de cadmio (Sigma) al 0.025% en suero salino.

Para la instilación se utilizó un otoscopio, con el fin de abrir la boca al animal y localizar la glotis, a través de la cual se introdujo una cánula en la traquea. Para confirmar la correcta localización de la cánula en las vías respiratorias, se acopló la cánula a un sistema de ventilación manual y se observaron los movimientos torácicos. A continuación se conectó a la cánula una jeringa cargada con el suero salino o la solución de cloruro de cadmio. Una vez inyectado el contenido de la jeringa, se volvió a conectar la cánula al ventilador manual para distribuir lo mejor posible la solución por el parénquima pulmonar. Con este mismo fin, una vez retirada la cánula se dispuso al animal en diferentes posiciones corporales.

Las ratas fueron vigiladas hasta su total recuperación de la anestesia y posteriormente colocadas en sus jaulas, donde se les administró agua y comida *ad libitum* hasta el momento de su estudio.

## 1.2. CONSTATACIÓN DE LA LESIÓN

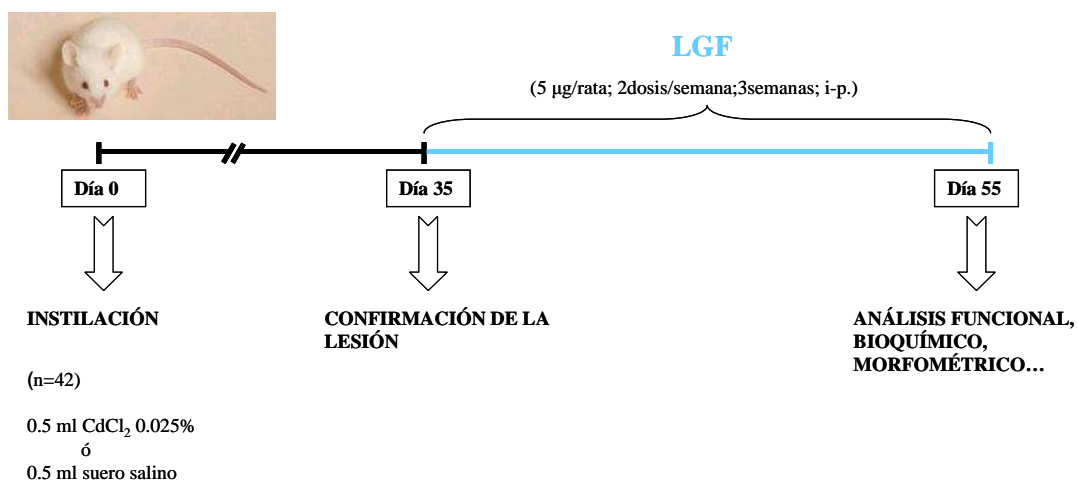
Para comprobar la presencia de fibrosis pulmonar antes de iniciar el tratamiento con LGF, se realizaron estudios preliminares de función pulmonar y microscopía en 15 animales (8 controles y 7 CdCl<sub>2</sub>), transcurridos 35 días de la instilación.

## 1.3. ADMINISTRACIÓN DE LGF

El LGF fue proporcionado por el grupo del Dr. Díaz-Gil del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid, donde fue aislado, purificado y liofilizado, previa comprobación de la ausencia de otros factores de crecimiento y/o contaminantes en la preparación.

Una vez confirmada la presencia de fibrosis a los 35 días, se inició el tratamiento con LGF, reconstituido en salino y administrado por vía intraperitoneal a las ratas, a razón de dos inyecciones por semana, durante tres semanas. La dosis administrada fue la estimada como óptima por el grupo que nos proporcionó el LGF, 5 µg/rata.

Además de las ratas del grupo LGF, con el fin de confirmar que este factor de crecimiento no presenta efectos negativos sobre los animales sanos, también recibieron el tratamiento con LGF 7 ratas del grupo control (a partir de ahora a este subgrupo se le denominará como control+LGF). El resto de animales del grupo control y CdCl<sub>2</sub> recibieron el mismo tratamiento, sustituyendo el LGF por suero salino.



## **2. VALORACIÓN DEL INCREMENTO DE PESO DEL ANIMAL Y DEL PESO DEL PULMÓN**

Antes de iniciarse el experimento se registró el peso de los animales, proceso que se repitió antes de realizar el estudio funcional. De este modo se calculó la variación del peso de los distintos grupos para comprobar cómo afecta la administración de cloruro de cadmio al peso de los animales y si el LGF ejerce alguna acción sobre éste.

Tras la realización de las pruebas funcionales se extirpó el pulmón izquierdo y se pesó, con el fin de averiguar si el LGF es capaz de influir sobre el incremento de peso esperado, incremento que se debe a la inflamación y al edema pulmonar que provoca la administración de cloruro de cadmio.

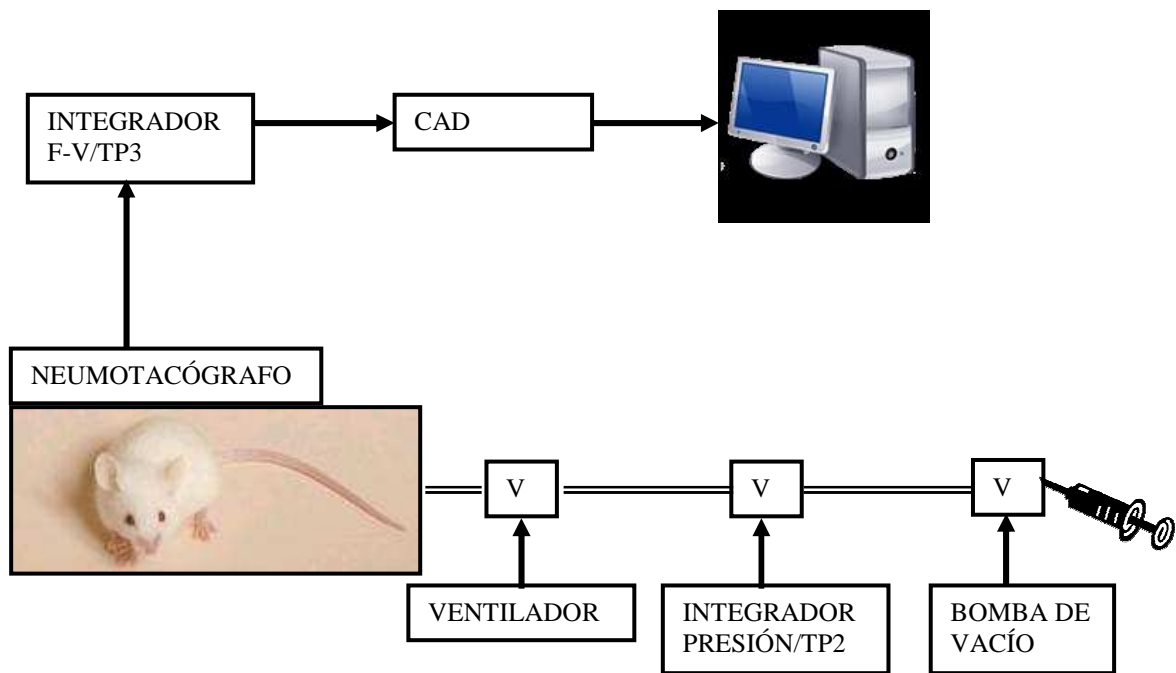
## **3. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN PULMONAR**

Los distintos elementos del sistema utilizado para evaluar la función pulmonar se detallan a continuación y están esquematizados en las figuras 4 y 5:

- Pletismógrafo de volumen de 1.6 litros, donde se introdujo a los animales.
- Neumotacógrafo con una caída de presión de 0.1 cm H<sub>2</sub>O/ml/s a 2 ml/s.
- Miniventilador volumétrico (Harvard 50-1718) con distintas posibilidades de volúmenes y frecuencias respiratorias.
- Bomba de vacío (Emerson9 a una presión de -40 cm de H<sub>2</sub>O).
- Transductor diferencial de presión con integrador (TP1) (Validyne MP 45-871)
- Transductor de presión (TP2) (Poch-Milla, I+D).
- Transductor de flujo y volumen con integrador (TP3) (Poch-Millas, I+D).
- Convertidor analógico digital (CAD) para transformar las señales analógicas de los transductores de presión y del integrador de flujo y volumen en señales digitales, transformando -10 a +10 voltios en -2048 a +2048 bytes.
- Ordenador para almacenar los datos de las curvas presión-volumen y flujo-volumen.

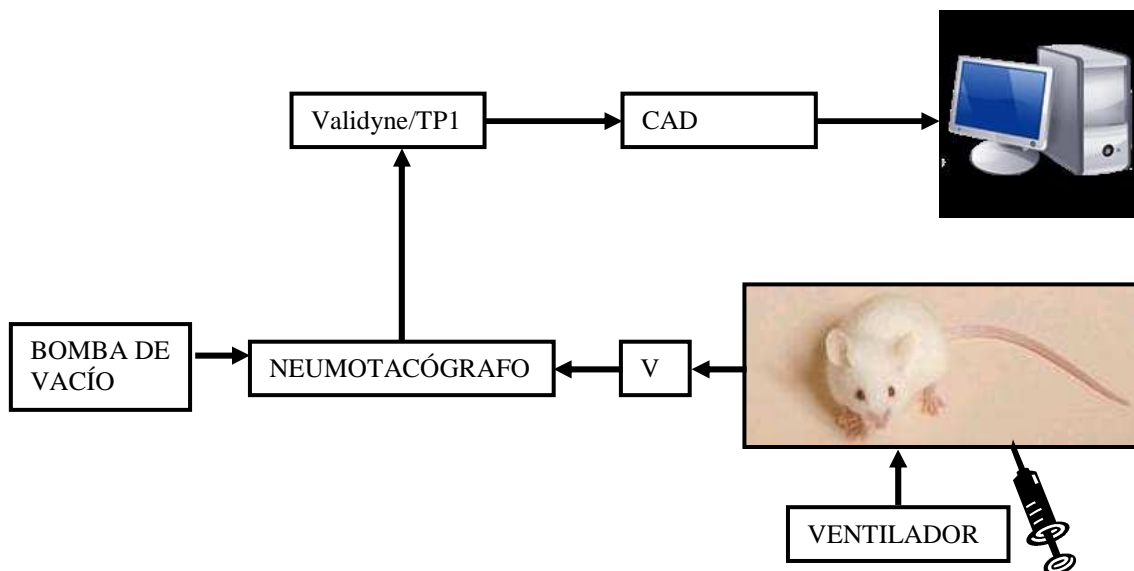
- Software para la recogida y almacenaje a tiempo real de 1000 puntos por segundo para su posterior cálculo.
- Válvulas de tres vías (V) para conectar entre sí los distintos aparatos del sistema.

### CURVA PRESIÓN-VOLUMEN



**Figura 4:** Esquema del sistema utilizado para la realización de las curvas de presión-volumen pulmonares. TP2 y TP3: transductores de presión, CAD: convertidor analógico digital, V: válvulas de 3 vías



**CURVA FLUJO-VOLUMEN**

**Figura 5:** Esquema del sistema utilizado para la realización de las curvas flujo-volumen pulmonares. TP1: transductor de presión, CAD: convertidor analógico digital, V: válvulas de 3 vías

**PRUEBAS DE FUNCIÓN PULMONAR**

Antes de iniciarse el estudio, cada animal fue anestesiado intraperitonealmente con pentotal sódico (Braun) a razón de 60 mg/kg de peso corporal. A continuación, se llevó a cabo la traqueotomía, realizando una incisión en la región cervical de la rata e introduciendo un catéter (40 mm de longitud, 1.5 mm de diámetro interno y 3 mm de diámetro externo) en la traquea. Tras depositar a la rata en el pletismógrafo y conectarla a un sistema de ventilación artificial con 4 ml de volumen y una frecuencia de 58 respiraciones por minuto, se le inyectaron intraperitonealmente 0.2 mg de bromuro de pancuronio para paralizar la respiración espontánea.

### **3.1. CÁLCULO DEL VOLUMEN PULMONAR**

La capacidad inspiratoria (CI) se estimó como el volumen necesario para alcanzar una presión de +30 cm de H<sub>2</sub>O en la vía aérea. Para su cálculo se desconectó a la rata del ventilador durante unos segundos, alcanzando así su capacidad residual funcional (CRF). A través de una jeringa se introdujo aire en el pulmón, hasta alcanzar la presión deseada, +30 cm de H<sub>2</sub>O. Tras repetir la maniobra tres veces para minimizar los errores, se consideró como CI a la media del volumen insuflado.

### **3.2. CURVAS DE PRESIÓN-VOLUMEN CUASIESTÁTICAS**

Las curvas de presión-volumen nos proporcionan información sobre las propiedades elásticas del pulmón a través de la distensibilidad (C<sub>L</sub>), o lo que es lo mismo, la relación presión-volumen del pulmón.

Para su realización se desconectó al animal del ventilador hasta alcanzar su CRF. Tras extraer el aire de los pulmones para alcanzar su volumen residual, se le introdujo con ayuda de una jeringa el volumen de aire correspondiente a su CI, a un flujo aproximado de 1 ml/s. Una vez alcanzada la capacidad pulmonar total (CPT) se conectó la bomba de vacío, extrayendo el aire de los pulmones a un flujo constante de 1.2 ml/s, hasta alcanzar nuevamente el VR. Durante toda la maniobra se controló la presión de la vía aérea a través del TP2.

Cada curva fue repetida por triplicado, tomando como distensibilidad la media de la máxima pendiente de las curvas de presión-volumen espiratorias.

### **3.3. CURVAS DE FLUJO-VOLUMEN**

Las curvas de flujo-volumen nos permiten averiguar la CVF y el flujo espiratorio forzado al 75% de la CVF.

Para realizar esta prueba se desconectó a la rata del ventilador y una vez alcanzada su CRF se le introdujo el volumen de aire correspondiente a su CI en el pulmón con ayuda de una jeringa, alcanzando su CPT. A continuación, se indujo una espiración forzada con ayuda de la bomba de vacío, hasta alcanzar el VR.

Cada curva se repitió 3 veces, estimándose como CVF la media de los volúmenes obtenidos desde el estado de máxima inspiración hasta alcanzar el VR.

#### **4. EXTRACCIÓN DEL BLOQUE CARDIO-PULMONAR**

Una vez realizados los estudios funcionales, las ratas fueron sacrificadas mediante sobredosis de anestesia. A continuación, para extraer el bloque cardio-pulmonar, se abrió el tórax, se seccionó el diafragma para provocar el colapso pulmonar y se perfundieron los pulmones con suero salino a través de la arteria pulmonar.

El pulmón izquierdo se destinó a estudios bioquímicos y de biología molecular, previa extracción, congelado y almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Antes de realizar cualquier estudio, el tejido fue pulverizado en un mortero metálico, previamente tratado y enfriado para evitar tanto la presencia de RNAsas como el descongelado del tejido.

El pulmón derecho se destinó a estudios de anatomía patológica, para lo que se conectó a través del catéter de la traquea una columna con una solución tamponada de formalina al 10%, a una presión de 25 cm de  $\text{H}_2\text{O}$  durante 24 horas.

#### **5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

##### **5.1. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE MATRIZ MEDIANTE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS**

###### **5.1.1 CUANTIFICACIÓN DE COLÁGENO**

La hidroxiprolina es un aminoácido que se encuentra primordialmente en el colágeno, siendo su contenido despreciable en otras proteínas, tales como el surfactante pulmonar.

Para llevar a cabo la cuantificación de proteínas se utilizó el pulmón izquierdo. Con ayuda de un mortero especialmente diseñado se pulverizó el tejido y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis. Todo el proceso fue realizado respetando la temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , por lo que se enfrió previamente el material utilizado a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se utilizó nitrógeno líquido.

Para la cuantificación del colágeno pulmonar se utilizó un método colorimétrico (76) cuya fiabilidad y reproducibilidad ha sido confirmada. En primer lugar, se realizó una digestión ácida de 30 mg de tejido pulverizado en HCl 6N durante 24 horas a  $120^{\circ}\text{C}$ , neutralizando después la digestión con NaOH hasta un pH de 7. Se incubaron las

muestras durante 20 minutos con cloramina T (Merck) para oxidar los radicales libres. Tras añadir ácido perclórico se agregó el reactivo de Ehrlich (Sigma) y se incubó a 60°C durante 20 minutos. Finalmente se leyó la absorbancia a 560 nm.

Para realizar la curva patrón se utilizaron concentraciones conocidas de hidroxiprolina (Sigma; St. Louis, USA).

Los resultados se expresaron como mg de hidroxiprolina por mg de pulmón izquierdo.

### **5.1.2 CUANTIFICACIÓN DE ELASTINA**

Para cuantificar la elastina se homogenizaron 30 mg de tejido en PBS y TCA 10% a 4°C. Tras centrifugar y aislar las proteínas, el precipitado se trató durante 30 minutos con TCA 5% a 90°C para aislar la elastina. Este segundo precipitado se incubó con elastasa porcina pancreática tipo III (Sigma) durante 4 horas a 25°C, con el fin de obtener pequeños péptidos que facilitasen su posterior medición. Como método colorimétrico para la cuantificación de esta proteína se utilizó un kit comercial denominado Pierce BCA Protein Assay (BCA, Promega).

Para realizar la curva patrón se utilizó elastina de ligamento de cuello bovino (Sigma), sometida al mismo proceso de proteólisis que las muestras y sirviendo a su vez como control del proceso proteolítico.

Los resultados se expresaron en mg de elastina, normalizados por el peso del pulmón izquierdo.

## **5.2. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE MATRIZ MEDIANTE NORTHERN BLOT**

### **5.2.1. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL**

La extracción del RNA total se realizó siguiendo la técnica basada en la utilización de ITCG-cloroformo-fenol en medio ácido (9), con pequeñas variaciones que se detallan a continuación.

Se resuspendió el tejido en solución de lisis (isotiocianato de guanidina 4M, citrato sódico 25 mM pH 7, N-laurilsarcosina 0.5% (p/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1M). Tras centrifugar a 3.800 r.p.m. para eliminar los restos celulares, se trató el sobrenadante con acetato sódico 2M pH 4.2, fenol equilibrado con Tris-HCl 0.1 M pH 8

y cloroformo isoamílico 49:1 (v/v). Tras centrifugar a 12.000 r.p.m., se extrajo el RNA de la fase acuosa y se trató con isopropanol, manteniéndolo a -20°C para favorecer la precipitación del ácido nucleico. A continuación, tuvieron lugar una serie de tratamientos con etanol 70% y 100% y de centrifugaciones en frío, para intentar obtener el RNA lo más puro posible. Finalmente, se resuspendió el RNA en agua tratada con dietilpircarbonato 0.1%, asegurando así la ausencia de RNAsas en las muestras.

La concentración y la pureza del RNA obtenido se determinaron mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm de longitud de onda

### **5.2.2. OBTENCIÓN DE LAS MEMBRANAS**

Para la preparación de las muestras, se resuspendieron 20 µg de RNA en una solución compuesta por 50% de formamida, 6% de formaldehído, MOPS 1x y bromuro de etidio 1x. Como tampón de carga se utilizó LB 0.5x

Se separó el RNA en un gel de agarosa (Pronadisa, Madrid, España) al 1.3% (p/v) en condiciones desnaturalizantes (6.7% formaldehído, MOPS 1x). Como tampón de electroforesis se utilizó MOPS 1x.

La transferencia del RNA a las membranas de nylon (Gene Screen, New England Nuclear Co, Boston, EEUU) se realizó por capilaridad, utilizando como tampón de transferencia SSC 10x. A continuación, se fijó el RNA a la membrana mediante exposición a luz ultravioleta y a calor (80°).

### **5.2.3. ELABORACIÓN Y MARCAJE DE LAS SONDAS**

La obtención de las sondas para la hibridación se realizó mediante la técnica de Transcripción Inversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), empleando para ello el kit comercial Access RT-PCR System (Promega, Madison WI, USA).

Para la elaboración de las sondas se partió de RNA total aislado de ratas controles y de cebadores específicos (tabla 4) diseñados en nuestro laboratorio a partir de las secuencias descritas en la base de datos GeneBank. El RNA total se transcribió a DNA complementario (cDNA) mediante la enzima transcriptasa inversa (RT) de Avian Myeloblastosis Virus (AMV). El cDNA obtenido se utilizó para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) obteniendo el cDNA amplificado mediante la enzima DNA

polimerasa termoestable Tfl, purificada de *Thermus flavus*, cuya actividad no se ve modificada al elevar la temperatura para inactivar la transcriptasa inversa.

El producto final de la RT-PCR se purificó siguiendo las instrucciones del kit comercial Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, WI. USA) y se separó mediante electroforesis en geles de agarosa 2% (p/v). Como marcador de peso molecular para comprobar el tamaño correcto, la pureza y concentración de la sonda se utilizó pGEM<sup>®</sup> (Promega, Madison, WI.USA) y como tampón de electroforesis TAE 1x.

El marcaje de la sonda con 10mCi/ml de [ $\alpha$ -32P] dCTP (Pacisa) se realizó mediante la técnica de random primed, utilizando el kit Random Primed DNA Labeling kit (Roche, IN. USA). La sonda marcada se purificó utilizando el kit Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-Up System (Promega, Madison, WI. USA).

Tanto en la técnica de RT-PCR como en la de random primed se utilizó un termociclador MiniCycler<sup>™</sup> (MJ Research, Watertown, MA. USA).

Para calcular el número de cuentas por minuto de la sonda marcada se utilizó un contador beta, modelo LS 6000 TA (Beckman Coulter).

Proteína	Secuencia cebadores	Tm	Ciclos	Nºpb
<b>Colágeno III</b>	Sentido: 5' AGA TGG ATC AAG TGG ACA TC 3' Antisentido: 5' TAC CTT TGG CCT CTT TGT AC 3'	58°C	23	449
<b>Elastina</b>	Sentido: 5' TGT TCC TGG TGG AGT AGC AG 3' Antisentido: 5' CTT GAT ATC CCA GGG CTC CA 3'	61°C	30	432
<b>GAPDH</b>	Sentido: 5' AACCACCACGTCCTACGTAA 3' Antisentido: 5' ATACTGTTACTTATACCGATG 3'	54°C	25	516

**Tabla 4:** Relación de cebadores utilizados para la construcción mediante RT-PCR de las sondas utilizadas en el Northern blot. Tm: temperatura media de fusión, nº de ciclos, nº pb: número de pares de bases.

Las membranas se prehibridaron durante unas 4 horas con una solución compuesta por 50% de formamida desionizada, 1x Denhardt's, 50 mM de tampón fosfato pH 6.5, 5x SSC, 1% SDS y 0.1 mg/ml de esperma de salmón desnaturalizado. A

continuación, se llevó a cabo la hibridación en una solución con los mismos componentes que la de prehibridación y sulfato de dextrano al 12.5% y  $1 \cdot 10^6$  cpm/ml de la sonda correspondiente, marcada y desnaturalizada. Transcurridas 18 horas, se realizaron sucesivos lavados de las membranas a diversas concentraciones de SSC y SDS. Finalmente, se expusieron las membranas a películas tipo X-Omat UV (Kodak, Francia) a  $-70^{\circ}\text{C}$  para intensificar la señal.

Una vez reveladas las autorradiografías, se densitometraron las bandas obtenidas con el programa ImageQuant y se normalizaron los resultados con los obtenidos de la hibridación de las membranas con la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), utilizada como control de carga.

Los resultados se expresaron como porcentaje respecto del valor medio del grupo control, considerando éste como el 100%.

### **5.3. VALORACIÓN DE PROTEASAS**

La valoración de proteasas se realizó mediante Western blot. Para ello, se extrajeron las proteínas pulmonares, homogenizando 50 mg del pulmón previamente pulverizado en 300  $\mu\text{l}$  de tampón de extracción (25 mM Hepes pH 7.4, 4 mM EDTA, 25 mM Benzamidina, 1% Triton X-100, 1  $\mu\text{M}$  Leupeptina, 1  $\mu\text{M}$  Pepstatina y 1  $\mu\text{M}$  Aprotinina). Tras mantener el homogeneizado en hielo durante 90 minutos, se centrifugó a 12000 r.p.m., separando la fracción citosólica del resto del extracto celular. La concentración de las proteínas totales extraídas se calculó colorimétricamente, con ayuda del kit comercial Pierce BCA Protein Assay (BCA, Promega). Para la realización de la curva patrón se utilizó el estándar de albúmina de suero bovino incluido en el kit.

Se separaron electroforéticamente 75  $\mu\text{g}$  del extracto proteico en un gel de PAGE-SDS 13% y se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF. Las uniones inespecíficas se bloquearon a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora con leche descremada en polvo al 10% en tampón Tris-HCl (Tris-HCl 1M pH 7.4, NaCl 9%, 0.05% Tween-20). Acto seguido, se incubaron las membranas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora con el anticuerpo primario correspondiente (tabla 5). A continuación, se lavaron las membranas sucesivamente con TBS y TBS-tween y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con peroxidasa. Acto seguido, se lavaron las membranas y se revelaron mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham). Por último, se lavaron las membranas en TBS-Tween para eliminar la unión del anticuerpo

y se las sometió a un nuevo proceso de bloqueo e incubación con un anticuerpo primario para tubulina, proteína utilizada como control de carga.

Finalmente, se densitometraron las bandas obtenidas utilizando el programa ImageQuant y se normalizaron los resultados, hallando la relación entre la proteasa correspondiente y la tubulina.

Los resultados se expresaron como porcentaje respecto del valor medio obtenido para el grupo control, considerando éste como el 100%.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Fuente</b>	<b>Dilución</b>	<b>Proveedor</b>
<b>Anti-MMP-2</b>	Conejo	1:1000	Chemicon Int.
<b>Anti-MMP-12</b>	Conejo	1:1000	Chemicon
<b>Int.Anti-<math>\alpha</math>-Actina</b>	Ratón	1:8000	Sigma
<b>Anti-<math>\alpha</math>-Tubulina</b>	Ratón	1:8000	Sigma

**Tabla 5:** Relación de los anticuerpos utilizados para la realización del Western blot

#### **5.4. VALORACIÓN DE ALPHA-ACTINA**

La valoración de alpha-actina se realizó mediante la técnica de Western blot, siguiendo el mismo procedimiento explicado para la valoración de proteasas e incubando con el anticuerpo correspondiente.

#### **5.5. CUANTIFICACIÓN DE TIMP-1**

La valoración del inhibidor de proteasas TIMP-1 se realizó mediante ELISA, siguiendo las instrucciones indicadas en el kit comercial para TIMP-1 Quantikine® (R&D Systems, Minneapolis, MN. USA). La absorbancia fue leída a 450 y 562 nm. Los resultados se expresaron en pg/ml.

#### **6. CUANTIFICACIÓN DE TNF-ALPHA**

La valoración del factor de necrosis tumoral alpha (TNF-alpha) se realizó mediante ELISA, siguiendo las instrucciones indicadas en el kit comercial para TNF-



alpha Quantikine® (R&D Systems, Minneapolis, MN. USA). La absorbancia fue leída a 450 y 562 nm. Los resultados se expresaron en pg/ml.

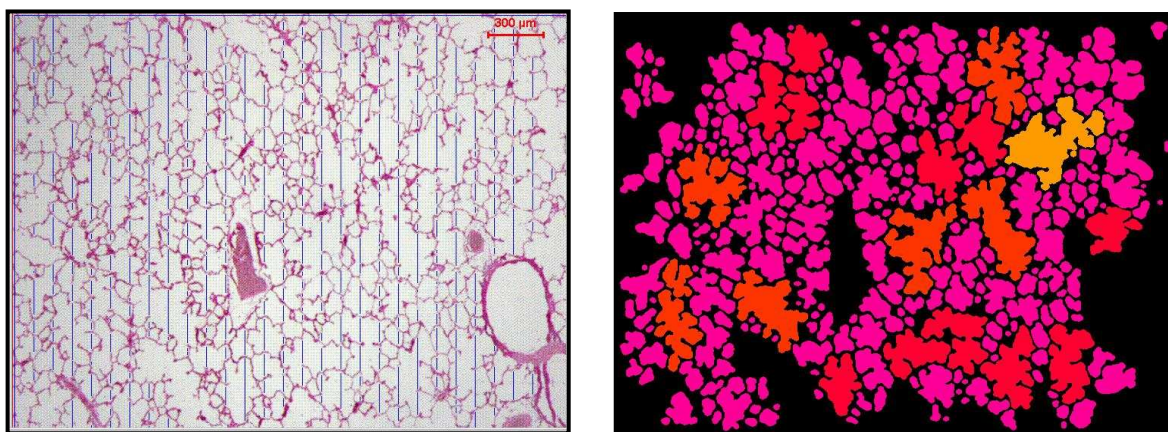
## **7. ANÁLISIS MICROSCÓPICO PULMONAR**

El pulmón derecho fue fijado introduciendo en él una solución tamponada de formalina 10% a través de la traquea durante 24 horas, a una presión aérea de 25 cm de agua, presión que asegura la apertura de los alvéolos y no daña la estructura pulmonar. A continuación, los pulmones fueron tallados y tras someterlos a concentraciones crecientes de etanoles y xilol, fueron incluidos en parafina. Con ayuda de un microtomo modelo HM 325 (Microm, Waldorf, Alemania) se obtuvieron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de grosor, que fueron teñidos con hematoxilina-eosina o rojo sirio.

Para visualizar las imágenes se empleó una videocámara (Leica DC 100; Leica Microsystems; Cambridge, UK) con una resolución de 782 x 582 pixels y un objetivo 0.5 x, adaptada a un microscopio (Olympus BX40; Japan), utilizando el objetivo 10x.

### **7.1. VALORACIÓN DEL AIA Y LA $L_M$**

Para analizar el área interna alveolar (AIA,  $\mu\text{m}^2$ ) y la distancia media entre las paredes alveolares ( $L_M$ ,  $\mu\text{m}$ ) en las muestras teñidas con hematoxilina-eosina, se utilizó el programa de análisis de imágenes, Leica Qwin. El cálculo de la  $L_M$  se basa en el recuento microscópico del número de paredes alveolares que cruza una trama de líneas verticales y horizontales, colocada sobre la imagen digitalizada del pulmón (figura 6).



**Figura 6:** Representación de la  $L_M$  (izquierda) y el área interna alveolar (AIA) (derecha).

## **7.2. CUANTIFICACIÓN DE LA CANTIDAD DE COLÁGENO MEDIANTE ROJO SIRIO**

Mediante la utilización del mismo programa mencionado anteriormente, Leica Qwin, y un adaptador que nos proporcionaba luz polarizada al microscopio, se calculó el contenido de colágeno en las muestras teñidas con rojo sirio. Para ello se comparó la birrefringencia de las zonas ricas en colágeno con respecto al tejido total de la zona estudiada en cada campo microscópico.

Los resultados se expresan como la media obtenida tras medir 18 campos microscópicos diferentes.

## **7.3. VALORACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA PULMONAR**

Con el fin de valorar la respuesta inflamatoria pulmonar originada tras la instilación de cloruro de cadmio, se analizaron 24 campos por grupo de las muestras teñidas con hematoxilina-eosina, utilizando un microscopio óptico (Olympus BX40; Japan). El estudio se hizo con un objetivo 40x y bajo la observación de dos observadores ciegos diferentes.

Tras confirmar que los macrófagos eran las células más abundantes presentes en los pulmones de las ratas sometidas a CdCl<sub>2</sub>, se cuantificó la cantidad de macrófagos de los distintos grupos de estudio mediante un método semicuantitativo visual, basado en la asignación de valores desde 0 a 4 (0=ausencia; 1=escaso; 2=moderado; 3=abundante; 4=muy abundante), método similar al utilizado por Cosio y colaboradores (7).

## **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para realizar el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Statgraphic Plus 5.1. Previamente se comprobaron la homogeneidad de la varianza, así como la normalidad de cada variable. Las comparaciones entre grupos fueron hechas mediante análisis de la varianza, ANOVA, estableciendo como nivel de significación  $p < 0.05$ . Se utilizaron tests de rango múltiple para analizar las diferencias entre las medias y se calcularon las correlaciones de Pearson's.

Todos los datos están expresados como media  $\pm$  error estándar de la media

# Resultados

---

## 1. CONSTATACIÓN DE LA LESIÓN

Transcurridos 35 días desde la instilación, comprobamos el estado de la lesión mediante la valoración de las variables funcionales, bioquímicas y microscópicas. A la vista de los resultados (tabla 6), podemos observar un descenso en todas las variables funcionales estudiadas (CI, C<sub>L</sub>, CVF y FEF<sub>75%</sub>), respecto a los valores tomados como control. También se puede apreciar un incremento significativo de las proteínas de matriz, aspecto representativo de la fibrosis pulmonar, que queda verificado valorando la cantidad de colágeno mediante rojo sirio. Por último, también se observa un aumento en las variables morfométricas (AIA y L<sub>M</sub>), que recuerdan al agrandamiento de los espacios aéreos presente en el enfisema.

Con todo ello, podemos asegurar que estamos ante un modelo de fibrosis pulmonar bien establecida, con rasgos de enfisema. Sobre este modelo, hemos probado el efecto del LGF como posible agente antifibrótico, con el fin de intentar revertir la lesión.

	<b>CONTROL</b>	<b>CdCl<sub>2</sub></b>
<b>CI</b>	16.3 ± 0.6	11.5 ± 0.7 *
<b>C<sub>L</sub></b>	1.3 ± 0.07	0.8 ± 0.09 *
<b>CVF</b>	16.3 ± 0.6	11.1 ± 0.7 *
<b>FEF<sub>75%</sub></b>	75.7 ± 6.5	33.4 ± 6.0 *
<b>HYP</b>	1.5 ± 0.2	3 ± 0.6 *
<b>ELASTINA</b>	13.8 ± 1.4	19.4 ± 2.6 *
<b>R. SIRIO</b>	1.3 ± 0.2	2.4 ± 0.2 *
<b>AIA</b>	5362 ± 842	9616 ± 842 *
<b>L<sub>M</sub></b>	51 ± 3	68 ± 3 *

**Tabla 6:** Datos de las variables funcionales, bioquímicas y microscópicas estudiadas a los 35 días de la instilación de CdCl<sub>2</sub>. Control (n=8), CdCl<sub>2</sub> (n=7), CI: capacidad inspiratoria (ml), C<sub>L</sub>: distensibilidad (ml/cm H<sub>2</sub>O), CVF: capacidad vital forzada (ml), FEF<sub>75%</sub>: flujo espiratorio forzado al 75% de la CVF (ml/segundo), HYP: hidroxiprolina (mg de proteína/pulmón izquierdo), elastina (mg de proteína/pulmón izquierdo), rojo sirio (birrefringencia/total tejido), AIA: Área Interna Alveolar (μm<sup>2</sup>), L<sub>M</sub>: distancia media entre paredes alveolares (μm). (\*): Significativamente diferente del grupo control, p< 0.05.

No se encontraron diferencias significativas entre los animales del grupo CdCl<sub>2</sub> sacrificados a los 35 ó a los 55 días, por lo que podemos atrevernos a decir que la lesión parece ser estable y que los grupos de estudio son homogéneos entre sí.

## 2. CONFIRMACIÓN DE LA AUSENCIA DE EFECTO NOCIVO DEL LGF

Con el fin de confirmar que el LGF no presenta efectos negativos en los animales sanos, se administró LGF a 7 ratas del grupo control. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros funcionales, bioquímicos o morfométricos valorados (tabla 7), concluyendo que el LGF no parece tener ningún efecto nocivo en los animales sanos, al menos al nivel pulmonar observado.

	<b>CONTROL</b>	<b>CONTROL + LGF</b>
<b>CI</b>	16.5 ± 0.5	16.8 ± 0.5
<b>C<sub>L</sub></b>	1.2 ± 0.06	1.3 ± 0.06
<b>CVF</b>	16.7 ± 0.6	16.8 ± 0.5
<b>FEF<sub>75%</sub></b>	77.4 ± 4.6	79.8 ± 6.4
<b>HYP</b>	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.3
<b>ELASTINA</b>	12.3 ± 1.3	13.8 ± 1
<b>R. SIRIO</b>	1.5 ± 0.2	1.9 ± 0.2
<b>AIA</b>	3981 ± 1141	4154 ± 551
<b>L<sub>M</sub></b>	46 ± 2	47 ± 2
<b>Δ PESO</b>	184 ± 11	156 ± 12 *
<b>PESO PULMÓN</b>	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1
<b>mRNA COL III</b>	100 ± 20	153 ± 17
<b>mRNA ELASTINA</b>	100 ± 16	145 ± 36
<b>MMP-2</b>	100 ± 11	79 ± 19
<b>MMP-12</b>	100 ± 24	186 ± 34
<b>α-ACTINA</b>	100 ± 21	102 ± 13
<b>TIMP-1</b>	10457 ± 588	10451 ± 1720
<b>TNF-α</b>	0.18 ± 0.01	0.24 ± 0.02 *
<b>MACRÓFAGOS</b>	1.75 ± 0.13	1.69 ± 0.20

**Tabla 7:** Estudio de las diferentes estudiadas en los grupos control (n=8) y control tratado con LGF (n=7). CI: capacidad inspiratoria (ml), C<sub>L</sub>: distensibilidad (ml/cm H<sub>2</sub>O), CVF: capacidad vital forzada (ml), FEF<sub>75%</sub>: flujo espiratorio forzado al 75% de la CVF (ml/segundo), HYP: hidroxiprolina (mg de proteína/pulmón izquierdo), elastina (mg de proteína/pulmón izquierdo), Rojo sirio (birrefringencia/total tejido), AIA: área interna alveolar (μm<sup>2</sup>), L<sub>M</sub>: distancia media entre paredes alveolares (μm), Δ peso animal (g), peso pulmón izquierdo (g), mRNA de colágeno III y elastina (% respecto del control), metaloproteasas 2 y 12 (% respecto del control), α-actina (% respecto del control), TIMP-1 (pg/ml), TNF-α (pg/ml), macrófagos. (\*): Significativamente diferente del grupo control, p< 0.05.

### 3. VARIACIÓN DEL PESO DE LOS ANIMALES Y PESO PULMONAR

Los resultados obtenidos en relación a la variación de peso de los animales confirman estudios previos, en los que se observa un menor incremento de peso en los animales a los que se les administró cloruro de cadmio. Este menor incremento persiste en los animales tratados con LGF (tabla 8).

En relación al peso pulmonar, se puede apreciar que los pulmones de los animales instilados con cloruro de cadmio pesan más, atenuando la administración de LGF este aumento de peso, pero sin llegar a alcanzar los valores del grupo control.

	Datos 35 días		Datos 55 días		
	Control	CdCl <sub>2</sub>	Control	CdCl <sub>2</sub>	LGF
<b>Δ Peso animal</b>	126 ± 8	89 ± 9*	184 ± 11	150 ± 10 *	146 ± 10*
<b>Peso pulmón</b>	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0,1	1 ± 0.1 *	0.8 ± 0.1 *

**Tabla 8:** Variación del peso de los distintos grupos de estudio desde la instilación hasta su sacrificio a los 35 días (grupo Control, n=8; CdCl<sub>2</sub>, n=7) o a los 55 días (grupo Control, n=8; CdCl<sub>2</sub>, n=7; LGF, n=7). Peso del pulmón izquierdo. Datos expresados en gramos. (\*): Significativamente diferente del grupo control, p< 0.05.

#### 4. FUNCIÓN PULMONAR

Los datos relativos a los grupos de estudio propiamente dichos y sacrificados a los 55 días quedan reflejados en la tabla 9. En ella se puede apreciar que los animales instilados con CdCl<sub>2</sub> muestran un descenso significativo en la CI, C<sub>L</sub>, CVF y FEF<sub>75%</sub> en relación con el grupo control. También se puede comprobar que la administración de LGF conduce todas las variables a valores cercanos a la normalidad, alcanzando significación estadística en la CI, CVF y FEF<sub>75%</sub>, pero no en la C<sub>L</sub>.

	<b>CONTROL</b>	<b>CdCl<sub>2</sub></b>	<b>LGF</b>
<b>CI</b>	16.5 ± 0.5	11.8 ± 0,5 *	13.6 ± 0.5 *^
<b>C<sub>L</sub></b>	1.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1 *	0.9 ± 0.06 *
<b>CVF</b>	16.7 ± 0.6	11.5 ± 0.6 *	13.5 ± 0.6 *^
<b>FEF<sub>75%</sub></b>	77.4 ± 4.6	35.4 ± 4.2 *	50.3 ± 4.2 *^

**Tabla 9:** Datos de las variables funcionales estudiadas a los 55 días desde la instilación de CdCl<sub>2</sub>, una vez comprobado el establecimiento de la lesión. Control (n=8), CdCl<sub>2</sub> (n=7), LGF (n=7). CI: capacidad inspiratoria (ml), C<sub>L</sub>: distensibilidad (ml/cm H<sub>2</sub>O), CVF: capacidad vital forzada (ml), FEF<sub>75%</sub>: flujo espiratorio forzado al 75% de la CVF (ml/segundo). (\*): Significativamente diferente del grupo control, p<0.05. (^): Significativamente diferente del grupo CdCl<sub>2</sub>, p<0.05.

#### 5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE MATRIZ MEDIANTE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

Uno de los objetivos de este estudio ha sido establecer qué ocurre con las proteínas de matriz una vez establecida la lesión. Nos interesaba saber principalmente qué ocurriría con el colágeno y la elastina pulmonares, ya que son las proteínas más destacadas en la matriz extracelular del pulmón y juegan un papel importante tanto en la fibrosis como en el enfisema pulmonar.

Los animales instilados con cloruro de cadmio presentan un incremento significativo de colágeno. El tratamiento de los animales con LGF disminuye significativamente los niveles de colágeno, en el grupo previamente instilado con CdCl<sub>2</sub>.

Al igual que en el caso de el colágeno, la cantidad de elastina pulmonar presente en las ratas en las que se originó la lesión, es significativamente mayor que en los animales control. Del mismo modo, la cantidad de elastina se reduce significativamente tras el tratamiento con LGF.

En la tabla 10 se muestran los resultados relativos a los niveles de colágeno y elastina en los grupos de estudio, expresados como miligramos de proteína por pulmón izquierdo.

	<b>CONTROL</b>	<b>CdCl<sub>2</sub></b>	<b>LGF</b>
<b>HYP</b>	1.4 ± 0.2	3.8 ± 0.2 *	3.0 ± 0.2 *^
<b>ELASTINA</b>	12.3 ± 1.3	21.6 ± 1.2 *	16.5 ± 1.2 *^

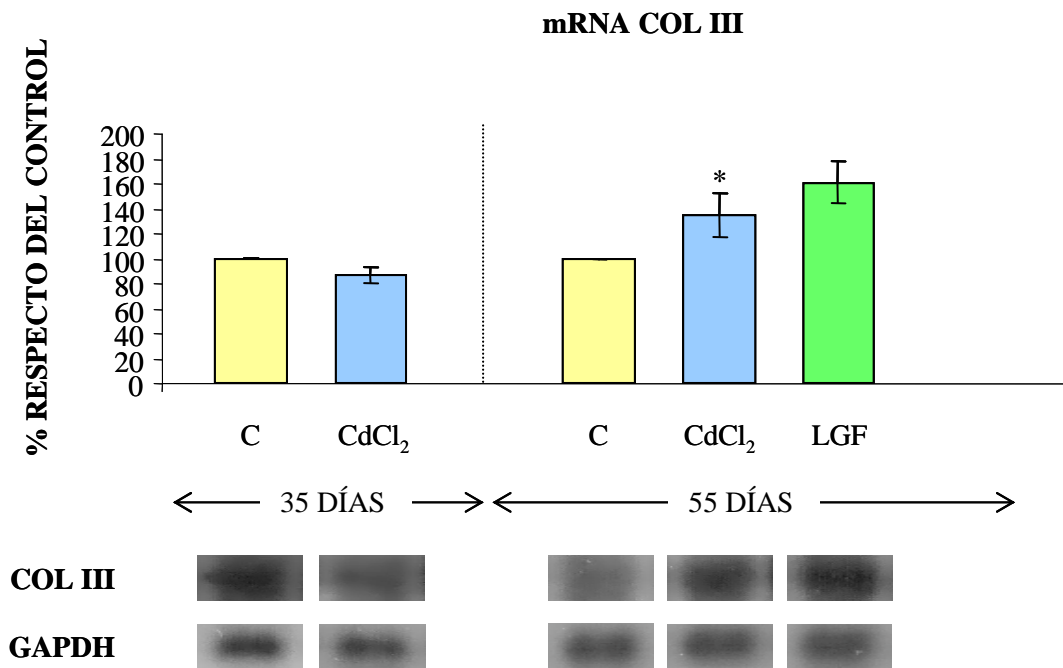
**Tabla 10:** Cuantificación colorimétrica de la cantidad de colágeno y elastina a los 55 días, valorada como mg de proteína/ pulmón izquierdo. Control (n=8), CdCl<sub>2</sub> (n=7), LGF (n=7). (\*): Significativamente diferente del grupo control, p<0.05. (^): Significativamente diferente del grupo CdCl<sub>2</sub>, p<0.05.

## **6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE MATRIZ MEDIANTE NORTHERN BLOT**

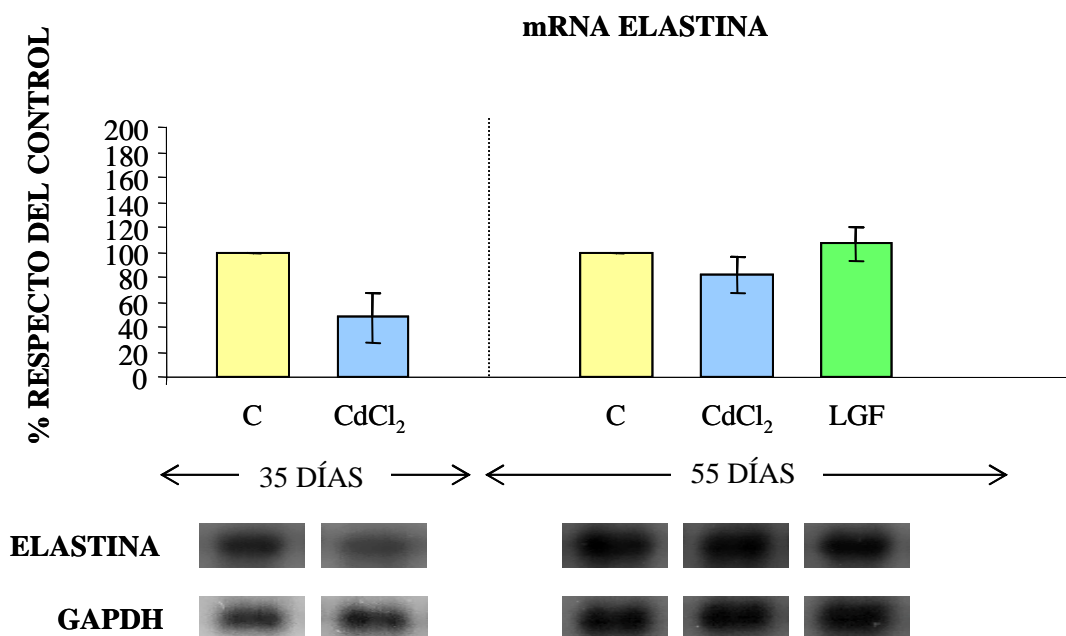
A nivel de mRNA se aprecian diferencias significativas entre los grupos control y CdCl<sub>2</sub> a los 55 días de estudio, en relación al colágeno III (figura 7).

La cantidad de mRNA de elastina no se ve modificada en ninguno de los grupos de estudio ni a los 35 ni a los 55 días (figura 8).





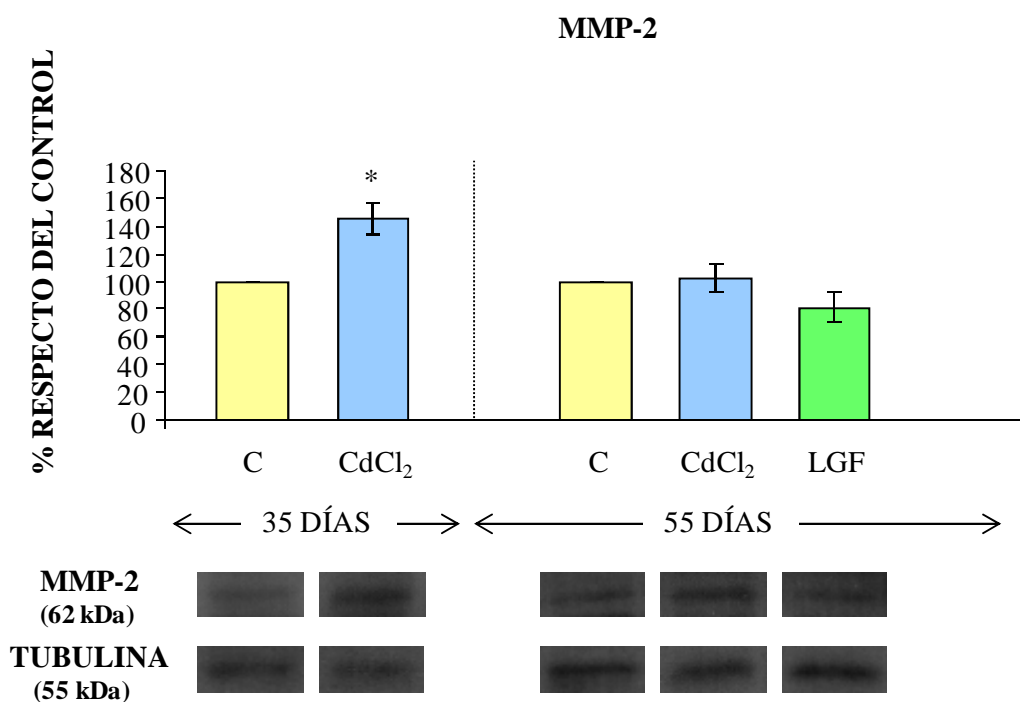
**Figura 7:** Cambios en la expresión de mRNA de colágeno III a los 35 días (grupo Control, n=8; CdCl<sub>2</sub>, n=7) y a los 55 días de la instilación (grupo Control, n=8; CdCl<sub>2</sub>, n=7; LGF, n=7). Datos expresados como porcentaje respecto del grupo control. (\*): Significativamente diferente del grupo control,  $p < 0.05$ .



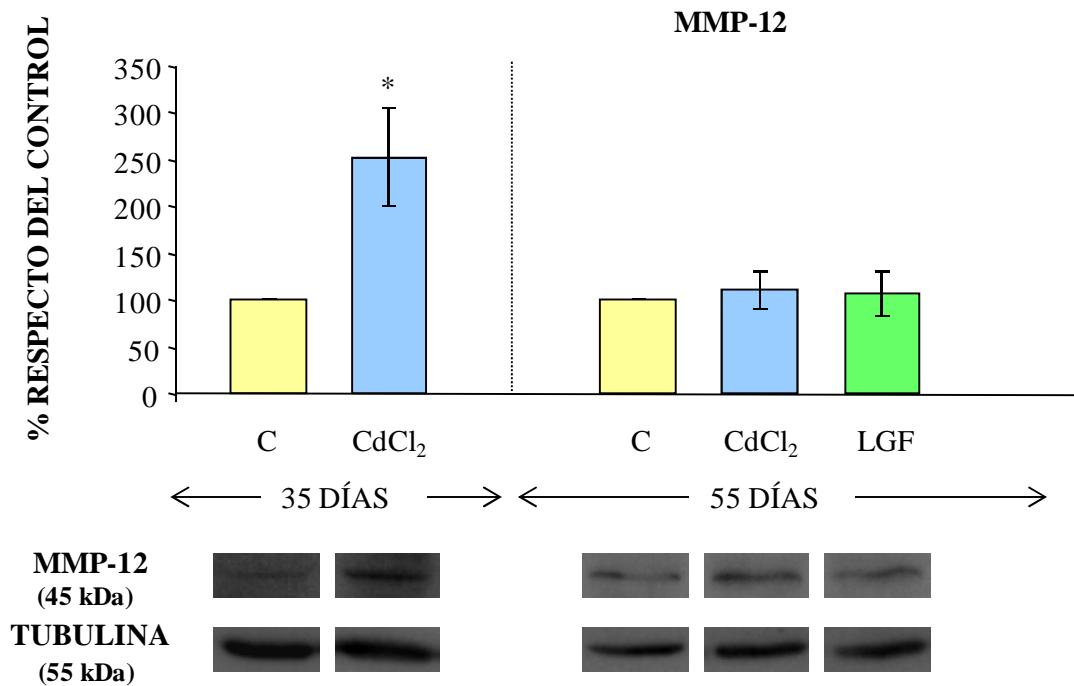
**Figura 8:** Cambios en la expresión de mRNA de elastina a los 35 días (grupo Control, n=8; CdCl<sub>2</sub>, n=7) y a los 55 días de la instilación (grupo Control, n=8; CdCl<sub>2</sub>, n=7; LGF, n=7). Datos expresados como porcentaje respecto del grupo control.

## 7. VALORACIÓN DE PROTEASAS

Los valores de proteasas, MMP-2 y MMP-12, no se ven modificados por la instilación de cloruro de cadmio o la administración de LGF (figuras 9 y 10). No obstante, a los 35 días de inducirse la lesión, apreciamos un incremento significativo de MMP-2 y MMP-12, sin embargo, este incremento no se repite en los animales objeto de estudio a los 55 días.



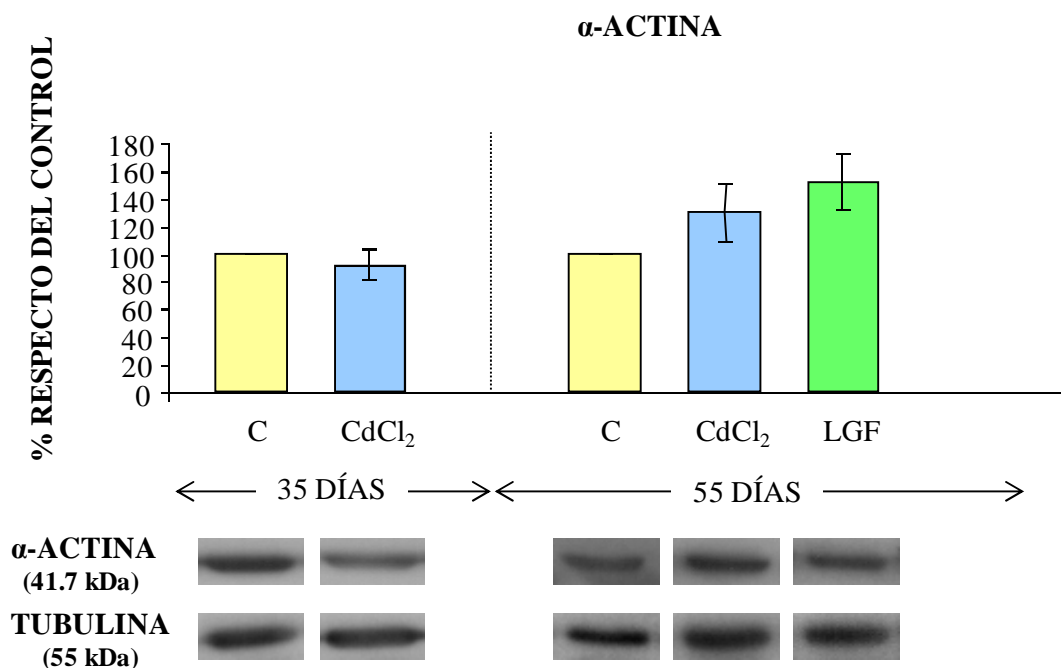
**Figura 9:** Cantidad de MMP-2 detectada mediante western blot en los distintos grupos, a los 35 días (grupo Control, n=8; CdCl<sub>2</sub>, n=7) y a los 55 días de la instilación (grupo Control, n=8; CdCl<sub>2</sub>, n=7; LGF, n=7). Datos expresados como porcentaje respecto del grupo control. (\*): Significativamente diferente del grupo control,  $p < 0.05$ .



**Figura 10:** Cantidad de MMP-12 detectada mediante western blot en los distintos grupos, a los 35 días (grupo Control, n=8; CdCl<sub>2</sub>, n=7) y a los 55 días (grupo Control, n=8; CdCl<sub>2</sub>, n=7; LGF, n=7) de la instilación. Datos expresados como porcentaje respecto del grupo control. (\*): Significativamente diferente del grupo control,  $p < 0.05$ .

## 8. VALORACIÓN DE $\alpha$ -ACTINA

En referencia a los niveles de  $\alpha$ -actina, tampoco se observan variaciones significativas de los valores de esta proteína respecto al control, por lo que podemos deducir que no se ve afectada por la administración de cloruro de cadmio ni de LGF.



**Figura 11:** Cantidad de  $\alpha$ -actina detectada mediante western blot en los distintos grupos, a los 35 días (grupo Control, n=8; CdCl<sub>2</sub>, n=7) y a los 55 días de la instilación (grupo Control, n=8; CdCl<sub>2</sub>, n=7; LGF, n=7). Datos expresados como porcentaje respecto del grupo control.

## 9. CUANTIFICACIÓN DE TIMP-1

La concentración del inhibidor de proteasas TIMP-1 no parece verse afectada por la instilación de cloruro de cadmio ni por la administración de LGF, ya que no se observan diferencias significativas en ninguno de los dos casos (tabla 11).

## 10. CUANTIFICACIÓN DE TNF- $\alpha$

El factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$  sí que parece verse influenciado por la administración de cloruro de cadmio o LGF, apareciendo diferencias significativas entre estos grupos y el grupo control (tabla 11). No obstante, cabe destacar que a los 35 días no aparecen diferencias significativas entre el grupo instilado con CdCl<sub>2</sub> y el control.

	Datos 35 días		Datos 55 días		
	Control	CdCl <sub>2</sub>	Control	CdCl <sub>2</sub>	LGF
<b>TIMP-1</b>	12137 ± 906	10128 ± 969	10457 ± 588	10491 ± 588	11231 ± 550
<b>TNF-α</b>	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.21 ± 0.01 *	0.22 ± 0.01 *

**Tabla 11:** Cantidad de TIMP-1 Y TNF-α detectada mediante ELISA en los diferentes grupos, a los 35 días (grupo Control, n=8; CdCl<sub>2</sub>, n=7) y 55 días de la instilación (grupo Control, n=8; CdCl<sub>2</sub>, n=7; LGF, n=7). Datos expresados en pg/ml. (\*): Significativamente diferente del grupo control, p< 0.05.

## 11. ESTUDIO MICROSCÓPICO

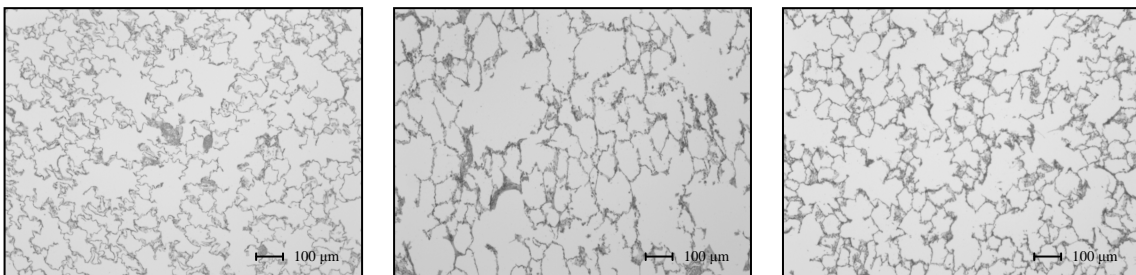
El análisis morfométrico del AIA y la L<sub>M</sub> pulmonares muestra un incremento significativo de estas variables en el grupo CdCl<sub>2</sub>, en comparación con el grupo control. Tras el tratamiento con LGF, se puede observar una ligera reducción del AIA y la L<sub>M</sub>, reducción que no llega a ser significativa (tabla 12).

Por otro lado, tras la instilación con cloruro de cadmio, apreciamos la presencia de fibrosis y el agrandamiento de los espacios aéreos en los cortes pulmonares teñidos con hematoxilina-eosina (figura 12). También se puede observar en las imágenes microscópicas que se adjuntan un menor grado de fibrosis y una reducción en el tamaño alveolar en el grupo tratado con LGF.

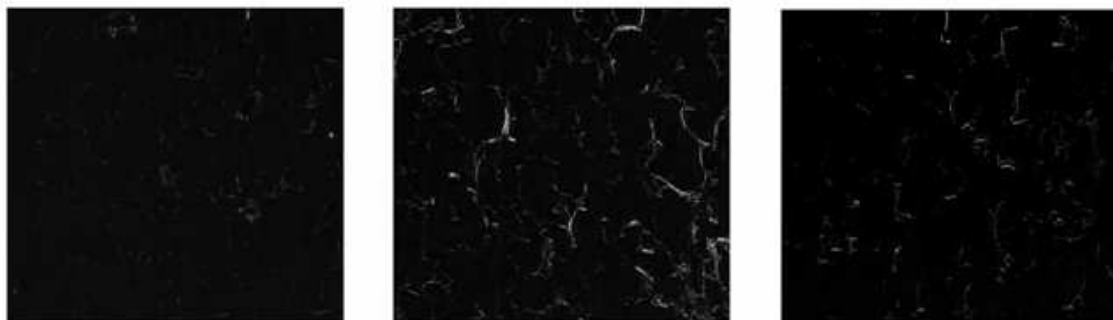
Mediante la tinción con rojo sirio también podemos comprobar que la cantidad de colágeno presente en los pulmones de los animales que recibieron cloruro de cadmio es mayor que la encontrada en el grupo control. La administración de LGF, aunque parece disminuir el colágeno pulmonar, no llega a alcanzar los valores del grupo control (tabla 12; figura 13).

	Control	CdCl <sub>2</sub>	LGF
AIA	3981 ± 1141	10931 ± 1056 *	8996 ± 1056 *
L <sub>M</sub>	46 ± 2	69 ± 2 *	63 ± 2 *
R.Sirio	1.5 ± 0.2	3.1 ± 0.2 *	2.6 ± 0.2 *

**Tabla 12:** Resultados morfométricos y cantidad de colágeno pulmonar valorada mediante rojo sirio a 55 días de la instilación (grupo Control, n=8; CdCl<sub>2</sub>, n=7; LGF, n=7). AIA: área interna alveolar (μm<sup>2</sup>), L<sub>M</sub>: distancia media entre las paredes alveolares (μm), Rojo sirio (birrefringencia/total tejido). (\*): Significativamente diferente del grupo control, p< 0.05.



**Figura 12:** Imágenes de microscopía óptica de los pulmones de los grupos control (izquierda, n=8), CdCl<sub>2</sub> (centro, n=7) y LGF (derecha, n=7). Tinción de hematoxilina-eosina (100x).



**Figura 13:** Cantidad de colágeno presente en los grupos control (izquierda, n=8), CdCl<sub>2</sub> (centro, n=7) y LGF (derecha, n=7). Imágenes de microscopía con luz polarizada de los pulmones teñidos con rojo sirio. (100x).

De acuerdo a los resultados obtenidos, el grupo  $\text{CdCl}_2$  muestra una mayor respuesta inflamatoria que el grupo control (tabla 13). La administración de LGF no parece tener efecto sobre la respuesta inflamatoria, manteniéndose elevado el número de macrófagos. Cabe destacar que no se aprecian diferencias significativas en los animales estudiados a los 35 días, posiblemente debido a la elevada dispersión en relación al número de macrófagos que muestran los datos del grupo control a este tiempo de estudio.

	Datos 35 días		Datos 55 días		
	Control	$\text{CdCl}_2$	Control	$\text{CdCl}_2$	LGF
<b>MACRÓFAGOS</b>	$1.91 \pm 0.18$	$2.01 \pm 0.20$	$1.75 \pm 0.13$	$2.19 \pm 0.11 *$	$2.17 \pm 0.11 *$

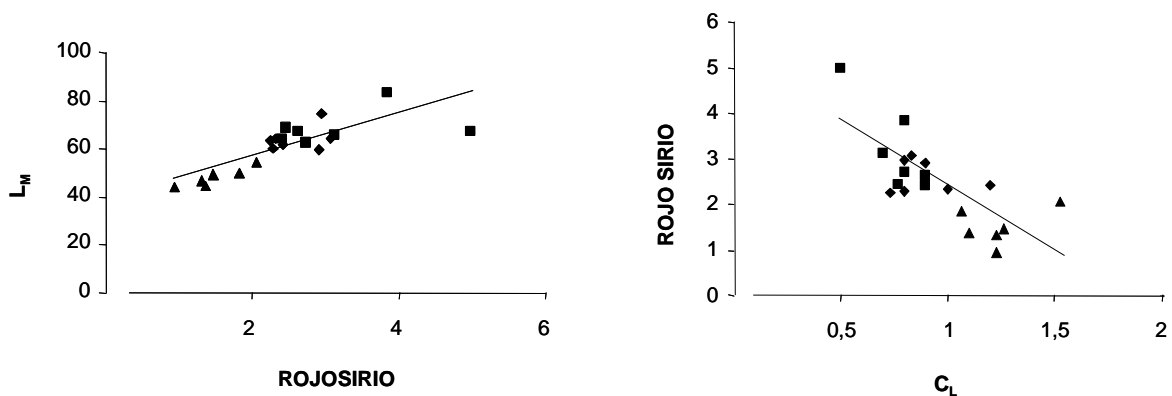
**Tabla 13:** Número medio de macrófagos en los distintos grupos a los 35 días (grupo Control, n=8;  $\text{CdCl}_2$ , n=7) y 55 días de la instilación (grupo Control, n=8;  $\text{CdCl}_2$ , n=7; LGF, n=7). (\*): Significativamente diferente del grupo control,  $p < 0.05$ .

## **12. CORRELACIONES**

A la vista de los resultados, podemos comprobar que existen evidencias de la relación entre las variables funcionales, bioquímicas y microscópicas (tabla 14). Debemos destacar la correlación existente entre el grado de fibrosis, evaluado mediante rojo sirio y las variables funcionales, bioquímicas y morfométricas. Destaca principalmente la elevada correlación entre el contenido de colágeno, evaluado mediante rojo sirio y la  $L_M$ , así como la correlación, en este caso negativa, entre el rojo sirio y la  $C_L$  (figura 14).

	ESPACIO AÉREO		COLÁGENO		ELASTINA
	L <sub>M</sub>	AIA	Rojo Sirio	HYP	
<b>CI</b>	-0.68 (0.001)	-0.69 (0.001)	-0.78 (0.000)	-0.68 (0.001)	-0.58 (0.008)
<b>C<sub>L</sub></b>	-0.67 (0.001)	-0.70 (0.001)	-0.74 (0.000)	-0.70 (0.001)	-0.64 (0.002)
<b>CVF</b>	-0.63 (0.003)	-0.64 (0.003)	-0.74 (0.000)	-0.70 (0.001)	-0.66 (0.002)
<b>FEF<sub>75%</sub></b>	-0.68 (0.001)	-0.63 (0.003)	-0.72 (0.000)	-0.87 (0.000)	-0.78 (0.000)
<b>L<sub>M</sub></b>		0.83 (0.000)	0.79 (0.000)	0.73 (0.000)	0.49 (0.027)
<b>AIA</b>	0.83 (0.000)		0.91 (0.000)	0.57 (0.008)	0.39 (0.089)
<b>Rojo Sirio</b>	0.79 (0.000)	0.91 (0.000)		0.60 (0.005)	0.43 (0.061)
<b>HYP</b>	0.73 (0.000)	0.57 (0.008)	0.60 (0.005)		0.78 (0.000)
<b>Elastina</b>	0.49 (0.027)	0.39 (0.089)	0.43 (0.061)	0.78 (0.000)	

**Tabla 14:** Correlación entre las variables funcionales, bioquímicas y microscópicas a los 55 días (grupo Control, n=8; CdCl<sub>2</sub>, n=7; LGF, n=7). La significación estadística aparece entre paréntesis.



**Figura 14:** Correlación entre la cantidad de colágeno presente en el pulmón, evaluada mediante rojo sirio y L<sub>M</sub> ( $r=0.79$ ;  $p=0.000$ ) o la C<sub>L</sub> ( $r=-0.74$ ;  $p=0.000$ ) en los grupos control ( $\blacktriangle$ , n=8), CdCl<sub>2</sub> ( $\blacksquare$ , n=7) y LGF ( $\blacklozenge$ , n=7).



# Discusión

---

A lo largo de esta tesis se muestra que el modelo de lesión pulmonar inducido con CdCl<sub>2</sub> tiene dos componentes importantes. Por un lado está el componente fibrótico, caracterizado por la disminución de las variables funcionales y por el incremento en el depósito de proteínas de matriz; por otro, el componente enfisematoso, que se hace evidente en el agrandamiento alveolar observado en el análisis morfométrico. Varios autores han descrito que la fibrosis pulmonar inducida por CdCl<sub>2</sub> se caracteriza por el daño funcional, incluyendo el descenso en la capacidad vital, distensibilidad, y flujo espiratorio forzado; también se incrementa el contenido de proteínas de la matriz pulmonar (80, 26, 25). Algunos autores han relacionado al cadmio con la aparición de enfisema centroacinar (89). Ambas patologías están relacionadas con la EPOC, enfermedad mortal sin un tratamiento eficaz hasta la fecha. Se han propuesto muchos tratamientos para eliminar la fibrosis, sin embargo, la mayoría de ellos han sido administrados de manera concomitante al desarrollo de la lesión y por lo tanto no son útiles en la clínica, ya que la EPOC es una enfermedad de desarrollo lento, que en la mayoría de los casos se diagnostica de manera tardía, cuando la enfermedad ya está establecida (39).

En el modelo propuesto, todos los animales instilados con CdCl<sub>2</sub>, tanto en el estudio realizado a los 35 días de inducirse la lesión, como a los 55 días, presentaron un descenso de las variables funcionales y un incremento de los niveles de proteínas de matriz semejantes en ambos casos. Por lo tanto, podemos considerar la lesión causada con CdCl<sub>2</sub> como una lesión permanente, y los efectos producidos por el LGF como terapéuticos.

En relación al componente fibrótico, se ha comprobado que el tratamiento con LGF, revierte parcialmente la lesión fibrótica inducida. Esta afirmación se ve apoyada por la mejora en la mayoría de las variables funcionales (CI, CVF y FEF<sub>75%</sub>) y el descenso significativo de las proteínas de la matriz pulmonar (hidroxiprolina y elastina) tras el tratamiento con LGF. La elevada correlación existente entre las variables funcionales y las proteínas de matriz, fundamentalmente el colágeno (tabla 14) y la mejoría encontrada en la función pulmonar al disminuir la fibrosis, hacen pensar que el colágeno juega un papel fundamental en el establecimiento y la mejora de la EPOC.

Respecto al componente enfisematoso, si bien el LGF no reduce el agrandamiento alveolar producido por la instilación de CdCl<sub>2</sub> de forma significativa, si que existe una tendencia a la mejoría, que podría abrir una nueva vía de estudio para averiguar el efecto de dicho factor de crecimiento en el enfisema. En un modelo de

hipertensión arterial, la administración de LGF redujo las áreas fenestradas mediante la disminución de la fibrosis e incrementando la vasodilatación (93), sin modificar la cantidad de elastina. Aunque en nuestro caso la cantidad de elastina sí que se ve reducida por acción del LGF, el descenso en el AIA y la  $L_M$  se deberían fundamentalmente a la reducción de la fibrosis en la boca de los alveolos. Esto permitiría que se homogenizase el tamaño de los alveolos al llenarse éstos normalmente, en lugar de resultar colapsados unos y agrandados otros, al impedir el paso de aire a algunos alveolos mediante el depósito de colágeno (90, 29).

Otra de las consecuencias conocidas del enfisema es la pérdida de peso (4, 92). Como mencionamos previamente en los resultados, el incremento de peso de los animales instilados con  $CdCl_2$  se ve claramente disminuido en comparación con los animales control (tabla 8). Este menor incremento se mantiene tras el tratamiento con LGF, lo que parece indicar que el LGF no es útil para recuperar el peso de los individuos, al menos en tratamientos de corta duración, como las 2 semanas durante las que se inyectó el LGF. En otros estudios en los que se ha utilizado LGF, también se ha comprobado que la administración de este factor de crecimiento no afecta al peso de los animales (100, 93). Resultados similares a los obtenidos por nosotros se observan en animales sometidos a la inhalación de humo de tabaco, donde la menor ganancia de peso parece ser responsable de la alteración a nivel funcional (81). Revisando la bibliografía encontramos que son escasos los estudios en los que se ha comprobado la eficacia de agentes antifibróticos sobre la función pulmonar, dos de ellos son el LGF y la NAC (38, 55). En ambos casos mejoran significativamente todos los parámetros funcionales valorados salvo la  $C_L$ , que podría verse afectada en mayor grado por el menor peso de los animales.

Por otro lado, el peso de los pulmones de las ratas instiladas con  $CdCl_2$  es más elevado, debido a la presencia de edema, infiltrado celular y una mayor cantidad de proteínas en la matriz pulmonar (96, 85). El LGF, aunque disminuye el peso del pulmón, no lo hace de manera significativa, ya que continúa habiendo un mayor infiltrado celular, como indica el mayor número de macrófagos observados, y la mayor cantidad de colágeno y elastina.

Los resultados obtenidos guardan gran similitud con los publicados por Heili Frades *et al* (38); en ambos casos se encuentran lesiones pulmonares similares que afectan a la función, al tamaño alveolar y a los niveles de proteínas de la matriz extracelular, compatibles con el enfisema centroacinar y la fibrosis peribronquial. La

NAC mejora la lesión fibrótica, si bien, la diferencia radica en el modo de administración; mientras que este agente de carácter antioxidante se administró de forma concomitante a la inducción de la lesión, el LGF se administró una vez que ésta estaba instaurada y estabilizada.

El caso de la NAC no es el único en la literatura, debido a la prevalencia que tiene esta enfermedad y a la dificultad de encontrar dianas terapéuticas efectivas para combatirla, la búsqueda de tratamientos es continua (83). Se han probado tratamientos que actúan a diferentes niveles. Algunos realizan su acción como antioxidantes, como es el caso del resveratrol, la NAC o la giberelina (84, 38, 44); otros actúan a nivel de síntesis de colágeno, como los análogos de prolina o los oligonucleótidos antisentido de HSP-47 (34, 37); a nivel de inflamación, como los corticoides,  $\gamma$ -interferón, antagonistas o anticuerpos de TNF- $\alpha$  o TGF- $\beta$ , entre otros (83, 48, 56). También existen abundantes estudios realizados con factores de crecimiento como la relaxina o el KGF (102, 109), aunque sin duda el más destacado es el HGF (107). Actualmente han cobrado gran importancia los tratamientos que intentan regenerar el tejido alveolar dañado, así podemos encontrar tratamientos como el ácido retinoico, las células madre o la instilación de células alveolares tipo II (40, 65, 85). La mayoría de estos tratamientos se han probado en modelos animales de fibrosis establecida mediante la administración de bleomicina. Se trata por lo tanto de un modelo de fibrosis que cursa sin la presencia de enfisema, por lo que se desconoce su utilidad en esta otra patología. El mayor problema, sin embargo, es que muchos de estos agentes presentan efectos nocivos, los análogos de prolina por ejemplo podrían actuar en otros tejidos, los anticuerpos frente a TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , pueden tener consecuencias sobre el sistema inmune, los corticoides se ha demostrado que afectan al metabolismo entre otros efectos secundarios conocidos, la relaxina causa sangrado, reacciones cutáneas y anemia y el HGF se ha relacionado con enfermedades cardiovasculares, cáncer y retinopatías asociadas a la diabetes (83, 56, 3). Todo ello nos hace pensar, que si bien parece existir una búsqueda bastante amplia de tratamientos eficaces frente a la EPOC, o al menos frente a la fibrosis asociada, la mayoría de estos tratamientos no parecen del todo adecuados, ya sea porque su administración temprana (antes del desarrollo de la enfermedad) los hace poco útiles en la clínica, o bien por la gran cantidad de patologías asociadas que su administración puede conllevar. No obstante, los resultados obtenidos en todos estos estudios nos ayudan a entender mejor la enfermedad y a buscar nuevas dianas terapéuticas eficaces.

Con el fin de tratar de averiguar el mecanismo de acción del LGF en este modelo de EPOC, nos planteamos la hipótesis de que este factor de crecimiento podría promover un incremento de proteasas que eliminasen el exceso de proteínas de la matriz extracelular, promoviendo a su vez la síntesis de una nueva matriz correctamente organizada, de manera que esa regeneración tisular permitiese una función pulmonar normal.

En estudios realizados con LGF sobre fibrosis hepática, se ha comprobado que éste restaura la arquitectura tisular, reorganizando la matriz extracelular (20, 21), lo que abre una vía a la posible acción de las proteasas destruyendo el exceso de matriz, proteasas diferentes a las colagenasas, que se ha visto que no se incrementan por efecto del LGF (20).

Para comprobar si las proteasas intervenían en este remodelado de la matriz, elegimos dos de ellas, MMP-2 y MMP-12, ya que la MMP-2 se ve aumentada en los casos de fibrosis y enfisema pulmonar y MMP-12 está muy relacionada con el enfisema (47, 28, 11). Además, parece ser que ambas participan en la liberación de TNF- $\alpha$ , citoquina que se ve aumentada por acción del LGF (21).

No se observa un incremento de ninguna de estas proteasas tras la administración de LGF, por lo que el descenso de colágeno y elastina obtenidos no se debe a la acción del LGF sobre estas proteasas, para retirar el exceso de proteínas de matriz acumulado. Otra posibilidad es que sobre estas proteínas estén actuando sus inhibidores. Para descartar que los inhibidores de proteasas pudieran estar actuando, impidiendo la degradación de la matriz y favoreciendo la síntesis de ésta, cuantificamos los niveles de TIMP-1, que actúa indistintamente sobre una amplia variedad de metaloproteasas (47). Tampoco obtuvimos una variación del nivel de TIMP-1 tras la administración de LGF, apoyando la idea previa de que el LGF no parece actuar a nivel de remodelado tisular del pulmón, retirando el exceso de matriz y fomentando la síntesis de nueva matriz vía proteasas y antiproteasas.

Si comprobamos los niveles de colágeno y elastina a nivel bioquímico o de microscopía (tablas 10 y 12), sí que observamos un descenso significativo de ambas proteínas de matriz. Este descenso podría ser debido a la acción de otras proteasas, o puede que el LGF provoque un incremento de MMP-2 y 12 durante el tratamiento, previo a nuestra valoración a las 3 semanas, y que por esta causa no las estemos detectando.

En resultados obtenidos por Díaz Gil y colaboradores se muestra que el LGF hace disminuir drásticamente los valores de proteasas (MMP-2 y MMP-9), manteniéndose

elevados los niveles de TIMP-1. También se observa cómo estas proteasas están más incrementadas durante el inicio del desarrollo de la lesión (fase inflamatoria) y van disminuyendo según avanza ésta (22). El LGF parece ser más eficaz revirtiendo la fibrosis en estadios avanzados, sin embargo, su acción sobre la metaloproteasa 2 es más notable al inicio, cuando sus niveles son más elevados. En nuestro caso sólo observamos un aumento significativo de MMP-2 a los 35 días, manteniéndose después los niveles igualados en todos los grupos, por lo que el LGF no muestra ningún efecto a este nivel. En todo caso, esto nos indica que si bien el LGF actúa a nivel de proteasas para paliar la fibrosis pulmonar, lo hace de manera temprana, inhibiendo la destrucción de la matriz y no ayudando a reorganizarla como pensábamos; y que su mecanismo de acción principal parece ser otro diferente a las proteasas.

Como veíamos en la introducción, una de las mayores fuentes de proteasas son los macrófagos; estas células están ligeramente aumentadas tanto en los animales en los que se ha desarrollado la patología, como en los tratados con LGF. Estudios previos realizados con cadmio apoyan la idea de que los macrófagos predominan en la fase inflamatoria y no en la fibrótica, en la que predominarían los fibroblastos (30, 12). Sin embargo, otros estudios hablan del aumento en el número de macrófagos pulmonares en los casos de EPOC (63, 8, 96). Si consideramos el modelo de cloruro de cadmio como un modelo de EPOC en el que se combinan fibrosis y enfisema, podemos explicar este aumento.

Tras la administración de LGF el número de macrófagos se mantiene elevado, podemos afirmar por tanto que el LGF no elimina la inflamación característica de la EPOC, del mismo modo, apoyamos aún más la idea de que el LGF parece actuar por una vía independiente a las proteasas en el remodelado tisular.

Una de las vías por las que el LGF parece actuar, al menos en el hígado, es incrementando los niveles de TNF- $\alpha$  (21), lo que provoca mitosis y regeneración hepática. Muchos autores han descrito al TNF- $\alpha$  como una citoquina con un papel dual en la respuesta fibrótica, ayudando a incrementar o a reducir los niveles de colágeno (52, 43). Dado que el TNF- $\alpha$  es una citoquina producida por macrófagos y que una de sus posibles acciones antifibróticas puede ser incrementando la actividad proteasa, nos preguntamos si éste podía ser el mecanismo de acción del LGF (43). Los resultados obtenidos muestran un incremento en los niveles de TNF- $\alpha$  en los animales a los que se les administró cadmio y/o LGF, no obstante, los niveles detectados son demasiado bajos respecto al límite de sensibilidad del kit utilizado para su valoración (10 pg/ml), lo que

hace que los resultados no sean lo suficientemente fiables. Fujita demostró que la sobreexpresión o la administración exógena de TNF- $\alpha$  limitan la fibrosis pulmonar provocada mediante administración de bleomicina o TGF- $\beta$  (31). Otros autores como Piguet han observado niveles elevados de esta citoquina en modelos de fibrosis por bleomicina o sílice (72, 73), sin embargo Driscoll y colaboradores no la encontraron aumentada en un modelo realizado con cloruro de cadmio (26). Al encontrar niveles tan reducidos de TNF- $\alpha$ , nos aventuramos a decir que el LGF no actúa incrementando la producción de esta citoquina por los macrófagos, no incrementándose la producción de metaloproteasas, ni reduciéndose la fibrosis pulmonar por esta vía.

En cuanto a la síntesis de una nueva matriz correctamente organizada, estudiamos el papel de los miofibroblastos. En los resultados obtenidos sobre los niveles de expresión de alfa-actina, podemos comprobar que no existe un aumento significativo de esta proteína, lo que resulta razonable ya que nos encontramos en la fase fibrótica y la lesión ya ha sido instaurada. De hecho, tampoco se ven afectados los niveles de mRNA de colágeno o elastina, indicándonos nuevamente que no se está produciendo síntesis masiva de proteínas de matriz por miofibroblastos, u otro tipo celular, en esta etapa. No parece por tanto que esté habiendo remodelado, ni que los miofibroblastos estén interviniendo en él, ya que no se incrementan la transcripción de proteínas de matriz, ni los niveles de alfa-actina.

Una vez comprobado que el LGF actúa paliando la fibrosis pulmonar y descartado su posible efecto sobre las metaloproteasas MMP-2 y MMP-12 para restaurar la arquitectura pulmonar normal, nos preguntamos cuál es el mecanismo de acción de este factor de crecimiento. De acuerdo a publicaciones previas, la inflamación celular no es un factor clave tras los primeros días de la instilación del CdCl<sub>2</sub> (30). Como el LGF fue administrado una vez establecida la lesión, es poco probable que la actividad del LGF sea debida a un efecto antiinflamatorio, de hecho, no hemos observado una variación en el número de macrófagos tras la administración de LGF, aunque sí se ha comprobado que la administración exógena de bilirrubina hace disminuir el número de linfocitos y neutrófilos en un modelo de fibrosis pulmonar desarrollado con bleomicina (103).

Otra posible vía de actuación es a nivel antioxidante. El LGF tiene una considerable actividad como secuestrador de radicales libres, mayor incluso que la de la bilirrubina o la albúmina por separado. Estos radicales libres son producidos por macrófagos y neutrófilos en casos de EPOC y fibrosis pulmonar idiopática (5, 98, 106).

Se ha observado clínicamente como la hiperbilirrubinemia puede mejorar la función pulmonar, depositándose pigmentos biliares en el tejido pulmonar, fundamentalmente en los macrófagos (64), células que como ya hemos mencionado previamente liberan radicales libres. Esta vía de acción del LGF resulta bastante factible, ya que se ha comprobado que los fumadores tienen niveles bajos de bilirrubina (103).

Recientemente se ha demostrado que la capacidad antifibrótica del LGF está mediada por la inhibición parcial del TGF- $\beta$  y de la transformación de los miofibroblastos (22, 23), ambos eventos clave en el proceso de depósito de la matriz extracelular. El LGF aumenta el TNF- $\alpha$ , citoquina que promueve la localización nuclear de los factores de transcripción C/EPBP $\beta$  y C/EPBP $\delta$ , los cuales se unen a la misma región del promotor de colágeno I a la que se une el TGF- $\beta$ , impidiendo de este modo el incremento de colágeno (43). A su vez, se ha comprobado que el TNF- $\alpha$  actúa sobre el TGF- $\alpha$ , mitógeno hepático que restaura la arquitectura normal del hígado (32).

Sin embargo, también es posible que el LGF reclute células madre e induzca la proliferación de células endoteliales y alveolares, regenerando el tejido, como ya se ha visto que hacen otros factores de crecimiento (109, 1, 45, 35). Se ha comprobado en diversas ocasiones cómo el número de células madre con capacidad regeneradora se ve incrementado tras el daño pulmonar, siendo el incremento mayor cuanto mayor es la lesión, y localizándose fundamentalmente en las áreas fibróticas (65, 1, 85). Estas células se diferencian en células del epitelio alveolar y fibroblastos para tratar de recuperar la arquitectura normal. Este mayor reclutamiento de células madre está relacionado con el aumento de osteopontina y ácido hialurónico, a los que se unen los receptores CD44 de las células madre, favoreciendo su incremento; aunque también la ruptura de la lámina media y la mayor liberación de citoquinas y mitógenos tras el daño pueden atraer a las células a estas zonas.

También se ha comprobado que las células madre hacen disminuir la cantidad de hidroxiprolina, la inflamación, las metaloproteasas y los septos interalveolares. (65, 85). Parece que el trasplante de células alveolares de tipo II, que en condiciones normales actúan como células residentes en el pulmón, es más eficaz en el tratamiento contra el daño que el trasplante con células madre mesenquimales. Esto se debe a que actúan a distintos tiempos desde la fase inflamatoria a la fibrótica, mientras que las células mesenquimales sólo lo hacen en la fase inflamatoria.



Se han propuesto diversas vías de acción para estas células frente al daño pulmonar:

- Se recupera el pool de células madre, promoviendo la regeneración y evitando las discontinuidades en el epitelio.
- Se incrementa el surfactante y de este modo mejora la función.
- Se liberan citoquinas que generan un ambiente antifibrótico.
- Se estimula la degradación del nuevo colágeno.
- Acción como *scavengers*, eliminando los productos de degradación de la matriz extracelular y disminuyendo la migración de los fibroblastos.

Por tanto, un posible mecanismo de acción del LGF es incrementando el pool de células alveolares tipo II, actuando de este modo cuando la lesión está establecida (fase fibrótica) y facilitando por tanto la regeneración del tejido a la par que mejorando la función pulmonar. De hecho, se ha comprobado que la administración de LGF estimula la regeneración testicular gracias al estímulo de las células madre (69). También se ha visto cómo este mismo factor de crecimiento favorece la regeneración en un modelo de Parkinson al estimular la angiogénesis, e incrementar la viabilidad y la diferenciación de las células madre neuronales (78).

Otro factor que se ha visto que interviene en la regeneración pulmonar es el ácido retinoico, el cual interviene en la alveologénesis, donde a partir de los sacos aéreos primitivos con una doble estructura capilar, surgen septos alveolares y finalmente alveolos maduros con una estructura capilar simple (53). El ácido retinoico ha sido utilizado en modelos de enfisema pulmonar debidos a la administración de dexametasona. Se ha comprobado que el ácido retinoico induce la formación de nuevos alveolos, activando o inhibiendo la transcripción de genes implicados en este proceso y estimulando fibroblastos (40, 50), reduciendo así la  $L_M$ . Sin embargo, el tratamiento no parece ser eficaz a nivel funcional, al no lograr restablecer los valores normales de volumen pulmonar y  $C_L$  (97).

En conjunto, estas observaciones indican la necesidad de llevar a cabo nuevos estudios para determinar el mecanismo de acción del LGF en la reparación de la fibrosis en el pulmón.

# Conclusiones

---

A la vista de los resultados obtenidos podemos extraer las siguientes conclusiones:

- La instilación orotraqueal de CdCl<sub>2</sub> permite desarrollar un modelo animal de EPOC con fibrosis y enfisema de manera conjunta y permanente, que permite realizar el ensayo terapéutico con LGF.
- El LGF reduce la fibrosis pulmonar previamente establecida, disminuyendo la cantidad de proteínas de matriz en este tejido, lo que provoca una mejoría en la función pulmonar.
- El LGF muestra cierto efecto sobre el enfisema pulmonar, al disminuir el área interna alveolar y la distancia media entre las paredes alveolares.
- El LGF mejora la arquitectura pulmonar independientemente de la acción de proteasas (MMP-2 y MMP-12) y miofibroblastos.
- El LGF es capaz de actuar cuando la lesión es estable, por lo que podría ser de utilidad en el tratamiento de la EPOC.

# Bibliografía

---

1. Abe S, Boyer C, Liu X, Wen FQ, Kobayashi T, Fang Q, Wang X, Hashimoto M, Sharp JG, Rennard SI. Cells derived from the circulation contribute to the repair of lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Dec 1; 170(11):1158-63.
2. Antón Díaz E, Ruiz López D, Ancochea Bermúdez J. Herencia y ambiente en la EPOC. *Arch Bronconeumol*. 2007; Supl 1:10-7.
3. Bell LN, Ward JL, Degawa-Yamauchi M, Bovenkerk JE, Jones R, Cacucci BM, Gupta CE, Sheridan C, Sheridan K, Shankar SS, Steinberg HO, March KL, Considine RV. Adipose tissue production of hepatocyte growth factor contributes to elevated serum HGF in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 Oct; 291(4):E843-8.
4. Calle Rubio M, Rodríguez Hermosa JL, Ortega González A, Álvarez-Sala Walther JL. Fenotipos de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Med Clin Monogr (Barc)*. 2007; 8(7):17-22.
5. Condezo-Hoyos L, Abderrahim F, Conde MV, Susín C, Díaz-Gil JJ, González MC, Arribas SM. Antioxidant activity of liver growth factor, a bilirubin covalently bound to albumin. *Free Radic Biol Med*. 2009 Mar 1; 46(5):656-62.
6. Corbel M, Belleguic C, Boichot E, Lagente V. Involvement of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the development of airway inflammation and pulmonary fibrosis. *Cell Biol Toxicol*. 2002; 18(1):51-61. Review.
7. Cosio M, Ghezzi H, Hogg JC, Corbin R, Loveland M, Dosman J, Macklem PT. The relations between structural changes in small airways and pulmonary-function tests. *N Engl J Med*. 1978 Jun 8; 298(23):1277-81.
8. Cottin V, Nunes H, Brillet PY, Delaval P, Devouassoux G, Tillie-Leblond I, Israel-Biet D, Court-Fortune I, Valeyre D, Cordier JF; Groupe d'Etude et de Recherche sur les Maladies Orphelines Pulmonaires (GERM O P). Combined

- pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity. *Eur Respir J*. 2005 Oct; 26(4):586-93.
9. Chomeczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr; 162(1):156-9.
  10. Churg A, Dai J, Tai H, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor-alpha is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Sep 15; 166(6):849-54.
  11. Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Dai J, Shapiro SD, Wright JL. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor-alpha release. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Apr 15; 167(8):1083-9.
  12. Damiano VV, Cherian PV, Frankel FR, Steeger JR, Sohn M, Oppenheim D, Weinbaum G. Intraluminal fibrosis induced unilaterally by lobar instillation of CdCl<sub>2</sub> into the rat lung. *Am J Pathol*. 1990 Oct; 137(4):883-94.
  13. Daniil Z, Koutsokera A, Gourgoulianis K. Combined pulmonary fibrosis and emphysema in patients exposed to agrochemical compounds. *Eur Respir J*. 2006 Feb; 27(2):434.
  14. Davison AG, Fayers PM, Taylor AJ, Venables KM, Darbyshire J, Pickering CA, Chettle DR, Franklin D, Guthrie CJ, Scott MC, et al. Cadmium fume inhalation and emphysema. *Lancet*. 1988 Mar 26; 1(8587):663-7.
  15. Díaz-Gil JJ, Escartín P, García-Cañero R, Trilla C, Veloso JJ, Sánchez G, Moreno-Caparrós A, Enrique de Salamanca C, Lozano R, Gavilanes JG, et al. Purification of a liver DNA-synthesis promoter from plasma of partially hepatectomized rats. *Biochem J*. 1986 Apr 1; 235(1):49-55.

16. Díaz-Gil JJ, Gavilanes JG, Sánchez G, García-Cañero R, García-Segura JM, Santamaría L, Trilla C, Escartín P. Identification of a liver growth factor as an albumin-bilirubin complex. *Biochem J.* 1987 Apr 15; 243(2):443-8.
17. Díaz-Gil JJ, Sánchez G, Trilla C, Escartín P. Identification of biliprotein as a liver growth factor. *Hepatology.* 1988 May-Jun; 8(3):484-6.
18. Díaz-Gil JJ, Gavilanes JG, García-Cañero R, García-Segura JM, Santamaría L, Trilla C, Martín AM, Guerra MA, García-Escandón F, Iñiguez JA, et al. Liver growth factor purified from human plasma is an albumin-bilirubin complex. *Mol Biol Med.* 1989 Jun; 6(3):197-207.
19. Díaz Gil JJ, Rúa C, Machin C, Cereceda RM, García-Cañero R, de Foronda M, Pérez de Diego J, Trilla C, Escartin P. Hepatic growth induced by injection of the liver growth factor into normal rats. *Growth Regul.* 1994 Sep; 4(3):113-22.
20. Díaz-Gil JJ, Muñoz J, Albillos A, Rúa C, Machín C, García-Cañero R, Cereceda RM, Guijarro MC, Trilla C, Escartín P. Improvement in liver fibrosis, functionality and hemodynamics in CCl4-cirrhotic rats after injection of the Liver Growth Factor. *J Hepatol.* 1999 Jun; 30(6):1065-72.
21. Díaz-Gil JJ, Majano PL, López-Cabrera M, Sánchez-López V, Rúa C, Machín C, Trilla C, García-Cañero R, Moreno-Otero R. The mitogenic activity of the liver growth factor is mediated by tumor necrosis factor alpha in rat liver. *J Hepatol.* 2003 May; 38(5):598-604.
22. Díaz-Gil JJ, García-Monzón C, Rúa C, Martín-Sanz P, Cereceda RM, Miquilena-Colina ME, Machín C, Fernández-Martínez A, García-Cañero R. The anti-fibrotic effect of liver growth factor is associated with decreased intrahepatic levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 and transforming growth factor beta 1 in bile duct-ligated rats. *Histol Histopathol.* 2008 May; 23(5):583-91.
23. Díaz-Gil JJ, García-Monzón C, Rúa C, Martín-Sanz P, Cereceda RM, Miquilena-Colina ME, Machín C, Fernández-Martínez A, García-Cañero R. Liver growth

- factor antifibrotic activity in vivo is associated with a decrease in activation of hepatic stellate cells. *Histol Histopathol.* 2009 Apr; 24(4):473-9.
24. Docherty NG, Morales AI, López Novoa JM, Pérez Barriocanal F. The transition of epithelial cells to fibromyoblasts. Mechanisms involved and its possible relationship with renal fibrosis. *Nefrologia.* 2007; 27(6):681-8. Review.
  25. Dolhnikoff M, Mauad T, Ludwig MS. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Nov; 160(5 Pt 1):1750-7.
  26. Driscoll KE, Maurer JK, Poynter J, Higgins J, Asquith T, Miller NS. Stimulation of rat alveolar macrophage fibronectin release in a cadmium chloride model of lung injury and fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992 Sep; 116(1):30-7.
  27. Dunsmore SE, Rannels DE. Extracellular matrix biology in the lung. *Am J Physiol.* 1996 Jan; 270(1 Pt 1):L3-27. Review.
  28. Elkington PT, Friedland JS. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax.* 2006 Mar; 61(3):259-66. Epub 2005 Oct 14. Review.
  29. Escolar JD, Escolar A. Lung hysteresis: a morphological view. *Histol Histopathol.* 2004 Jan; 19(1):159-66. Review.
  30. Frankel FR, Steeger JR, Damiano VV, Sohn M, Oppenheim D, Weinbaum G. Induction of unilateral pulmonary fibrosis in the rat by cadmium chloride. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991 Oct; 5(4):385-94.
  31. Fujita M, Shannon JM, Morikawa O, Gauldie J, Hara N, Mason RJ. Overexpression of tumor necrosis factor-alpha diminishes pulmonary fibrosis induced by bleomycin or transforming growth factor-beta. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Dec; 29(6):669-76.



32. Gallucci RM, Simeonova PP, Toriumi W, Luster MI. TNF-alpha regulates transforming growth factor-alpha expression in regenerating murine liver and isolated hepatocytes. *J Immunol*. 2000 Jan 15; 164(2):872-8.
33. Genovese T, Di Paola R, Mazzon E, Muià C, Caputi AP, Cuzzocrea S. Melatonin limits lung injury in bleomycin treated mice. *J Pineal Res*. 2005 Sep; 39(2):105-12.
34. Goldstein RH, Fine A. Potential therapeutic initiatives for fibrogenic lung diseases. *Chest*. 1995 Sep; 108(3):848-55. Review.
35. Gomperts BN, Belperio JA, Fishbein MC, Keane MP, Burdick MD, Strieter RM. Keratinocyte growth factor improves repair in the injured tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Jul; 37(1):48-56.
36. Gonzalo-Gobernado R, Reimers D, Herranz AS, Díaz-Gil JJ, Osuna C, Asensio MJ, Baena S, Rodríguez-Serrano M, Bazán E. Mobilization of neural stem cells and generation of new neurons in 6-OHDA-lesioned rats by intracerebroventricular infusion of liver growth factor. *J Histochem Cytochem*. 2009 May; 57(5):491-502.
37. Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, Noguchi T. Antisense oligonucleotide inhibition of heat shock protein (HSP) 47 improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respir Res*. 2007 May 15; 8:37.
38. Heili Frades S, Del Puerto-Nevado L, Pérez-Rial S, Martín-Mosquero C, Ortega, Martínez-Galán L, Rubio ML, Rodríguez Nieto MJ, González-Mangado N, Peces-Barba Romero G. Improving the cadmium-induced centriacinar emphysema model in rats by concomitant anti-oxidant treatment. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008 Nov; 35(11):1337-42.
39. Heili Frades S, Rodríguez Nieto MJ, Peces-Barba G. Evolución del estado de inflamación y reparación. *Med Clin Monogr (Barc)*. 2007; 8(7):23-8.

40. Hind M, Maden M. Retinoic acid induces alveolar regeneration in the adult mouse lung. *Eur Respir J*. 2004 Jan; 23(1):20-7.
41. Hirst RN Jr, Perry HM Jr, Cruz MG, Pierce JA. Elevated cadmium concentration in emphysematous lungs. *Am Rev Respir Dis*. 1973 Jul; 108(1):30-9.
42. Hoppin FG, Stathert JC, Greaves IA, Lai YL, Hildebrandt J. Lung recoil: elastic and rheological properties. *Handbook of Physiology* sec. 3, The respiratory system, vol III: Mechanism of breathing. 1986. Ed. J Mead y PT Macklem. Bethesda MD, American Physiological Society: 195-215.
43. Iraburu MJ, Domínguez-Rosales JA, Fontana L, Auster A, García-Trevijano ER, Covarrubias-Pinedo A, Rivas-Estilla AM, Greenwel P, Rojkind M. Tumor necrosis factor alpha down-regulates expression of the alpha1(I) collagen gene in rat hepatic stellate cells through a p20C/EBPbeta- and C/EBPdelta-dependent mechanism. *Hepatology*. 2000 May;31(5):1086-93.
44. Iraz M, Erdogan H, Kotuk M, Yağmurca M, Kilic T, Ermis H, Fadillioğlu E, Yildirim Z. Ginkgo biloba inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Pharmacol Res*. 2006 Mar; 53(3):310-6.
45. Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Suzuki T, Mizuno S, Nakamura T, Sasaki H. Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lungs through mobilizing endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Nov 5; 324(1):276-80.
46. Izquierdo JL, Almonacid C, Parra T, Pérez J. Systemic and lung inflammation in 2 phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Bronconeumol*. 2006 Jul; 42(7):332-7.
47. Lagente V, Manoury B, Nénan S, Le Quément C, Martin-Chouly C, Boichot E. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Oct; 38(10):1521-30. Review.

48. Lasky JA, Ortiz LA. Antifibrotic therapy for the treatment of pulmonary fibrosis. *Am J Med Sci*. 2001 Oct; 322(4):213-21. Review.
49. Lewis GP, Jusko WJ, Coughlin LL. Cadmium accumulation in man: influence of smoking, occupation, alcoholic habit and disease. *J Chronic Dis*. 1972 Dec; 25(12):717-26.
50. Liebeskind A, Srinivasan S, Kaetzel D, Bruce M. Retinoic acid stimulates immature lung fibroblast growth via a PDGF-mediated autocrine mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Jul; 279(1):L81-90.
51. Lin CJ, Yang PC, Hsu MT, Yew FH, Liu TY, Shun CT, Tyan SW, Lee TC. Induction of pulmonary fibrosis in organ-cultured rat lung by cadmium chloride and transforming growth factor-beta1. *Toxicology*. 1998 May 15; 127(1-3):157-66.
52. Lundblad LK, Thompson-Figueroa J, Leclair T, Sullivan MJ, Poynter ME, Irvin CG, Bates JH. Tumor necrosis factor-alpha overexpression in lung disease: a single cause behind a complex phenotype. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jun 15; 171(12):1363-70.
53. Maden M, Hind M. Retinoic acid in alveolar development, maintenance and regeneration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004 May 29; 359(1445):799-808. Review.
54. Madtes DK, Elston AL, Kaback LA, Clark JG. Selective induction of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 May; 24(5):599-607.
55. Martínez-Galán L, del Puerto-Nevado L, Pérez-Rial S, Díaz-Gil JJ, González-Mangado N, Peces-Barba G. Liver growth factor improves pulmonary fibrosis secondary to cadmium administration in rats. *Arch Bronconeumol*. 2010 Jan; 46(1):20-6.

56. McAnulty RJ, Laurent GJ. Pathogenesis of lung fibrosis and potential new therapeutic strategies. *Exp Nephrol.* 1995 Mar-Apr; 3(2):96-107. Review.
57. Mercer RR, Crapo JD. Spatial distribution of collagen and elastin fibers in the lungs. *J Appl Physiol.* 1990 Aug; 69(2):756-65.
58. Molina-Molina M, Pereda J, Xaubet A. [Experimental models for the study of pulmonary fibrosis: current usefulness and future promise]. *Arch Bronconeumol.* 2007 Sep; 43(9):501-7. Review.
59. Moreira i Prat J. Historia natural. *Med Clin Monograf (Barc).* 2007; 8(7):3-11.
60. Murphy G, Docherty AJ. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992 Aug; 7(2):120-5. Review.
61. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999 Jul 30; 274(31):21491-4. Review.
62. Navajas D, Roca J. Mecánica de la respiración. *Fisiología Humana, sec: Fisiología del aparato respiratorio, capítulo 52.* 1992. Ed. JAF Tresguerres. McGraw-Hill-Interamericana de España: 659-78.
63. Nuñez-Naveira L, Montero-Martínez C, Ramos-Barbón D. Oxidación, inflamación y modificaciones estructurales. *Arch Bronconeumol.* 2007; 43 Supl 1:18-29.
64. Ohrui T, Higuchi M, Kanda A, Matsui T, Sato E, Sasaki H. A patient with exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis which was resolved probably due to the coexisting hyperbilirubinemia? *Tohoku J Exp Med.* 2001 Mar; 193(3):245-9.
65. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 8; 100(14):8407-11.

- 
66. Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc.* 2006 Jun; 3(4):383-8. Review.
  67. Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res.* 2001; 2(1):10-9. Epub 2000 Dec 29. Review.
  68. Peces-Barba G, Heili S. Modelos animales de EPOC. *ARCH Bronconeumol.* 2007; 43 Supl 1:30-7.
  69. Pérez-Crespo M, Pericuesta E, Pérez-Cerezales S, Arenas MI, Lobo MV, Díaz-Gil JJ, Gutierrez-Adan A. Effect of liver growth factor on both testicular regeneration and recovery of spermatogenesis in busulfan-treated mice. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011 Feb 4; 9:21.
  70. Pérez-Ramos J, de Lourdes Segura-Valdez M, Vanda B, Selman M, Pardo A. Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Oct; 160(4):1274-82.
  71. Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc.* 2008 Apr 15; 5(3):334-7.
  72. Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Kapanci Y, Vassalli P. Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *Exp Med.* 1989 Sep 1; 170(3):655-63.
  73. Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Sappino AP, Vassalli P. Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature.* 1990 Mar 15; 344(6263):245-7.

74. del Puerto-Nevado L, Pérez-Rial S, Girón-Martínez A, Peces-Barba G. Role of inflammation in the etiopathogenesis of COPD. *Arch Bronconeumol*. 2010 Dec; 46 Suppl 11:2-7. Review.
75. Ramos C, Montaña M, García-Alvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, Pardo A. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 May; 24(5):591-8.
76. Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem*. 1996 Jun; 29(3):225-9.
77. Reimers D, Herranz AS, Díaz-Gil JJ, Lobo MV, Paíno CL, Alonso R, Asensio MJ, Gonzalo-Gobernado R, Bazán E. Intrastratial infusion of liver growth factor stimulates dopamine terminal sprouting and partially restores motor function in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Histochem Cytochem*. 2006 Apr; 54(4):457-65.
78. Reimers D, Osuna C, Gonzalo-Gobernado R, Herranz AS, Díaz-Gil JJ, Jiménez-Escrig A, Asensio MJ, Miranda C, Rodríguez-Serrano M, Bazán E. Liver Growth Factor Promotes the Survival of Grafted Neural Stem Cells in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010 Dec 29.
79. Roman J. Extracellular matrix in the pathogenesis of lung injury and repair. In: Schwarz M, King T, eds. *Interstitial Lung Disease*. London, U.K.: B.C. Decker. 1998; 207-27.
80. Rubio ML, Sánchez-Cifuentes MV, Peces-Barba G, Verbanck S, Paiva M, González Mangado N. Intrapulmonary gas mixing in panacinar- and centriacinar-induced emphysema in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Jan; 157(1):237-45.
81. Rubio ML, Sanchez-Cifuentes MV, Ortega M, Peces-Barba G, Escolar JD, Verbanck S, Paiva M, González Mangado N. N-acetylcysteine prevents cigarette smoke induced small airways alterations in rats. *Eur Respir J*. 2000 Mar; 15(3):505-11.

82. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramírez R, Barrios R, Pardo A. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Sep; 279(3):L562-74.
83. Selman M, Navarro C, Gaxiola M. Idiopathic pulmonary fibrosis: in search of an effective treatment. *Arch Bronconeumol*. 2005 Dec; 41 Suppl 5:15-20. Review.
84. Sener G, Topaloğlu N, Sehirli AO, Ercan F, Gedik N. Resveratrol alleviates bleomycin-induced lung injury in rats. *Pulm Pharmacol Ther*. 2007; 20(6):642-9.
85. Serrano-Mollar A, Nacher M, Gay-Jordi G, Closa D, Xaubet A, Bulbena O. Intratracheal transplantation of alveolar type II cells reverses bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Dec 15; 176(12):1261-8.
86. Shapiro SD. End-stage chronic obstructive pulmonary disease: the cigarette is burned out but inflammation rages on. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Aug 1; 164(3):339-40.
87. Singh SR, Hall IP. Airway myofibroblasts and their relationship with airway myocytes and fibroblasts. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Jan 1; 5(1):127-32. Review.
88. Snider GL, Hayes JA, Korthy AL, Lewis GP. Centrilobular emphysema experimentally induced by cadmium chloride aerosol. *Am Rev Respir Dis*. 1973 Jul; 108(1):40-8.
89. Snider GL. Distinguishing among asthma, chronic bronchitis, and emphysema. *Chest*. 1985 Jan; 87(1 Suppl):35S-39S.
90. Snider GL, Lucey EC, Faris B, Jung-Legg Y, Stone PJ, Franzblau C. Cadmium-chloride-induced air-space enlargement with interstitial pulmonary fibrosis is not associated with destruction of lung elastin. Implications for the pathogenesis of human emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 1988 Apr; 137(4):918-23.

91. Snider GL. Emphysema: the first two centuries--and beyond. A historical overview, with suggestions for future research: Part 2. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Dec; 146(6):1615-22. Review.
92. Soler Cataluña JJ, Martínez García MA. Prognostic factors in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Bronconeumol*. 2007 Dec; 43(12):680-91. Review.
93. Somoza B, Abderrahim F, González JM, Conde MV, Arribas SM, Starcher B, Regadera J, Fernández-Alfonso MS, Díaz-Gil JJ, González MC. Short-term treatment of spontaneously hypertensive rats with liver growth factor reduces carotid artery fibrosis, improves vascular function, and lowers blood pressure. *Cardiovasc Res*. 2006 Feb 15; 69(3):764-71.
94. Soriano JB, Miravittles M. Datos epidemiológicos de EPOC en España. *Arch Bronconeumol*. 2007; 43 Supl 1:2-9.
95. Soriano JB, Miravittles M, Borderías L, Duran-Tauleria E, García Río F, Martínez J, Montemayor T, Muñoz L, Piñeiro L, Sánchez G, Serra J, Soler-Cataluña JJ, Torres A, Luis Viejo J, Sobradillo-Peña V, Ancochea J. Geographical variations in the prevalence of COPD in Spain: relationship to smoking, death rates and other determining factors. *Arch Bronconeumol*. 2010 Oct; 46(10):522-30.
96. Spurzem JR, Rennard SI. Pathogenesis of COPD. *Semin Respir Crit Care Med*. 2005 Apr; 26(2):142-53. Review.
97. Srinivasan G, Bruce EN, Houtz PK, Bruce MC. Dexamethasone-induced changes in lung function are not prevented by concomitant treatment with retinoic acid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Aug; 283(2):L275-87.
98. Stocker R, Glazer AN, Ames BN. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Aug; 84(16):5918-22.



- 
99. Strieter RM. Mechanisms of pulmonary fibrosis: conference summary. *Chest*. 2001 Jul; 120(1 Suppl):77S-85S. Review.
  100. Surra JC, Guillén N, Barranquero C, Arbonés-Mainar JM, Navarro MA, Gascón S, RNAal C, Godino J, Guzmán MA, Díaz-Gil JJ, Osada J. Sex-dependent effect of liver growth factor on atherosclerotic lesions and fatty liver disease in apolipoprotein E knockout mice. *Histol Histopathol*. 2010 May; 25(5):609-18.
  101. Turino GM. The lung parenchyma--a dynamic matrix. J. Burns Amberson lecture. *Am Rev Respir Dis*. 1985 Dec; 132(6):1324-34. Review.
  102. Unemori EN, Pickford LB, Salles AL, Piercy CE, Grove BH, Erikson ME, Amento EP. Relaxin induces an extracellular matrix-degrading phenotype in human lung fibroblasts in vitro and inhibits lung fibrosis in a murine model in vivo. *J Clin Invest*. 1996 Dec 15; 98(12):2739-45.
  103. Wang HD, Yamaya M, Okinaga S, Jia YX, Kamanaka M, Takahashi H, Guo LY, Ohrui T, Sasaki H. Bilirubin ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Feb 1; 165(3):406-11.
  104. Ward PA, Hunninghake GW. Lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Apr; 157(4 Pt 2):S123-9. Review.
  105. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*. 1991 May; 5(8):2145-54. Review.
  106. Wu TW, Carey D, Wu J, Sugiyama H. The cytoprotective effects of bilirubin and biliverdin on rat hepatocytes and human erythrocytes and the impact of albumin. *Biochem Cell Biol*. 1991 Dec; 69(12):828-34.
  107. Yaekashiwa M, Nakayama S, Ohnuma K, Sakai T, Abe T, Satoh K, Matsumoto K, Nakamura T, Takahashi T, Nukiwa T. Simultaneous or delayed administration of hepatocyte growth factor equally represses the fibrotic changes in murine lung

injury induced by bleomycin. A morphologic study. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Dec; 156(6):1937-44.

108. Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Jan;13(1):96-107.

109. Yi ES, Williams ST, Lee H, Malicki DM, Chin EM, Yin S, Tarpley J, Ulich TR. Keratinocyte growth factor ameliorates radiation- and bleomycin-induced lung injury and mortality. *Am J Pathol.* 1996 Dec; 149(6):1963-70.

# Artículos

---



## Original Article

## Liver Growth Factor Improves Pulmonary Fibrosis Secondary to Cadmium Administration in Rats

Lourdes Martínez-Galán,<sup>a</sup> Laura del Puerto-Nevado,<sup>a,\*</sup> Sandra Pérez-Rial,<sup>a</sup> Juan José Díaz-Gil,<sup>b</sup> Nicolás González-Mangado,<sup>a</sup> and Germán Peces-Barba<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Neumología Experimental, Fundación Jiménez Díaz-CAPIO, CIBERES, Madrid, Spain

<sup>b</sup>Servicio de Bioquímica Experimental, Hospital Puerta de Hierro, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received June 2, 2009

Accepted October 13, 2009

## Keywords:

Liver growth factor

Fibrosis

Lung function

Lung morphometry

Collagen

## ABSTRACT

**Introduction:** Liver growth factor (LGF) is a liver mitogen with regenerating and anti-fibrotic activity even at extrahepatic sites. We used LGF in a lung fibrosis model induced by cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>), to study its antifibrotic capacity.

**Methods:** Forty-two male Wistar rats were administered a single dose of 0.5ml/rat of CdCl<sub>2</sub> 0.025% (n = 21) or the same volume of saline (control group, n = 21). After 35 days, once a lesion was established, we started a 3 week treatment with LGF, after which we determined lung function —inspiratory capacity (IC), lung compliance (LC), forced vital capacity (FVC) and expiratory flow at 75% (FEF75%)—, lung morphometry —alveolar internal area (AIA), mean linear intersection (LM)—, and collagen (both by Sirius red and hydroxyproline residues) and elastin contents.

**Results:** Pulmonary fibrosis in CdCl<sub>2</sub> rats was characterized by a marked decrease in pulmonary function with respect to healthy controls —reductions of 28% in IC, 38% in CL, 31% in FVC, and 54% in FEF75%— which was partially recovered after LGF injection —18% IC, 27% CL, 19% FVC and 35% FEF75%—; increase in collagen and elastin contents —165% and 76%, respectively, in CdCl<sub>2</sub> rats, versus 110% and 34% after LGF injection—; and increases in AIA and LM, partially inverted by LGF.

**Conclusions:** Together, these data seem to demonstrate that LGF is able to improve lung function and partially inverts the increase in lung matrix proteins produced by CdCl<sub>2</sub> instillation.

© 2009 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

### El factor de crecimiento de hígado mejora la fibrosis pulmonar inducida tras la administración de cadmio en ratas

## RESUMEN

**Introducción:** El *liver growth factor* (LGF, 'factor de crecimiento de hígado') es un mitógeno con actividad regeneradora y antifibrótica con actividad incluso en localizaciones extrahepáticas. En este trabajo se administró LGF en un modelo de fibrosis pulmonar inducido con cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>) para estudiar su capacidad antifibrótica.

**Métodos:** Se instilaron 42 ratas Wistar macho con 0,5 ml/rata de CdCl<sub>2</sub> al 0,025% (n = 21) o de salino (n = 21). Transcurridos 35 días y una vez establecida la lesión se realizó el tratamiento con LGF y posteriormente el análisis de los parámetros funcionales —capacidad inspiratoria (CI), complianza pulmonar (CL), capacidad vital forzada (CVF) y flujo espiratorio forzado al 75% (FEF75%)—, morfometría —área interna alveolar y distancia media entre paredes alveolares— y contenido en colágeno y elastina.

**Resultados:** La fibrosis pulmonar originada mediante CdCl<sub>2</sub> se caracterizó por un marcado descenso de la función pulmonar en comparación con los controles. Se redujo un 28% la CI, un 38% la CL, un 31% la CVF y un 54% la FEF75%, descenso que se revirtió parcialmente tras la inyección de LGF —el 18% en CI, el 27% en CL, el 19% en CVF y el 35% en FEF75%—. Además, se observó un incremento en la cantidad de colágeno y elastina del 165 y el 76%, respectivamente, en las ratas del grupo CdCl<sub>2</sub> frente a un 110 y un 34% tras la inyección de LGF.

**Conclusiones:** Estos datos demuestran que el LGF mejora la función pulmonar y revierte parcialmente el incremento de las proteínas de matriz pulmonar producido por la instilación con CdCl<sub>2</sub>.

© 2009 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Palabras clave:

Factor de crecimiento de hígado

Fibrosis

Función pulmonar

Morfometría pulmonar

Colágeno

\*Corresponding author.

E-mail address: lpuerto@fjd.es (L. del Puerto-Nevado).

## Introduction

Pulmonary fibrosis is a condition characterised by a progressive deterioration of the pulmonary function.<sup>1</sup> There are several animal models which attempt to reproduce this condition; perhaps the most extended is bleomycin induction (a fibrogenic agent widely employed for the study of the initial stages of the condition) since it is inverted if the agent is not continuously administered.<sup>2</sup> For the study of the fibrotic stages, the assessment should take place in the second and third weeks from the moment of induction. For this, there are more effective experimental models, such as cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>) by single dose endotracheal induction in animals which causes pulmonary inflammation with fibrotic activity accompanied by an alveolar space enlargement recalling human centriacinar emphysema,<sup>3</sup> but with a predominance of fibrosis. This agent induces a functional pattern characterised by a decrease in volume, pulmonary distension and expiratory flow<sup>4,5</sup> as well as an increase in proteins on the lung matrix, collagen and elastin.<sup>5,6</sup> Frankel et al<sup>7</sup> substantiated that this model reproduced many of the features of fibrotic response observed in humans and in other models of animal fibrosis. The acute inflammation dropped to close to normal values towards the seventh day, while the amount of collagen remained high and the lung volume<sup>7,8</sup> descended.

The liver growth factor (LGF) is a liver mitogen composed of an albumin-bilirubin complex<sup>9,10</sup> showing activity either *in vivo* or *in vitro*. This factor, purified by our group,<sup>11</sup> was proven in a model of CCl<sub>4</sub> induced cirrhosis; the LGF markedly decreased the accumulation of extra-cellular matrix components (collagen), restored the serum enzymes, the structural integrity and the necrotic tissue, reduced the abscesses and improved haemodynamics.<sup>12</sup> We have recently proven the anti-fibrotic activity of the LGF in bile duct-ligated rats, in which a marked descent in the accumulation of extracellular matrix was produced, recovering its hepatic function as well as reducing key factors in the extension of the fibrosis, such as tumour growth factor (TGF- $\beta$ ).<sup>13</sup> The LGF anti-fibrotic action is measured by the decrease in activation of stellate cells and secreting cells in the extracellular matrix.<sup>14</sup> Subsequent studies have also proven that the LGF is able to reduce both fibrosis in the carotid artery and collagen in the wall of this artery by 50% after 2 weeks of treatment, causing substantial regeneration of the arterial wall, lowering blood pressure and improving vascular function in a model of spontaneously hypertensive rats.<sup>15</sup> Similarly, the LGF was able to stimulate dopamine terminal sprouting, partially restore motor function in rats with Parkinson's disease<sup>16</sup> as well as stimulate the generation of new neurons and mobilisation of neurons.<sup>17</sup>

The LGF mitogenic activity in rat liver is measured by the increase in mRNA expression of the tumour necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), and the main targets of the LGF are the portal endothelial cells, in which a TNF- $\alpha$  expression increase has been observed. Furthermore, the LGF also stimulates TNF- $\alpha$  secretion in endothelial cell cultures, however, it does not cause an increase in the expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) or vascular adhesion molecule 1 (VCAM-1).<sup>18</sup>

By considering the LGF effect on the fibrosis of other systems, this study proposes a preliminary study on the potential therapeutic effect in a model of lung fibrosis induced with CdCl<sub>2</sub>. The administration of this factor, once the fibrosis model is established, displays preliminary data of the LGF therapeutic action, obtains improvements in lung function and partially inverts the deposit of matrix proteins.

## Methods

1. *Materials and animals:* The Animal Experimentation Committee at the Jiménez Díaz-CAPIO Foundation approved all

the experiments performed on animals. Forty-two male Wistar rats (220–230g) were administered a single dose via endotracheal induction of saline (control group, n = 21) or 0.5ml/rat of CdCl<sub>2</sub> at 0.025% (n = 21). After instillation, the rats were returned to their cages, where they were administered H<sub>2</sub>O and food *ad libitum*. After 35 days, a group of 15 rats was sacrificed (8 control group and 7 CdCl<sub>2</sub>) to confirm the presence of fibrosis. The remaining animals induced with CdCl<sub>2</sub> were divided into 2 new groups and treated with 6 intraperitoneal (i.p.) doses (2 injections/week, for 3 weeks) of saline (CdCl<sub>2</sub> group, n = 7) or 5 $\mu$ g/rat of LGF (LGF group, n = 7). Fifty-five days after induction, we compared the CdCl<sub>2</sub> and LGF groups on a functional, morphometric and biochemical level. Furthermore, a group of control rats was treated with LGF (control group + LGF) and this group was included in the comparisons.

2. *Lung function tests:* The functional study was performed in a respirator for small animals (Harvard).<sup>5</sup> The rats were anaesthetised with sodium pentothal (60mg/kg of weight, i.p.), they were tracheotomised, placed in a plethysmograph and connected to a cannula to allow communication with the respirator. As soon as the rats were connected to the respirator, they were paralysed with 0.2mg of pancuronium bromide and artificially ventilated. Changes in inspiratory capacity (IC) (ml), lung compliance (LC) (ml/cm of H<sub>2</sub>O), forced vital capacity (FVC) (ml) and forced expiratory flow at 75% (FEF75%) (ml/s) were then determined.

The IC was considered as a change in the pulmonary volume when an airway pressure of 30cm H<sub>2</sub>O was reached. For the quasi static lung pressure-volume curves, the animals were insufflated with air up to an airflow pressure of 30cm H<sub>2</sub>O and exit forced to a constant flow of 1ml/s until a residual volume was reached. Compliance was considered as the highest point in the pressure-volume curve during expiration. In the end, flow-volume curves were induced, the rats were insufflated with air to a pressure of 30cm H<sub>2</sub>O and forced expiration provoked using a vacuum pump (Emerson) at a pressure of -(40cm H<sub>2</sub>O). From these curves, the FVC and the FEF75% of the FVC are determined.

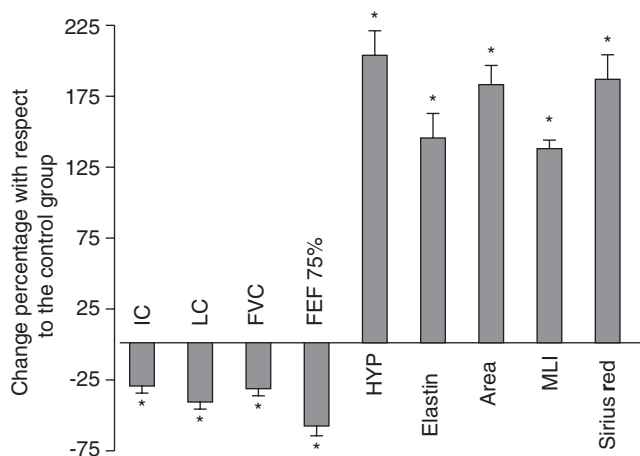
3. *Morphometry:* After the functional study, the animals were sacrificed with an overdose of pentobarbitone and the cardiopulmonary block was removed. The left lung was weighed and immediately frozen to perform the corresponding biochemical determinations. The right lung was set applying a 10% formaldehyde solution at a constant pressure of 25cm H<sub>2</sub>O for 24 hours. After setting, 3 lobes were taken, added to paraffin and 5 $\mu$ m thick cuts were made and stained with haematoxylin and eosin for the morphometric study and Sirius red for the collagen deposit quantification. Using an image analysis program for samples stained with haematoxylin and eosin, the alveolar internal area (AIA) ( $\mu$ m<sup>2</sup>) was calculated as well as the horizontal and vertical mean linear intersection (LM) ( $\mu$ m). The collagen content was quantified in the samples stained with Sirius red and the birefringence in the collagen-rich areas was compared with the total area of tissue of each microscopic field. The images were visualised with a video camera (Leica DC 100; Leica Microsystems) with a resolution of 782x582 pixels, adapted to a microscope (Olympus BX40). The different fields were quantified using a 10 $\times$  lens and a 0.5 $\times$  video camera adaptor. Leica Qwin software was used to analyse the images and the AIA, LM and birefringence calculated. Each datum represents the average value of at least 18 fields selected randomly in different cuts.

4. *Biochemical analysis of collagen and elastin:* Collagen quantification was performed by measuring the hydroxyproline (HYP) residue content. Previously, the left lung was homogenised and chloramine-T was added after acid hydrolysis to induce oxidation. The Erlich (Sigma Aldrich) reagent was then added and once the reaction developed, absorbency at 560nm<sup>19</sup> was assessed

for each of the samples. The elastin was purified through tissue homogenisation with phosphate buffered saline (PBS) and trichloroacetic acid (TCA) at 10%, centrifugation and treatment with TCA at 5% for 30 min at 90 °C. This last precipitation (purified elastin) was treated with porcine pancreatic elastase type III (Sigma Aldrich) for 4 hours at 25 °C. The elastin was measured with a colorimetric method and bicinchoninic acid (BCA Protein Assay Kit; Pierce, Promega) was used. HIP (Sigma Aldrich) and bovine neck ligament elastin (Sigma Aldrich) were used as reference standards. Results were expressed in HIP or elastin milligrams for the left lung.

5. *Liver growth factor isolation and purification:* The LGF was purified of rat serum according to the previously described procedure.<sup>20</sup> The purity and absence of other growth factors or pollutants in the LGF preparation were also performed using standardised criteria.<sup>11</sup> The LGF preparations were freeze-dried and kept at 4 °C until use, when the different aliquots in saline were dissolved for i.p. injection (the LGF is equally active in i.p. and i.v. injection). Before using the LGF in these experiments, its activity was checked *in vivo* at different doses through injection in normal rats to establish the dose at which greater stimulation of DNA synthesis in the liver is produced and for this the incorporation of tritiated thymidine (New England Nuclear; Dreieich, Germany) was determined in the DNA.<sup>11</sup> In accordance with previous studies, it was considered that the optimum dose of LGF was 0.5 µg/rat.<sup>15</sup>

6. *Statistical analysis:* All the data expressed as a mean ± standard error of the mean (SEM). Comparisons were performed with ANOVA. Fisher's least significant difference method was used to analyse the differences between means.



**Figure 1.** Changes in all the variables analysed in the cadmium chloride group 35 days later, compared to the control group. AIA: alveolar internal area; IC: inspiratory capacity; LC: lung compliance; FVC: forced vital capacity; FEF75%: forced expiratory flow at 75%; HYP: hydroxyproline; LM: mean linear intersection. \*p < 0.05 versus control. All data expressed as percentages with respect to the control group.

**Table 1**  
Functional, morphometric and biochemical data 35 days after inducing the lesion<sup>a</sup>

	IC, ml	LC, ml/cm H <sub>2</sub> O	FVC, ml	FEF75%, ml/s	HYP, mg/lung	Elastin, ml/lung	AIA, µm <sub>2</sub>	LM, µm	Sirius red, birefringence/total tissue, %
C	16.3 ± 0.6	1.3 ± 0.07	16.3 ± 0.6	75.7 ± 6.5	1.5 ± 0.2	13.8 ± 1.4	5,362 ± 842	51 ± 3	1.3 ± 0.2
CdCl <sub>2</sub>	11.5 ± 0.7*	0.8 ± 0.09*	11.1 ± 0.7*	33.4 ± 6.0*	3 ± 0.6*	19.4 ± 2.6*	9,616 ± 842*	68 ± 3*	2.4 ± 0.2*

AIA: alveolar internal area; CdCl<sub>2</sub>: cadmium chloride; IC: inspiratory capacity; LC: lung compliance; FVC: forced vital capacity; FEF75%: forced expiratory flow at 75%; H<sub>2</sub>O: water; HYP: hydroxyproline; LM: mean linear intersection.

\*p < 0.05 versus control.

## Results

Thirty five days after inducing the lesion (fig. 1, table 1), a significant descent was detected in all the functional variables studied (IC, LC, FVC and FEF75%) with respect to the values obtained in the control group. On the other hand, a greater increase, also significant, was observed in the protein content of the extracellular matrix, usually found in pulmonary fibrosis, as well as a marked increase in the morphometric variables (AIA and LM) which recall the typical enlargement of the airways of emphysema.

To confirm that the LGF does not present negative effects in the healthy animals, 7 rats in the control group were administered the same treatment as the LGF group. No differences were found in relation to the control group (table 2). Neither were differences found in any of the parameters studied (table 3) between days 35 and 55 within the group of rats to which CdCl<sub>2</sub> had been administered, which confirms that the induced lesion was stable and permanent in the period where treatment with LGF was applied.

1. *Pulmonary function:* The changes in IC, LC, FVC and FEF75% in the study groups are shown in figure 2. As previously mentioned, the pulmonary fibrosis induced with CdCl<sub>2</sub> produced a significant descent in IC, LC, FVC and FEF75% in comparison with the control rats. The administration of LGF brought all the functional variables to values near normality, with statistically significant variations in IC, FVC and FEF75%, but not in LC (LGF versus CdCl<sub>2</sub>).

2. *Pulmonary collagen and elastin:* The CdCl<sub>2</sub> caused a significant increase in the collagen and elastin contents in the CdCl<sub>2</sub> group compared to the healthy rats. After the LGF treatment, the lung content in collagen was less than in the rats that received CdCl<sub>2</sub>, and this difference was important when assessed in terms of HYP residues (fig. 3). We also detected a notable descent in the pulmonary elastin content in the LGF group in comparison to the rats that received CdCl<sub>2</sub> (fig. 3).

Figure 4 shows an increase in the collagen deposit, analysed with birefringence in the collagen-rich areas of the Sirius red staining. The LGF partially inverted the lung matrix deposits, with a tendency to reach normal values, but with no statistical significance.

3. *Morphometry:* The morphometric analysis of the LM and AIA display a significant increase in these variables in the CdCl<sub>2</sub> group versus the healthy controls. After treatment with LGF, a slight reduction in the LM and AIA was observed, but with no statistical importance (fig. 5). Figure 6 displays microscope images of a healthy lung and another instilled with CdCl<sub>2</sub>, where the increase in alveolar size and the peribronchial fibrosis present in the affected group are evident.

## Discussion

In this article, we show that the model of CdCl<sub>2</sub> induced lung lesion has a fibrotic component characterised by the decrease of the functional variables as well as an increase in the matrix protein deposits and also, an emphysematous component due to the existence of enlarged alveoli observed in the morphometric analysis. Based on this model, established 35 days after the CdCl<sub>2</sub>,

**Table 2**

Comparison between the control group and the control group + liver growth factor in every variable

	IC, ml	LC, ml/cm H <sub>2</sub> O	FVC, ml	FEF75%, ml/s	HYP, mg/lung	Elastin, ml/lung	AIA, μm <sub>2</sub>	LM, μm	Sirius red, birefringence/ total tissue, %
CdCl <sub>2</sub> , 35 days	11.5 ± 0.7	0.7 ± 0.09	11.1 ± 0.7	33.4 ± 6	3.0 ± 0.2	19.4 ± 2.6	9,616 ± 842	68 ± 3	2.4 ± 0.2
CdCl <sub>2</sub> , 55 days	11.8 ± 0.5	0.7 ± 0.06	11.5 ± 0.6	35.4 ± 4.2	3.8 ± 0.2	21.6 ± 1.2	1,0931 ± 1,056	69 ± 2	3.1 ± 0.2

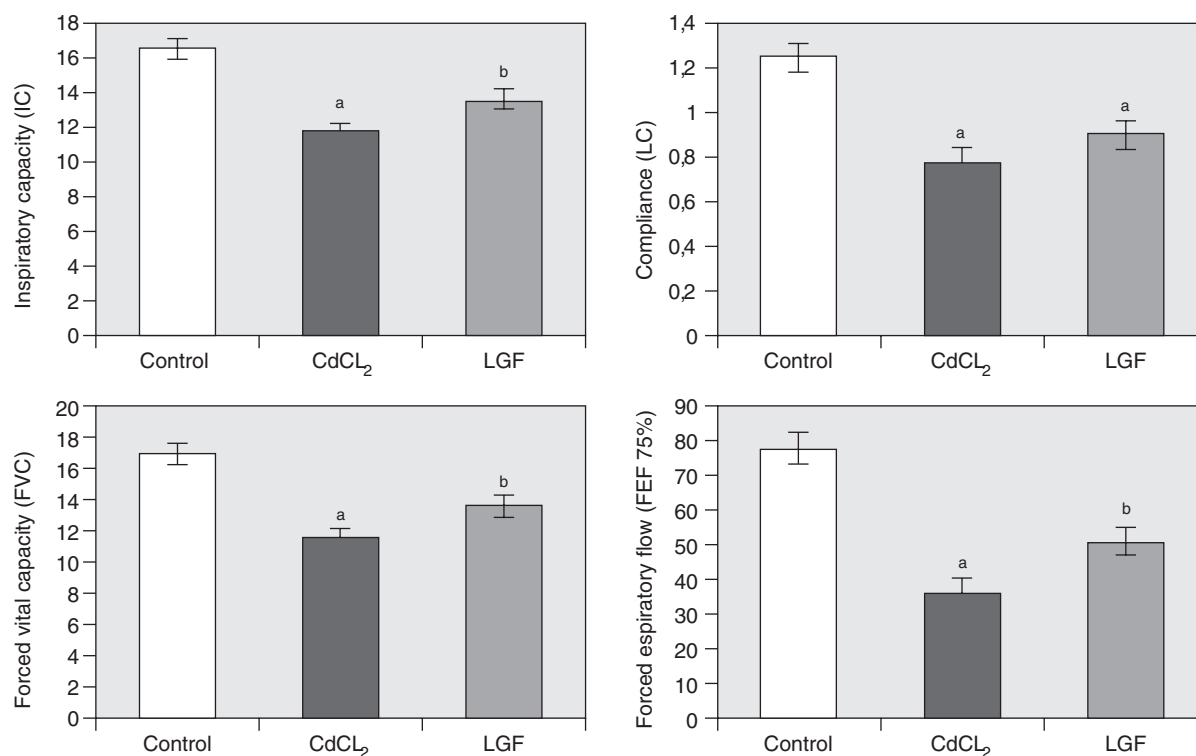
No statistical differences are observed between the groups.

AIA: alveolar internal area; CdCl<sub>2</sub>: cadmium chloride; IC: inspiratory capacity; LC: lung compliance; FVC: forced vital capacity; FEF75%: forced expiratory flow at 75%; H<sub>2</sub>O: water; HYP: hydroxyproline; LM: mean linear intersection.**Table 3**

Comparison of the functional, morphometric and biochemical data 35 and 55 days after the administration of cadmium chloride

	IC, ml	LC, ml/cm H <sub>2</sub> O	FVC, ml	FEF75%, ml/s	HYP, mg/lung	Elastin, ml/lung	AIA, μm <sub>2</sub>	LM, μm	Sirius red, birefringence/ total tissue, %
C	16.5 ± 0.5	1.2 ± 0.06	16.7 ± 0.63	77.4 ± 4.6	1.4 ± 0.2	12.3 ± 1.3	3,981 ± 1,141	46 ± 2	1.5 ± 0.2
C+LGF	16.8 ± 0.5	1.31 ± 0.06	16.8 ± 0.5	79.8 ± 6.4	1.6 ± 0.3	13.8 ± 1	4,154 ± 551	47 ± 2	1.9 ± 0.2

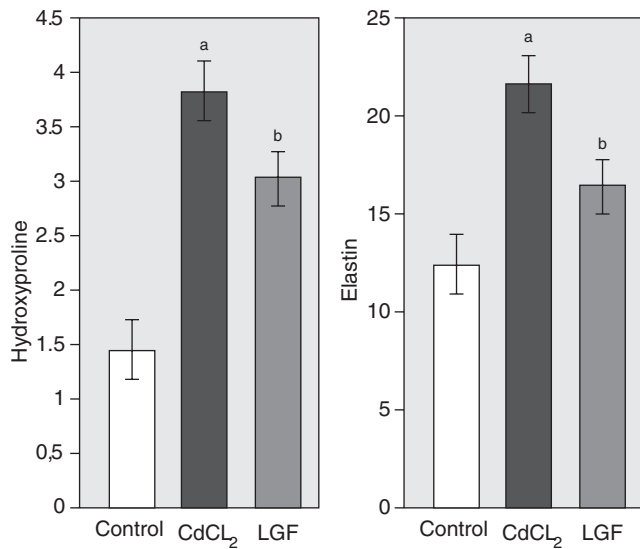
No significant differences were found between the groups.

AIA: alveolar internal area; IC: inspiratory capacity; LC: lung compliance; FVC: forced vital capacity; FEF75%: forced expiratory flow at 75%; H<sub>2</sub>O: water; HYP: hydroxyproline; LGF: liver growth factor; LM: mean linear intersection.**Figure 2.** Changes in the functional variables in all the experimental groups. Control group (n = 6), CdCl<sub>2</sub> group (n = 7) and LGF group (n = 7). CdCl<sub>2</sub>: cadmium chloride; IC: inspiratory capacity; LC: lung compliance; FVC: forced vital capacity; FEF75%: forced expiratory flow at 75%; LGF: liver growth factor. <sup>a</sup>p < 0.05 versus control. <sup>b</sup>p < 0.05 versus CdCl<sub>2</sub>.

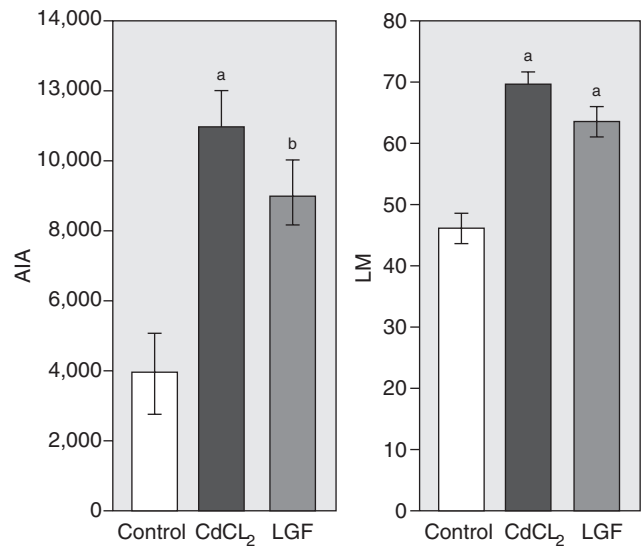
instillation, treatment with LGF partially inverts the induced fibrotic lesion. This statement is supported by the improvement in most of the functional variables (IC, FVC and FEF75%) and the notable decrease in the lung matrix proteins (HYP and elastin) after the LGF treatment. The rats instilled with CdCl<sub>2</sub> displayed a descent in the functional variables and an increase in the lung matrix protein levels similar at 35 and 55 days after instillation, so we can consider the lesion caused by the CdCl<sub>2</sub> as permanent and, therefore,

the effects produced by the LGF as therapeutic. To the best of our knowledge, this is the first experimental study in which an antifibrotic treatment partially restores normal lung function of a previously established lesion.

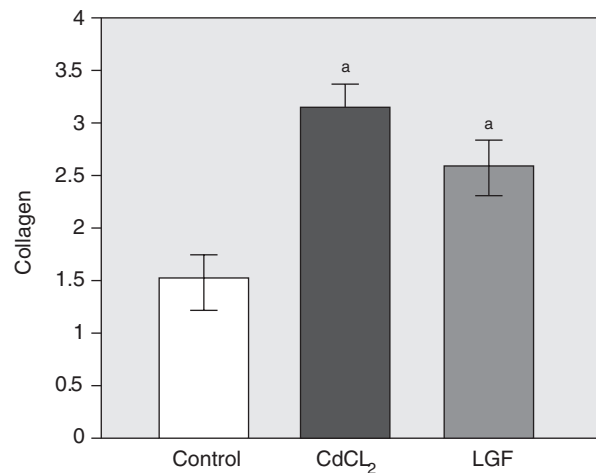
Several authors have described that CdCl<sub>2</sub> induced pulmonary fibrosis is characterised by the functional damage, including a descent in the vital capacity, compliance and forced expiratory flow as well as an increase in the lung matrix protein content<sup>4,6,21</sup> and



**Figure 3.** Changes in the biochemical variables in all the experimental groups. Control group (n = 6), CdCl<sub>2</sub> group (n = 7) and LGF group (n = 7). Hydroxyproline (mg/lung) and elastin (mg/lung) CdCl<sub>2</sub>: cadmium chloride; LGF: liver growth factor. <sup>a</sup>p < 0.05 versus control. <sup>b</sup>p < 0.05 versus CdCl<sub>2</sub>.



**Figure 5.** Changes in the morphometric variables (alveolar internal area [mm<sup>2</sup>] and mean linear intersection [mm]). Control group (n = 6), CdCl<sub>2</sub> group (n = 7) and LGF group (n = 7) CdCl<sub>2</sub>: cadmium chloride; LGF: liver growth factor. <sup>a</sup>p < 0.05 versus control. <sup>b</sup>p < 0.05 versus CdCl<sub>2</sub>.



**Figure 4.** Estimation of collagen content through birefringence with Sirius red. A) Representative case of a normal rat lung. Control group (n = 6). B) Representative case of cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>) induced pulmonary fibrosis. CdCl<sub>2</sub> Group (n = 7). C) Representative case of a lung with CdCl<sub>2</sub> induced fibrosis treated with liver growth factor (LGF). A reduction in the fibrotic areas is observed. LGF group (n = 7). Images taken with a 100x augmentation. Data in birefringence % / total tissue. <sup>a</sup>p < 0.05 versus control. <sup>b</sup>p < 0.05 versus CdCl<sub>2</sub>.

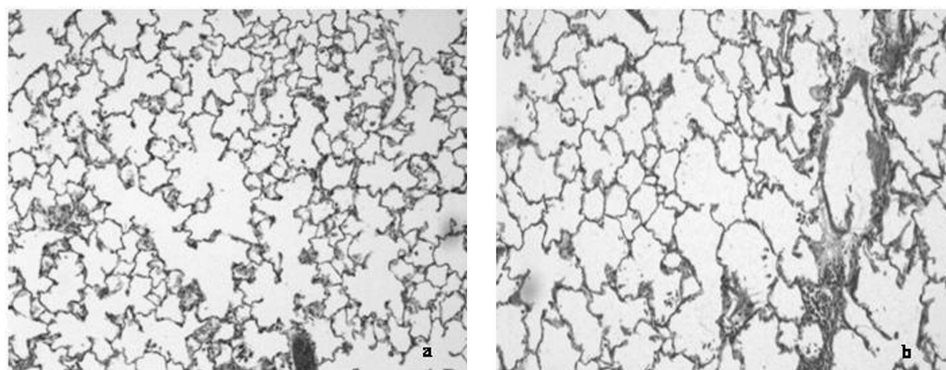
centriacinar emphysema appears.<sup>22</sup> Even though the LGF does not reduce alveolar enlargement caused by the CdCl<sub>2</sub> instillation in any significant manner, although there is a tendency of improvement that could open a new line of study on the track towards the effect of this growth factor in the emphysema.

This study has many similarities to the prior one carried out by Heili Frades et al. In both cases, similar lung lesions have been found that affect the function, alveolus size and extracellular matrix protein levels compatible with centriacinar emphysema and peribronchial fibrosis; in this model the treatment with N-acetylcysteine (NAC) partially improved the pulmonary function deterioration, observed in all the functional variables measured (IC, FVC and FEF75%), except in the LC. The same occurs with the collagen deposit measured by the HYP residues, elevated due to the CdCl<sub>2</sub> induction and partially restored by the NAC treatment. The response pattern observed with the CdCl<sub>2</sub> is very similar to this study, including the responses to treatment. The NAC improves the fibrotic lesion, though the difference lies in the administration method; while this antioxidant agent is administered in a concomitant manner to the induction of the lesion, the LGF is administered once this has been established and stabilised.

The case of NAC is not the only one in medical literature due to the prevalence of this disease and the difficulty of finding effective therapeutic targets to fight it,<sup>23</sup> makes the search for treatment continuous. There are many studies carried out in bleomycin models with antifibrotic agents, such as deferoxamine, the hepatocyte growth factor, the keratinocyte growth factor, interferon and ginkgo biloba, EM703, IMD-0354 and C-type natriuretic peptide,<sup>1,24-30</sup> and even studies that approach another type of treatment such as cellular treatment based on the instillation of alveolar type II cells as a regeneration vehicle of damaged tissue.<sup>31</sup> Although these agents have the capacity of reducing fibrosis, they also have the limitation that the antifibrotic agent is added concomitantly to the development of the disease, which hinders its therapeutic use since the condition is diagnosed, in the majority of cases, once it has been established.

According to previous publication, the cellular inflammation is not a key factor after the first days of CdCl<sub>2</sub> instillation.<sup>7</sup> Since the LGF was administered once the lesion was established, it is unlikely that the LGF activity is due to an anti-inflammatory effect and partially inverts the fibrosis, however, we observe that the LGF has a considerable free radical abduction capacity.<sup>32</sup> Our group recently demonstrated that the antifibrotic capacity of LGF is measured by the partial inhibition of the TGF- $\beta$ , and the transformation of





**Figure 6.** Morphological changes. A) Representative case of a healthy lung. B) Representative case of a cadmium chloride instilled lung showing centriacinar emphysema with peribronchial fibrosis. Stained with haematoxylin and eosin. Images taken with 100x augmentation. CdCl<sub>2</sub>: cadmium chloride.

myofibroblasts,<sup>13,14</sup> both key in the process of extracellular matrix deposit. However, it is also possible that the LGF chooses mother cells and introduces the proliferation of the endothelial and alveolar cells, as other growth factors do.<sup>27,33-35</sup> Altogether, these observations indicate the need to carry out new studies to determine the action mechanism of the LGF in the repair of lung fibrosis.

To conclude, this study shows that LGF treatment administered on a lung fibrosis previously established through the administration of CCl<sub>4</sub>, was able to partially invert the pulmonary fibrosis, improve lung function and invert the increase in lung matrix proteins. Pending determination of the action mechanism that facilitates this response, the possibility of inverting a previously established pulmonary fibrosis opens the possibility that LGF can be applied in the future to pulmonary fibrosis treatment.

#### Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### Funding

Funded by the Spanish Health Research Fund (PI050720) and Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery.

#### References

- Murakami S, Nagaya N, Itoh T, Fujii T, Iwase T, Hamada K, et al. C-type natriuretic peptide attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;287:L1172-7.
- Molina-Molina M, Pereda J, Xaubet A. Experimental models for the study of pulmonary fibrosis: Current usefulness and future promise. *Arch Bronconeumol.* 2007;43:501-7.
- Heili Frades S, Del Puerto-Nevado L, Pérez-Rial S, Martín-Mosquero C, Ortega M, Martínez-Galán L, et al. Improving the cadmium-induced centriacinar emphysema model in rats by concomitant anti-oxidant treatment. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008;35:1337-42.
- Rubio ML, Sánchez-Cifuentes MV, Peces-Barba G, Verbanck S, Paiva M, González Mangado N. Intrapulmonary gas mixing in panacinar- and centriacinar-induced emphysema in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:237-45.
- Snider GL, Lucey EC, Faris B, Jung-Legg Y, Stone PJ, Franzblau C. Cadmium-chloride-induced air-space enlargement with interstitial pulmonary fibrosis is not associated with destruction of lung elastin. Implications for the pathogenesis of human emphysema. *Am Rev Respir Dis.* 1988;137:918-23.
- Driscoll KE, Maurer JK, Poynter J, Higgins J, Asquith T, Miller NS. Stimulation of rat alveolar macrophage fibronectin release in a cadmium chloride model of lung injury and fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992;116:30-7.
- Frankel FR, Steeger JR, Damiano VV, Sohn M, Oppenheim D, Weinbaum G. Induction of unilateral pulmonary fibrosis in the rat by cadmium chloride. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991;5:385-94.
- Damiano VV, Cherian PV, Frankel FR, Steeger JR, Sohn M, Oppenheim D, et al. Intraluminal fibrosis induced unilaterally by lobar instillation of CdCl<sub>2</sub> into the rat lung. *Am J Pathol.* 1990;137:883-94.
- Díaz-Gil JJ, Gavilanes JG, Sánchez G, García-Canero R, García-Segura JM, Santamaría L, et al. Identification of a liver growth factor as an albumin-bilirubin complex. *Biochem J.* 1987;243:443-8.
- Díaz-Gil JJ, Sánchez G, Trilla C, Escartin P. Identification of biliprotein as a liver growth factor. *Hepatology.* 1988;8:484-6.
- Díaz-Gil JJ, Escartin P, García-Canero R, Trilla C, Veloso JJ, Sánchez G, et al. Purification of a liver DNA-synthesis promoter from plasma of partially hepatectomized rats. *Biochem J.* 1986;235:49-55.
- Díaz-Gil JJ, Muñoz J, Albillos A, Rúa C, Machín C, García-Canero R, et al. Improvement in liver fibrosis, functionality and hemodynamics in CCl<sub>4</sub>-cirrhotic rats after injection of the liver growth factor. *J Hepatol.* 1999;30:1065-72.
- Díaz-Gil JJ, García-Monzón C, Rúa C, Martín-Sanz P, Cereceda RM, Miquilena-Colina ME, et al. The anti-fibrotic effect of liver growth factor is associated with decreased intrahepatic levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 and transforming growth factor beta 1 in bile duct-ligated rats. *Histol Histopathol.* 2008;23:583-91.
- Díaz-Gil JJ, García-Monzón C, Rúa C, Martín-Sanz P, Cereceda RM, Miquilena-Colina ME, et al. Liver growth factor antifibrotic activity in vivo is associated with a decrease in activation of hepatic stellate cells. *Histol Histopathol.* 2009;24:473-9.
- Somoza B, Abderrahim F, González JM, Conde MV, Arribas SM, Starcher B, et al. Short-term treatment of spontaneously hypertensive rats with liver growth factor reduces carotid artery fibrosis, improves vascular function, and lowers blood pressure. *Cardiovasc Res.* 2006;69:764-71.
- Reimers D, Herranz AS, Díaz-Gil JJ, Lobo MV, Paino CL, Alonso R, et al. Intraatrial infusion of liver growth factor stimulates dopamine terminal sprouting and partially restores motor function in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Histochem Cytochem.* 2006;54:457-65.
- Gonzalo-Gobernado R, Reimers D, Herranz AS, Díaz-Gil JJ, Osuna C, Asensio MJ, et al. Mobilization of neural stem cells and generation of new neurons in 6-OHDA-lesioned rats by intracerebroventricular infusion of liver growth factor. *J Histochem Cytochem.* 2009;57:491-502.
- Díaz-Gil JJ, Majano PL, López-Cabrera M, Sánchez-López V, Rúa C, Machín C, et al. The mitogenic activity of the liver growth factor is mediated by tumor necrosis factor alpha in rat liver. *J Hepatol.* 2003;38:598-604.
- Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem.* 1996;29:225-9.
- Díaz Gil JJ, Rúa C, Machín C, Cereceda RM, García-Canero R, de Foronda M, et al. Hepatic growth induced by injection of the liver growth factor into normal rats. *Growth Regul.* 1994;4:113-22.
- Dolnikoff M, Mauad T, Ludwig MS. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:1750-7.
- Snider GL, Hayes JA, Korthy AL, Lewis GP. Centrilobular emphysema experimentally induced by cadmium chloride aerosol. *Am Rev Respir Dis.* 1973;108:40-8.
- Selman M, Navarro C, Gaxiola M. Idiopathic pulmonary fibrosis: In search of an effective treatment. *Arch Bronconeumol.* 2005;41:15-20.
- Dohi M, Hasegawa T, Yamamoto K, Marshall BC. Hepatocyte growth factor attenuates collagen accumulation in a murine model of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:2302-7.
- Chandler DB, Fulmer JD. The effect of deferaxamine on bleomycin-induced lung fibrosis in the hamster. *Am Rev Respir Dis.* 1985;131:596-8.
- Erdogan H, Kotuk M, Yagmurca M, Kilic T, Ermis H, et al. Ginkgo biloba inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Pharmacol Res.* 2006;53:310-6.
- Yi ES, Williams ST, Lee H, Malicki DM, Chin EM, Yin S, et al. Keratinocyte growth factor ameliorates radiation- and bleomycin-induced lung injury and mortality. *Am J Pathol.* 1996;149:1963-70.
- Inayama M, Nishioka Y, Azuma M, Muto S, Aono Y, Makino H, et al. A novel IkkappaB kinase-beta inhibitor ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:1016-22.
- Li YJ, Azuma A, Usuki J, Abe S, Matsuda K, Sunazuka T, et al. EM703 improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the inhibition of TGF-beta signaling in lung fibroblasts. *Respir Res.* 2006;7:16.

30. Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis. Down regulation of TGF-beta and procollagen I and III gene expression. *Exp Lung Res.* 1995;21:791-808.
31. Serrano-Mollar A, Nacher M, Gay-Jordi G, Cloas D, Xaubet A, Bulbena O. Intratracheal transplantation of alveolar type II cells reverses bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176:1261-8.
32. Condezo-Hoyos L, Abderrahim F, Conde MV, Susin C, Díaz-Gil JJ, González MC, et al. Antioxidant activity of liver growth factor, a bilirubin covalently bound to albumin. *Free Radic Biol Med.* 2009;46:656-62.
33. Abe S, Boyer C, Liu X, Wen FQ, Kobayashi T, Fang Q, et al. Cells derived from the circulation contribute to the repair of lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:1158-63.
34. Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Suzuki T, Mizuno S, et al. Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lungs through mobilizing endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324:276-80.
35. Gomperts BN, Belperio JA, Fishbein MC, Keane MP, Burdick MD, Strieter RM. Keratinocyte growth factor improves repair in the injured tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;37:48-56.