



Estudi del fenotip miofibroblast i la seva implicació en l'expressió de ciclooxigenasa-2 i en la secreció de prostaglandina E2 en la fibrosi pulmonar idiopàtica

Marta Gabasa Ferrández

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Programa de Doctorat en Biomedicina
Universitat de Barcelona

***Estudi del fenotip miofibroblast i la seva implicació en
l'expressió de ciclooxigenasa-2 i en la secreció de
prostaglandina E2 en la fibrosi pulmonar idiopàtica***

Tesi doctoral presentada per: **Marta Gabasa Ferrández**

Dirigida per: Dr. Antoni Xaubet i Mir, Dr. Javier Pereda Cervera i amb la tutoria del
Dr. César Picado i Vallés. Realitzada al laboratori d'Immunoal·lèrgia Respiratòria
Clínica i Experimental, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona

Dr. Antoni Xaubet i Mir

Dr. Javier Pereda Cervera

Dr. César Picado i Vallés

Marta Gabasa Ferrández

A mis padres
A mi iaia
A Mari

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, los doctores Antoni Xaubet y Javier Pereda, por su apoyo durante los años que ha durado la realización de este trabajo.

A Xaubet porque confió en mí en un principio y apostó por que yo llevara el peso de su proyecto sin tener experiencia, hecho que me ha permitido desarrollar mi propio criterio y aprender a responsabilizarme de lo que conllevan las actividades del día a día en la investigación. Y por descontento por permitirme mediante financiación la realización de este doctorado. Gracias por haber estado disponible incluso en los malos momentos personales y haber hecho todo lo posible por ayudarme.

A Javi gracias por ser mi apoyo y guía científico y pese a la distancia de por medio, por no haber olvidado la fibrosis y responder a todas mis dudas y preguntas. Cada reunión *online* ha sido muy valiosa y necesaria para mí y sin tu dirección no habría sido posible llevar a cabo esta tesis.

Quiero agradecer su apoyo a mi tutor de tesis, el doctor César Picado y al doctor Joaquim Mullol, ya que ambos me han proporcionado brillantes consejos científicos desde la visión única que da la experiencia.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Liliana y a Mireya, porque ante todo, son mis amigas, y de las mejores que hay. A Liliana por ser mi compañera de aventuras día a día y compartir conmigo tanto los momentos de *brainstorming* científico como las tonterías más absurdas. ¡Nadie me entiende como tú! A Mireya por ser mi apoyo, mi consejera, por aguantarme en todo momento y por alegrarme tantos y tantos días. Y los que me quedarán contigo, preciosidad.

A Borch le agradezco muchas cosas ya que ha sido mucho tiempo mano a mano con el doctorado...Y quiero sobretodo animarle a no desfallecer cuando se pongan las cosas negras, que tiene empuje de sobra para la tesis y lo que le echen después. Mogro hasta el fin. A Alexandra quiero agradecerle la confianza que me ha dado desde el primer momento y animarla a continuar en esto de la ciencia, que los principios nunca fueron fáciles. ¡Equipo! De Mercè, destacar su positividad y su empuje, que la hacen un ejemplo de superación y de Laura Fer su enorme capacidad para ver el lado bueno de todo. Suerte en esta nueva etapa de tu vida.

Querría agradecer también al resto de miembros del laboratorio y del equipo de investigación, con los que he compartido muchas horas, que quedarán siempre en mi recuerdo. A Pain por ser mi maestra cuando llegué y enseñármelo todo en tan poco tiempo. A Laura y Jordi, por prestarme sus consejos científicos siempre que los he necesitado, a María por que me ha hecho darme cuenta de que siempre hay que mirar hacia adelante, a Elena por facilitarme tanto

y evitar que perdiera tiempo en temas burocráticos, a Rosa por ser tan atenta y cercana. A Asun porque pese a haber coincidido poco tiempo, fue de mucha ayuda para mí. Y no me olvido de los compañeros del Cellex, que han compartido este último año conmigo. En especial, gracias a Dani por las risas y los sustos en los momentos que más falta hacían.

Quiero agradecerle a la doctora María Molina por su amabilidad y por preocuparse por mí cuando más lo necesitaba. A Susana le agradezco las largas conversaciones telefónicas en las que nos poníamos al día de ciencia y de todo lo demás. A Esteban, por compartir más de un año peleándonos con la famosa ECA y por su dedicación a la básica, cosa que no todos en su oficio comparten. Me he reído mucho contigo y espero que te vaya genial. A Jordi Alcaraz por enseñarme que la ciencia funciona mejor en colaboración, una importante lección para el futuro.

A mis compañeros y amigos, que ya sean los de toda la vida, como Déguène y Miguel, los de la facultad, Marta Ibiza, Lorena, Trini, Esther y Eva, los del máster o los que han venido más recientemente, que son bastantes para nombrarlos pero ellos saben quienes son...A los animalicos por todos los buenos momentos y a las ¡Bretxas! que sepan que no me olvido de ellas. Gracias a todos por apoyarme en cada una de las etapas de mi vida en las que habéis estado presentes.

Quiero dar las gracias a mi familia, a toda en general y a mis padres Victoria y Manolo en particular. Os lo agradezco todo. Vuestro apoyo incondicional, vuestra comprensión y dedicación y todo lo que me habéis dado para estar donde estoy. Sois los mejores y os quiero. Querría recordar a mis avis, Alfonso y Lola, que ya no están conmigo pero que sé que estarían orgullosos de mí, como siempre lo estuvieron. A los padres de Mari por acogerme tan bien y a Ana por ser como es, ni más ni menos.

Y por supuesto a Mari. Te dedico la tesis entera, porque te mereces, eso como mínimo. Gracias, entre otras muchas cosas, por haberme escuchado en los múltiples momentos malos y haberme animado como sólo tú podrías, con tu comprensión y tu sonrisa, además de tu empatía de doctoranda. ¡En nada tienes tu tesis! Muchas gracias por cada día, por que todo lo que había, tú lo has vuelto mucho mejor. Gracias por hacerme feliz.

ÍNDEX

ÍNDEX DE FIGURES.....	VII
ÍNDEX DE TAULES.....	XIII
ABREVIATURES.....	XV
I – INTRODUCCIÓ.....	1
1. FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA	3
1.1 Malalties pulmonars intersticials difuses (MPID)	3
1.2 Incidència i prevalença.....	4
1.3 Història natural	4
1.4 Factors de risc potencials.....	5
1.5 Diagnòstic	5
1.6 Complicacions i comorbilitats.....	8
1.7 Tractament	9
2. PATOGENIA I FISIOPATOLOGIA DE LA FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA.....	12
2.1 Balanç de factors solubles.....	14
2.2 Altres mecanismes patogènics a la fibrosi pulmonar idiopàtica.....	14
2.2.1 Paper de les molècules de superfície cel·lular	14
2.2.2 Estrès oxidatiu.....	15
2.2.3 Coagulació al pulmó fibròtic.....	15
3. INFLAMACIÓ A LA FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA	17
3.1 Paper de les cèl·lules inflamatores en la fibrosi pulmonar idiopàtica	17
3.2 La via de l'àcid araquidònic.....	18
3.2.1 Prostaglandina E2	19
3.2.2 Icosanoides a la fibrosi pulmonar	20
3.2.3 Diàleg entre els icosanoides i altres mediadors en la fibrosi	22
3.2.4 Icosanoides com a dianas terapèutiques	22

3.3	Interleuquina-1 β	23
3.4	Receptor d'interleuquina-1.....	23
3.4.1	Família del receptor d'interleuquina-1.....	24
3.4.2	Complexe d'activació del receptor d'interleuquina-1 tipus I.....	25
3.4.3	Receptors d'interleuquina-1 en la fibrosi pulmonar idiopàtica	26
4.	CÈL·LULES EPITELIALS I MESENQUIMALS ALVEOLARS I FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA	27
4.1	Cèl·lules alveolars a la fibrosi pulmonar idiopàtica	27
4.2	Paradoxa de l'apoptosi a la fibrosi pulmonar idiopàtica	28
4.3	El miofibroblast.....	29
4.4	Origen dels miofibroblastes.....	29
4.4.1	Transició epiteli-mesenquimal.....	31
4.4.2	Transició epiteli-mesenquimal en la fibrosi pulmonar idiopàtica	32
4.5	Procés de reparació d'una ferida	33
II - OBJECTIUS.....		35
III - MATERIAL I MÈTODES		39
1.	MATERIAL	41
1.1	Població.....	41
2.	MÈTODES.....	42
2.1	Cultiu cel·lular.....	42
2.1.1	Aïllament de fibroblasts primaris de pulmó.....	42
2.1.2	Congelació cel·lular.....	42
2.1.3	Caracterització del cultiu.....	43
2.1.4	Cultiu de la línia cel·lular epitelial de pulmó A549.....	43
2.2	Disseny experimental	44
2.3	<i>Western blot</i>	49
2.3.1	Extracció de proteïnes.....	49
2.3.2	Determinació de la concentració de proteïnes.....	49

2.3.3	Electroforesi de proteïnes.....	49
2.3.4	Transferència a membrana	50
2.3.5	Bloqueig d'unions inespecífiques	50
2.3.6	Immunodetecció proteica i anàlisi densitomètric	50
2.4	Immunofluorescència	51
2.4.1	Coimmunofluorescència	52
2.5	Immunohistoquímica	52
2.6	Anàlisi de la replicació de DNA (Click-iT®).....	53
2.6.1	Avaluació de la proliferació cel·lular per citometria de fluxe.....	54
2.6.2	Avaluació de la proliferació cel·lular per anàlisi d'imatge	54
2.7	Detecció de citotoxicitat per kit LDH.....	55
2.8	Aïllament de RNA i RT-qPCR	56
2.8.1	Extracció de RNA.....	56
2.8.2	Retrotranscripció	56
2.8.3	PCR quantitativa	57
2.9	Quantificació del col·lagen soluble pel mètode de <i>Sircol</i>	58
2.10	Determinació de PGE ₂	59
2.11	Anàlisi estadístic	60
IV	- RESULTATS	61
1.	ESTUDI DE LA POBLACIÓ BASAL DE MIOFIBROBLASTES EN CULTIUS DE FIBROBLASTES PRIMARIS CONTROL I DE FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA	63
2.	OBTENCIÓ D'UN CULTIU ENRIQUIT EN MIOFIBROBLASTES UTILITZANT TGF-β1 COM AGENT INDUCTOR DE LA TRANSICIÓ FIBROBLAST-MIOFIBROBLAST.....	65
2.1	El tractament amb TGF-β1 indueix un increment de la transició fibroblast-miofibroblast dosi-depenent	65
2.2	El tractament amb TGF-β1 indueix un increment de la transició fibroblast-miofibroblast temps-depenent	66
2.3	Expressió de col·lagen induïda per TGF-β1 en cultius control i amb fibrosi pulmonar idiopàtica	67

3. ESTUDI DE LA MIGRACIÓ I PROLIFERACIÓ DELS MIOFIBROBLASTES PROCEDENTS DE CULTIUS CONTROL I DE FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA.....	70
3.1 Percentatge de cèl·lules α -SMA positives a confluència i tractades amb TGF- β 1 en medi suplementat amb 1% de sèrum fetal boví.....	70
3.2 Comparació del percentatge de miofibroblastes presents a les zones confluent i del tall en cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica	72
3.3 Prolifерació de fibroblastes i miofibroblastes control i FPI a la zona del tall	74
3.4 Efecte de la inhibició de la proliferació amb Mitomicina C sobre el tancament d'un tall <i>in vitro</i>	76
3.5 Tancament de l'àrea de tall a 24h i 48h per fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica	78
4. EXPRESSIÓ DE COX-2 EN FIBROBLASTES I MIOFIBROBLASTES CONTROL I DE FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA	81
4.1 Expressió proteica de COX-1, COX-2 i α -SMA induïda per interleuquina- 1 β a 4 i 24h.....	81
4.2 Expressió gènica de COX-2 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica tractats amb interleuquina-1 β	82
4.3 Anàlisi de la expressió de COX-2 als miofibroblastes <i>in situ</i> , amb i sense interleuquina-1 β	82
4.4 Efecte del tractament amb TGF- β 1 a 4, 24 i 72h sobre l'expressió de COX-2 en fibroblastes.....	84
4.5 Expressió de COX-2, COX-1 i α -SMA en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica estimulats amb IL-1 β i/o TGF- β 1	85
4.6 Expressió de COX-2, COX-1 i α -SMA en fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica estimulats amb interleuquina-1 β	86
4.7 Expressió de COX-1 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica estimulats per TGF- β 1 durant 72h	87
4.8 Expressió de COX-2 en fibroblastes control estimulats durant 72h amb TGF- β 1 i re-incubats durant 4 o 24h amb TGF- β 1 nou.....	87
4.9 Efecte de l'estimulació amb interleuquina-1 β sobre l'expressió de COX-2 en una població enriquida de miofibroblastes	88

4.10	Secreció de prostaglandina E2 en fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica.....	90
4.11	Efecte del tractament amb interleuquina-1 β i prostaglandina E2 sobre la proliferació de fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica.....	91
4.12	Efecte de la prostaglandina E2 sobre el tancament d'una ferida in vitro en cultius de fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica.....	92
4.13	Expressió de COX-2 i α -SMA en teixit de pulmó control i amb fibrosi pulmonar idiopàtica	95
5.	EXPRESSIÓ DE COX-2 EN CÈL·LULES EPITELIALS ALVEOLARS A549	96
5.1	Inducció de la transició epiteli-mesenquimal en cèl·lules epitelials alveolars A549 per mitjà de la incubació amb TGF- β 1	96
5.1.1	Disminució de l'expressió d'E-cadherina en cèl·lules epitelials alveolars A549 tractades amb TGF- β 1.....	96
5.1.2	Increment de la síntesi de col·lagen α 1 i de l'expressió de F-actina en cèl·lules epitelials alveolars tractades amb TGF- β 1.....	97
5.2	Expressió de COX-2 en cèl·lules epitelials alveolars A549.....	98
5.2.1	Efecte de la interleuquina-1 β sobre l'expressió de COX-2 en cèl·lules epitelials alveolars A549 després de realitzar la transició epiteli-mesenquimal induïda per TGF- β 1.....	98
5.3	Secreció de prostaglandina E2 en cèl·lules epitelials alveolars A549 després de la inducció de la transició epiteli-mesenquimal	100
5.4	Efecte de la transició epiteli-mesenquimal sobre la proliferació de les cèl·lules epitelials alveolars A549	100
6.	EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR 1 D'INTERLEUQUINA-1 EN FIBROBLASTES CONTROL I DE FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA.....	102
6.1	Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica	102
6.2	Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica tractats amb interleuquina-1 β	103
6.3	Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 en miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica	104

6.4	Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 en miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica tractats amb interleuquina-1 β	105
6.5	Correlació entre l'expressió de COX-2 i del receptor d'interleuquina-1 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica	107
6.6	Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 en teixit de pulmó control i amb fibrosi pulmonar idiopàtica.....	108
6.7	Expressió del receptor 2 d'interleuquina-1 i de la proteïna accessòria en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica	110
7.	EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR 1 D'INTERLEUQUINA-1 EN CÈL·LULES EPITELIALS ALVEOLARS A549.....	114
V - DISCUSSIÓ.....		117
1.	Estudi de la població de miofibroblastes en cultius de fibroblastes primaris control i de fibrosi pulmonar idiopàtica.....	119
2.	Estudi de la migració i proliferació dels miofibroblastes procedents de cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica	121
3.	Expressió deficient de COX-2 i PGE ₂ en fibroblastes i miofibroblastes de fibrosi pulmonar Idiopàtica i de cèl·lules epitelials alveolars A549 en resposta a interleuquina-1 β	125
4.	L'Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 en fibroblastes de fibrosi pulmonar idiopàtica i miofibroblastes està disminuïda	131
VI - CONCLUSIONS.....		135
VII - BIBLIOGRAFIA		139
VII - ANNEX		139

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1.	Classificació de les malalties pulmonars intersticials difuses segons l'ATS/ERS	3
Figura 2.	Història natural de la fibrosi pulmonar idiopàtica	4
Figura 3.	Imatges de TCAR obtingudes amb una separació de 20 mesos on s'observa la progressió de la panalització en la fibrosi pulmonar idiopàtica.....	7
Figura 4.	Obtenció d'una mostra de teixit pulmonar fibròtic mitjançant una biòpsia pulmonar quirúrgica videotorascòpica.....	7
Figura 5.	Arquitectura histològica del pulmó humà sa comparat amb el patró histològic de pneumònia intersticial usual.....	8
Figura 6.	Esquema de la hipòtesi fisiopatològica del desenvolupament de la fibrosi pulmonar idiopàtica	13
Figura 7.	Via de síntesi dels icosanoides des de l'àcid araquidònic cap als leucotriens o les prostaglandines	18
Figura 8.	Complexes del receptor d'interleuquina-1	24
Figura 9.	Possibles orígens descrits del fenotip miofibroblast	30
Figura 10.	Procés de transició epiteli-mesenquimal (EMT)	32
Figura 11.	Caracterització d'un cultiu primari de fibroblastes de pulmó per immunofluorescència.....	43
Figura 12.	Disseny experimental utilitzat per estudiar els fenotips cel·lulars presents en el tancament d'una ferida <i>in vitro</i> en un cultiu de fibroblastes procedents d'individus control i de pacients amb fibrosi pulmonar idiopàtica	46
Figura 13.	Disseny experimental utilitzat per mesurar de la capacitat de tancament d'una ferida realitzada <i>in vitro</i> pels cultius de fibroblastes procedents d'individus control i de pacients amb fibrosi pulmonar idiopàtica.....	47
Figura 14.	Disseny experimental utilitzat per estudiar l'expressió de COX-2 fibroblastes i miofibroblastes obtinguts d'individus control i pacients amb fibrosi pulmonar idiopàtica i en cèl·lules epitelials alveolars A549	48

Figura 15.	Funcionament del kit <i>Cell-death LDH cytotoxicity detection</i> basat en la reacció catalitzada per l'enzim lactat deshidrogenasa (LDH)	55
Figura 16.	Esquema del funcionament de l'assaig <i>Prostaglandin E2 EIA Kit – Monoclonal</i>	59
Figura 17.	Expressió d' α -SMA en cultius de fibroblastes primaris control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI)	63
Figura 18.	Determinació del percentatge de cèl·lules α -SMA positives en cultius de fibroblastes primaris control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) per immunofluorescència	64
Figura 19.	Imatge representativa d'immunofluorescència d' α -SMA en cultius de fibroblastes primaris control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI)	64
Figura 20.	Increment dosi-depenent del percentatge de cèl·lules α -SMA positives en cultius de fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) en resposta a TGF- β 1	65
Figura 21.	Increment temps-depenent del percentatge de cèl·lules α -SMA positives en cultius de fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) en resposta al TGF- β 1	66
Figura 22.	Immunofluorescència representativa de l'expressió d' α -SMA en cultius control i amb fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) incubats en absència o en presència de TGF- β 1	67
Figura 23.	Expressió de col·lagen I α 1 en cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) en presència i absència de TGF- β 1	68
Figura 24.	Expressió de col·lagen 3 α 1 en cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) en presència i absència de TGF- β 1	68
Figura 25.	Col·lagen secretat per fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) en presència o absència de TGF- β 1	69
Figura 26.	Percentatge de cèl·lules α -SMA positives en cultius de fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) en confluència, en absència o presència de TGF- β 1 amb 1% sèrum fetal boví (FBS)	71
Figura 27.	Immunofluorescència de l'expressió d' α -SMA en cultius control i fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) en confluència, en absència o presència de TGF- β 1 amb 1% sèrum fetal boví (FBS)	71

Figura 28.	Miofibroblastes presents a la zona confluent i a la zona del tall de cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) pre-tractats en absència o presència de TGF- β 1.....	72
Figura 29.	Immunofluorescència de l'expressió d' α -SMA a la zona del tall després de 24h en cultius control i fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) pre-tractats o no amb TGF- β 1 en 1% sèrum fetal boví (FBS)	73
Figura 30.	Percentatge de cèl·lules en fase proliferativa presents a la zona del tall després de 24h en cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) pre-tractats o no amb TGF- β 1	74
Figura 31.	Percentatge de miofibroblastes sobre el total de cèl·lules proliferatives presents a la zona del tall de cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) pre-tractats o no amb TGF- β 1.....	75
Figura 32.	Immunofluorescència de cèl·lules en proliferació i miofibroblastes de cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) presents a la zona del tall després de 24h	76
Figura 33.	Imatges representatives de la inhibició de la proliferació per Mitomicina C de les cèl·lules presents després de 24h al tall realitzat al cultiu <i>in vitro</i>	77
Figura 34.	Percentatge de miofibroblastes a la zona d'un tall realitzat <i>in vitro</i> en presència o absència de Mitomicina C en cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI).....	78
Figura 35.	Imatges representatives de camp clar del tancament d'una ferida <i>in vitro</i> realitzada en un cultiu de fibroblastes.....	79
Figura 36.	Àrea tancada per fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) en presència o absència de Mitomicina C a 24 i 48h.....	80
Figura 37.	Expressió de COX-2, COX-1 i α -SMA en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) de forma basal i induïda per interleuquina-1 β (IL-1 β)	81
Figura 38.	Expressió gènica de COX-2 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) de forma basal i induïda per interleuquina-1 β (IL-1 β).....	82
Figura 39.	Imatge representativa de co-immunofluorescència de COX-2 i α -SMA d'un cultiu de fibroblastes control en presència o absència d'interleuquina-1 β	83

Figura 40.	Efecte del tractament amb TGF- β 1 sobre l'expressió de COX-2 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) a 4, 24 i 72h.....	84
Figura 41.	Nivells proteics de COX-2, COX-1 i α -SMA en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) estimulats durant 4h amb IL-1 β i/o TGF- β 1.....	85
Figura 42.	Efecte de l'estimulació amb interleuquina-1 β (IL-1 β) sobre l'expressió de COX-2, COX-1 i α -SMA en una població enriquida de miofibroblastes	86
Figura 43.	Expressió de COX-1 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) tractats amb TGF- β 1.....	87
Figura 44.	Absència d'expressió de COX-2 en cèl·lules control estimulades durant 72 h amb TGF- β 1, seguides d'una nova incubació amb TGF- β 1 durant 4 o 24h	88
Figura 45.	Efecte de l'estimulació amb interleuquina-1 β (IL-1 β) sobre l'expressió de COX-2 en una població enriquida de miofibroblastes.....	88
Figura 46.	Imatge representativa de co-immunofluorescència de COX-2 i α -SMA d'un cultiu control enriquit en miofibroblastes estimulat amb interleuquina-1 β (IL-1 β)	90
Figura 47.	Mesura de la secreció de PGE ₂ després de la inducció de la transició fibroblast-miofibroblast induïda per TGF- β 1 en cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI).....	91
Figura 48.	Proliferació cel·lular mesurada mitjançant l'anàlisi de la replicació del DNA en cultius de fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI).....	92
Figura 49.	Efecte del tractament durant 24h amb IL-1 β o PGE ₂ sobre el tancament d'una ferida <i>in vitro</i> en cultius de fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI).....	93
Figura 50.	Efecte del tractament durant 48h amb IL-1 β o PGE ₂ sobre el tancament d'una ferida <i>in vitro</i> en cultius de fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI).....	94
Figura 51.	Detecció immunohistoquímica de COX-2 i α -SMA en teixit pulmonar control i en teixit de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI)	95
Figura 52.	Expressió d'E-cadherina en cèl·lules epitelials alveolars A549 tractades amb TGF- β 1.....	96

Figura 53.	Increment de l'expressió gènica de col·lagen $\alpha 1$ en cèl·lules epitelials alveolars A549 tractades amb TGF- $\beta 1$97
Figura 54.	Imatge representativa d'immunocitoquímica de F-actina de les cèl·lules epitelials alveolars A549 en presència o absència de TGF- $\beta 1$97
Figura 55.	Efecte del tractament amb interleuquina- 1β (IL- 1β) sobre l'expressió de COX-2 en cèl·lules epitelials alveolars A549 després de ser induïda la transició epiteli-mesenquimal (EMT) per TGF- $\beta 1$98
Figura 56.	Immunofluorescència de COX-2 i F-actina en cèl·lules epitelials alveolars A549 en presència o absència de TGF- $\beta 1$ i en presència d'interleuquina- 1β (IL- 1β)99
Figura 57.	Mesura de la secreció de PGE ₂ després de la inducció de la transició epiteli-mesenquimal en cèl·lules epitelials alveolars A549 100
Figura 58.	Prolifерació de la línia cel·lular alveolar epitel·lial A549 mesurada mitjançant l'anàlisi de la replicació del DNA 101
Figura 59.	Expressió basal del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI)..... 102
Figura 60.	Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) estimulats amb IL- 1β 103
Figura 61.	Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI)..... 104
Figura 62.	Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) estimulats amb IL- 1β 105
Figura 63.	Immunofluorescència de l'expressió de receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) basalment i en presència o absència d'IL- 1β o TGF- $\beta 1$ 106
Figura 64.	Imatges representatives de co-immunofluorescència de l'expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) i α -SMA en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI)..... 107
Figura 65.	Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) i de COX-2 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) tractats amb IL- 1β 108
Figura 66.	Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en llisats proteics de teixit control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) 108

Figura 67.	Detecció immunohistoquímica de IL-1RI, α -SMA i vimentina en teixit pulmonar control i en teixit de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI).....	109
Figura 68.	Expressió basal del receptor 2 d'interleuquina-1 (IL-1RII) en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI).....	110
Figura 69.	Expressió del receptor 2 d'interleuquina-1 (IL-1RII) en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) estimulats amb IL-1 β	111
Figura 70.	Expressió del receptor 2 d'interleuquina-1 (IL-1RII) en miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI).....	111
Figura 71.	Expressió basal de la proteïna accessòria del receptor d'interleuquina-1 (IL-1RAcP) en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI)	112
Figura 72.	Expressió de la proteïna accessòria del receptor d'interleuquina-1 (IL-1RAcP) en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) estimulats amb IL-1 β	113
Figura 73.	Expressió de la proteïna accessòria del receptor d'interleuquina-1 (IL-1RAcP) en miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI)...	113
Figura 74.	Efecte de la IL-1 β i del TGF- β 1 sobre l'expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en cèl·lules epitelials alveolars A549	114
Figura 75.	Efecte de la IL-1 β sobre l'expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en cèl·lules epitelials alveolars A549 després de ser induïda la EMT per TGF- β 1	115

ÍNDEX DE TAULES

Taula 1.	Descripció de les recomanacions pel tractament farmacològic de la fibrosi pulmonar idiopàtica.....	10
Taula 2.	Propietats pro-fibròtiques dels leucotriens i antifibròtiques de les prostaglandines descrites en diversos tipus cel·lulars.....	20
Taula 3.	Anticossos utilitzats en la tècnica de <i>western blot</i>	51
Taula 4.	Cocktail de la reacció de Click-iT®	53
Taula 5.	Cocktail dels components utilitzats per la retrotranscripció.....	57
Taula 6.	Quantificació de la immunofluorescència de COX-2, α -SMA i de manera conjunta COX-2 i α -SMA en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI)	83
Taula 7.	Quantificació de la immunofluorescència de COX-2, α -SMA i de manera conjunta COX-2 i α -SMA en fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI).....	89

ABREVIATURES

- AA àcid araquidònic
- AChE acetilcolinesterasa
- AINEs anti-inflamatoris no-esteroïdals
- AMPc monofosfat d'adenosina cíclic
- ANG II angiotensina II
- α -SMA alfa-actina del múscul llis
- β -gal β -galactosidasa
- BSA albúmina sèrica bovina
- CCL2 proteïna quimioattractant de monòcits
- cDNA DNA complementari
- COL1A1 col·lagen tipus 1 alfa 1
- COL3A1 col·lagen tipus 3 alfa 1
- COX ciclooxigenasa
- CysLTs cisteïnil leucotriens
- DAB diaminobencidina
- DAPI 4',6-diamino-2-fenilindol
- ddH₂O aigua doblement destil·lada
- DMEM *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMSO dimetil sulfòxid
- DTT ditiotreitòl
- ECL *enhanced chemiluminiscent substrate*
- EDTA àcid etilendiaminotetraacètic
- EdU 5-etinil-2'-deoxiuridina
- EMEM *Eagle's Minimal Essential Media*
- EMT transició epiteli-mesenquimal
- EP receptors de prostaglandina E2
- ET-1 endotelina-1
- FasL l·ligand de Fas
- FBS sèrum fetal boví
- FGF factor de creixement de fibroblastes

- FMT transició fibroblast-miofibroblast
- FPI fibrosi pulmonar idiopàtica
- FRET transferència d'energia de ressonància de fluorescència
- FT factor tissular
- FVC capacitat vital forçada
- GM-CSF factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags
- GSH glutatió reduït
- H₂O₂ peròxid d'hidrogen
- IFN-γ interferó-gamma
- Ig immunoglobulina
- IκB inhibidor de kappa B
- IκK quinasa I kappa B
- IL interleuquina
- IL-1R receptor d'interleuquina-1
- IL-1RI receptor d'interleuquina-1 tipus 1
- IL-1RII receptor d'interleuquina-1 tipus 2
- IL-1Ra antagonista del receptor d'interleuquina-1
- IL-1RAcP proteïna accessòria al receptor d'interleuquina-1
- IRAK quinasa associada al receptor-1 d'interleuquina
- kDa kilodaltons
- LDH lactat deshidrogenasa
- 5-LO 5-lipoxigenasa
- LRR *leucine-rich repeat domain*
- LTs leucotriens
- Mit C mitomicina C
- MMP enzims metaloproteïnases
- MPID malaltia pulmonar intersticial difusa
- MUC5B mucina 5B
- MyD88 factor de diferenciació mieloide 88
- NAC N-Acetilcisteïna
- NF-κB factor nuclear kappa B
- NIU pneumònia intersticial usual
- PAI inhibidor dels activadors de plasminògen

- PARs receptors proteïnasa-activats
- PBS tampó fosfat salí
- qPCR reacció en cadena de la polimerasa quantitativa
- PDGF factor de creixement derivat de plaquetes
- PGs prostaglandines
- PLA2 fosfolipasa A2
- RBA rentat broncoalveolar
- ROS espècies reactives d'oxigen
- SDS dodecil-sulfat sòdic
- SNP polimorfisme de nucleòtid simple
- SOD superòxid dismutases
- TCAR tomografia axial computeritzada d'alta resolució
- TGF- β 1 factor de transformació de creixement beta 1
- TIMP inhibidors de metaloproteïnases
- TIR *Toll-Interleukin-1 receptors*
- TLR *Toll-like receptors*
- TNF- α factor de necrosi tumoral alfa
- TRAF6 factor associat al receptor de TNF 6

I – INTRODUCCIÓ

1. FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA

L'any 2000 va ser publicat el consens sobre fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) establert per l'American Thoracic Society i l'European Respiratory Society (ATS/ERS), establint els criteris de diagnòstic i tractament de la FPI (American Thoracic Society; European Respiratory Society, 2002). Aquests criteris van ser revisats i redefinits durant l'any 2011 (Raghu *et al.*, 2011) i 2013 (Travis *et al.*, 2013).

La FPI es defineix com a una pneumònia intersticial fibrosant crònica, limitada al pulmó, de causa desconeguda, que afecta generalment a adults majors de 50 anys, i està associada al patró radiològic i/o histològic de pneumònia intersticial usual (NIU) (Raghu *et al.*, 2011). La definició de FPI requereix la exclusió d'altres formes de pneumònia intersticial idiopàtica i altres malalties pulmonars intersticials associades a factors coneguts.

1.1 Malalties pulmonars intersticials difuses (MPID)

Les malalties pulmonars intersticials difuses són un grup de malalties molt heterogeni que es caracteritzen per l'afectació de l'interstici pulmonar. Les MPID es classifiquen en tres grups (Figura 1):

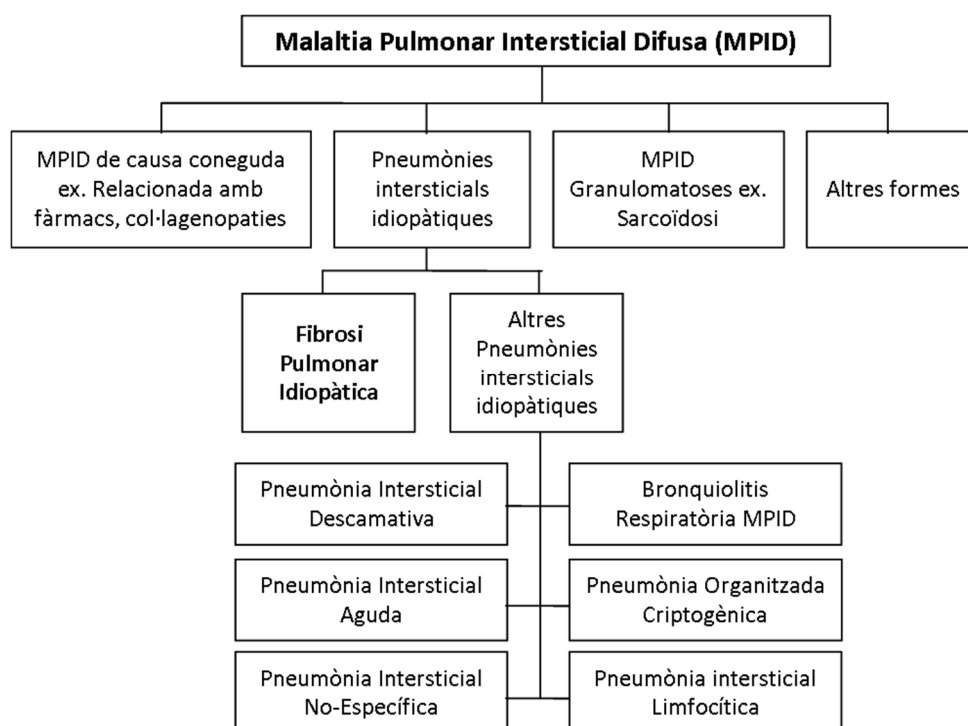


Figura 1.- Classificació de les malalties pulmonars intersticials difuses segons l'ATS/ERS

- De causa coneguda o associades, incloent patologies induïdes per fàrmacs o radioteràpia, col·lagenopaties, pneumoconiosi causada per pols inorgànic o alveolitis al·lèrgica extrínseca, pneumonitis per hipersensibilitat.
- Associades a processos no ben definits, incloent malalties granulomatoses com la sarcoïdosi, histiocitosi, proteïnosi alveolar, eosinofílies, microlitiasis, amiloïdosis i altres.
- Idiopàtiques: són el grup més prevalent, i dins d'aquest grup aproximadament el 80% dels casos corresponen a fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI).

1.2 Incidència i prevalença

S'estima que la incidència de la FPI varia entre 4,6-7,4/100.000 habitants i la prevalença es situa entre 13/100.000 habitants en dones i 20/100.000 habitants en homes. Es calcula que a Espanya pot estar afectant a unes 7.500 persones (Xaubet *et al.*, 2013). Actualment, però, es desconeix si la incidència i la prevalença estan influenciades per factors ètnics, racials o geogràfics. En els darrers anys, s'ha observat un augment de la prevalença, probablement degut a la millora dels mètodes de diagnòstic i a l'increment de l'esperança de vida (Raghu *et al.*, 2006; King *et al.*, 2011).

1.3 Història natural

Des del moment del diagnòstic, l'evolució de la FPI és variable i impredecible (Figura 2). La majoria de pacients presenten una progressió lenta amb deteriorament clínic i funcional que finalment ocasiona insuficiència respiratòria crònica. En altres casos, es combinen períodes de relativa estabilitat amb episodis d'aguditzacions i complicacions que són causa d'alta mortalitat. En una minoria dels pacients, la malaltia té una progressió més ràpida, sent de molt curta durada. La supervivència mitjana és de 2 a 5 anys des del moment de diagnòstic o de d'aparició dels símptomes (Xaubet *et al.*, 2013).

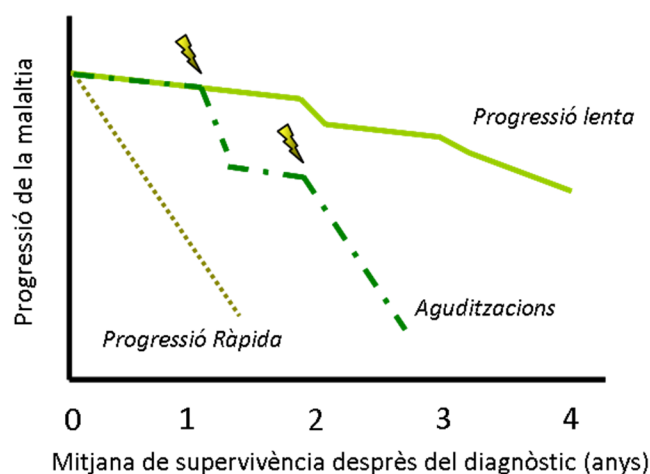


Figura 2.- Història natural de la fibrosi pulmonar idiopàtica

1.4 Factors de risc potencials

L'etiologia de la FPI no es coneix, tot i que existeixen diversos factors considerats de risc pel desenvolupament de la malaltia.

- **Factors genètics:**
 - **Fibrosi pulmonar esporàdica:** les alteracions genètiques amb més rellevància clínica són mutacions en els gens que mantenen la longitud dels telòmers (TERT, TERC) (Liu *et al.*, 2013), en la proteïna C del surfactant i en la regió promotora de la mucina 5B (MUC5B) (McNeal *et al.*, 2012). No existeix cap prova genètica establerta per valorar la predisposició a patir FPI. Estudis recents indiquen que hi ha nombrosos gens implicats en la susceptibilitat a patir la malaltia (Fingerlin *et al.*, 2013).
 - **Fibrosi pulmonar familiar:** es coneix com a FPI familiar quan afecta a dos o més membres de la mateixa família. Menys d'un 5% del total de casos de FPI són familiars. S'han trobat diversos gens candidats a estar associats a aquestes formes de fibrosi, entre ells mutacions en la proteïna C del surfactant. Aquestes mutacions però, no s'ha trobat a les formes esporàdiques de FPI, molt més freqüents (Steele *et al.*, 2005).
- **Factors ambientals:** El tabaquisme (>20 paquets/any) i l'exposició al sílice, al llautó, a l'acer, al plom i a la pols de la fusta, les activitats laborals en ramaderia i agricultura i la construcció de cases de fusta són considerats factors de risc (McNeal *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2008; Taskar *et al.*, 2006).
- **Reflux gastroesofàgic:** Diversos estudis indiquen que el reflux gastroesofàgic podria ser un factor de risc per la predisposició i la progressió de la FPI (Lee *et al.*, 2011).
- **Infeccions víriques:** No existeix evidència suficient per a considerar que les infeccions víriques (virus de l'hepatitis C, herpes virus, citomegalovirus) siguin factors etiològics de la FPI, encara que la seva contribució continua sent estudiada.

1.5 Diagnòstic

El diagnòstic definitiu de FPI requereix en primer lloc l'exclusió d'altres patologies pulmonars intersticials difuses de causa coneguda. També és necessària la presència d'un patró histològic característic de pneumònia intersticial usual (NIU) observat en teixit pulmonar obtingut mitjançant biòpsia pulmonar quirúrgica, evidència radiològica obtinguda per tomografia axial computeritzada d'alta resolució (TCAR) o ambdues.

Una valoració multidisciplinària en la que participin pneumòlegs, radiòlegs i patòlegs experts en el diagnòstic i maneig de les MPID aconsegueix augmentar la precisió diagnòstica i en l'actualitat és una recomanació àmpliament acceptada per establir el diagnòstic (Raghu *et al.*, 2011).

El quadre clínic de la FPI acostuma a estar caracteritzat per dificultat respiratòria d'esforç progressiva, sovint acompanyada de tos improductiva. L'inici de la simptomatologia és lent i la

tardança entre l'aparició dels primers símptomes i el diagnòstic és variable (entre 6 mesos i 2 anys)(Kim *et al.*, 2006). Es desconeix el moment exacte d'inici de la patologia. Existeix un interès creixent en trobar biomarcadors pel diagnòstic i caracterització de la malaltia, degut a que actualment no es disposa de cap prova específica.

▪ **Rentat broncoalveolar**

El rentat broncoalveolar (RBA) consisteix en la introducció i posterior aspiració de solució salina en els espais alveolars. El RBA en FPI mostra una neutrofília discreta amb o sense eosinofília i s'ha utilitzat de manera clàssica per descartar altres patologies pulmonars.

▪ **Biòpsia transbronquial**

Aquesta biòpsia resulta útil en malalties que presenten trets diagnòstics característics i que tenen una distribució difusa. Aquest tipus de biòpsia pot no resultar útil pel diagnòstic de FPI ja que no és possible observar la distribució de la lesió degut a la petita mida de la mostra obtinguda. La varietat de biòpsia transbronquial amb criosonda o criobiòpsia és una tècnica molt prometedora però es requereixen més estudis per corroborar la seva utilitat en les MPID (Babiak *et al.*, 2009; Casoni *et al.*, 2014).

▪ **Tomografia computeritzada d'alta resolució (TCAR)**

La TCAR és la tècnica indiscutible en el diagnòstic de la FPI ja que el seu valor predictiu positiu en el diagnòstic de la NIU es del 90 al 100%. L'objectiu és identificar troballes típiques del patró de NIU (Figura 3) i distingir-los dels patrons menys específics presents en altres pneumònies intersticials idiopàtiques. El consens oficial ATS/ERS/JRS/ALAT de l'any 2011 estableix que en la TCAR, el diagnòstic de NIU es basa en la identificació de quatre característiques típiques:

- 1) afectació pulmonar predominantment basal i de localització subpleural.
- 2) presència d'alteracions reticulars evidents.
- 3) presència de panalització subpleural formada per grups de cists.
- 4) demostrar que hi ha absència de característiques excloents d'un patró de NIU i que per tant, suggereixin un diagnòstic alternatiu. La presència de vidre desllustrat ha de ser mínima o inexistent.

La panalització és un criteri imprescindible pel diagnòstic de NIU amb certesa. Quan no hi ha panalització visible, s'haurà de realitzar el diagnòstic definitiu per biòpsia. Així doncs, la biòpsia pulmonar podrà evitar-se únicament quan la TCAR mostri un patró de certesa típic de NIU.

Alhora, la TCAR permet valorar la presència de comorbilitats associades com enfisema, hipertensió pulmonar o càncer de pulmó que poden condicionar el curs de la malaltia.

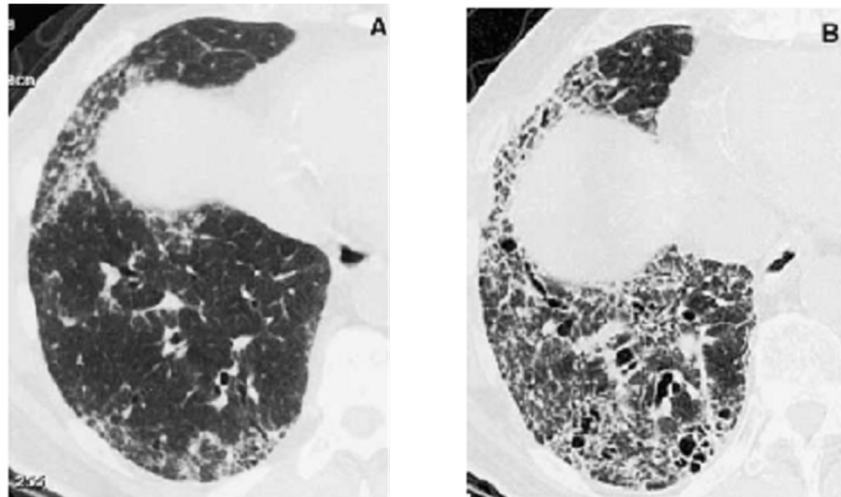


Figura 3.- Imatges de TCAR obtingudes amb una separació de 20 mesos on s'observa la progressió de la panalització en la fibrosi pulmonar idiopàtica.

▪ **Biòpsia pulmonar quirúrgica: patró histopatològic**

En cas de que el TCAR no sigui concloent, el diagnòstic definitiu s'haurà de realitzar per biòpsia pulmonar quirúrgica, idealment de més d'un lòbul pulmonar, degut a distribució irregular característica de la patologia (Figures 4 i 5).

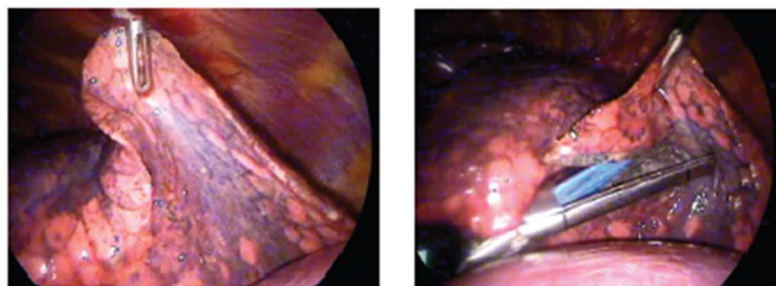


Figura 4.- Obtenció d'una mostra de teixit pulmonar fibròtic mitjançant una biòpsia pulmonar quirúrgica videotoracoscòpica. Es talla i segella alhora el parènquima pulmonar utilitzant una endograpadora mecànica.

El patró histològic de NIU està definit per quatre criteris:

- 1) Evidència de fibrosi marcada o distorsió de l'arquitectura pulmonar.
- 2) Presència de lesions en zones diferents, on es combinen zones fibròtiques amb àrees de pulmó sa.
- 3) Presència de focus fibroblàstics en àrees d'interfase de fibrosi amb parènquima sa.

4) Absència de troballes inconsistentes amb una NIU (membranes hialines, focus amb pneumònia organitzativa, granulomes, infiltrat inflamatori intersticial marcat allunyat de les zones de panalització, entre d'altres característiques que suggereixin un diagnòstic alternatiu).

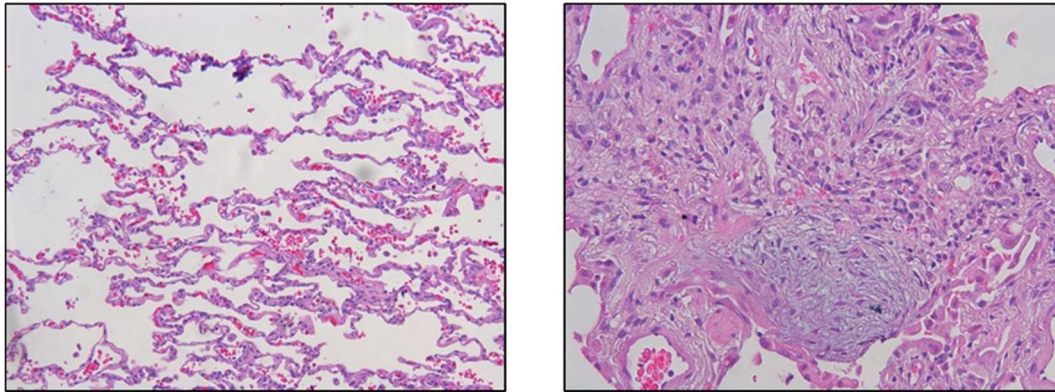


Figura 5.- Arquitectura histològica del pulmó humà sa (esquerra) comparat amb el patró histològic de pneumònia intersticial usual (dreta). A la imatge histològica de teixit amb FPI es pot observar el col·lapse alveolar i la presència d'un focus fibroblàstic.

Un comitè d'experts ha d'avaluar les proves fisiològiques, radiològiques i histològiques per determinar un diagnòstic en consens interdisciplinari. La presència d'abundants focus fibroblàstics està associada a un pitjor pronòstic i es correlaciona amb un increment de la mortalitat en FPI (Nicholson *et al.*, 2002).

1.6 Complicacions i comorbiditats

Els pacients amb FPI poden desenvolupar complicacions que modifiquin el curs de la malaltia i el seu pronòstic. Sovint es tracta de patologies associades amb l'edat. En alguns casos es produeixen exacerbacions agudes, amb un deteriorament ràpid de la malaltia en absència de cap causa identificable, arribant a una mortalitat de 60-70% en 3-6 mesos. La hipertensió pulmonar i l'emfisema pulmonar sovint apareixen units a FPI, empitjorant la qualitat de vida i incrementant la mortalitat. S'ha documentat una alta prevalença de reflux gastroesofàgic en pacients amb FPI, asimptomàtic en la majoria. Finalment, existeix un risc superior de desenvolupar carcinoma broncogènic en pacients amb FPI, associat al tabaquisme i a certes mutacions (Xaubet *et al.*, 2013).

1.7 Tractament

▪ Tractament farmacològic

S'ha demostrat que els glucocorticoides utilitzats com a pauta terapèutica fins a l'actualitat, no tenen cap eficàcia com a tractament de la FPI, ja que no són capaços d'aturar la progressió de la malaltia ni de millorar la supervivència dels pacients. De manera alternativa, s'han dut a terme nombrosos estudis amb fàrmacs coneguts com "anti-fibròtics", és a dir, aquells que han estat capaços d'inhibir els processos fibròtics *in vitro*. Fins al moment, però, cap d'aquests agents terapèutics que han funcionat *in vitro* ha donat resultats significatius en els assajos clínics en pacients amb FPI (Taula 1). Només la pirfenidona ha obtingut resultats positius i actualment és l'únic fàrmac moderadament recomanat en pacients seleccionats (Datta *et al.*, 2011; Albera *et al.*, 2013).

En l'actualitat, els esforços estan dirigits a entendre millor els mecanismes involucrats en la patogènesi de la FPI, fet necessari per dissenyar assajos clínics basats en fàrmacs que puguin ser efectius en detenir la progressió de la malaltia i idealment de revertir el procés. Una de les principals dificultats que es presenta a l'hora de trobar tractaments efectius, és la heterogeneïtat de la malaltia, la variabilitat individual entre pacients i el llarg temps entre l'inici de la patologia i el diagnòstic.

- **N-Acetilcisteïna:** La N-Acetilcisteïna (NAC) és un fàrmac amb propietats antioxidants, ja que augmenta la síntesi de glutatió. S'ha mostrat eficaç disminuint la resposta fibròtica en models animals de fibrosi pulmonar (Mata *et al.*, 2003; Serrano-Mollar *et al.*, 2003). En els resultats obtinguts d'assajos clínics, el tractament amb NAC en combinació amb altres fàrmacs ha reduït la velocitat en el deteriorament de la capacitat vital forçada (FVC) de pacients amb FPI. Els resultats de l'estudi PANTHER s'espera per determinar la seva efectivitat com a monoteràpia en el tractament de la FPI.
- **Pirfenidona:** La pirfenidona és un fàrmac amb propietats antiinflamatòries, antioxidants i antifibròtiques en models de fibrosi pulmonar. Inhibeix la proliferació fibroblàstica i la síntesi de proteïnes pro-fibrogèniques i citoquines (Jones *et al.*, 2013). La seva eficàcia clínica s'ha provat en tres assajos clínics, que mostren que la pirfenidona redueix la progressió de la malaltia en un 30% i millora els seus símptomes (Taniguchi *et al.*, 2010). Actualment, és l'únic fàrmac amb eficàcia contrastada en el tractament de la FPI. A l'any 2011 va ser aprovada a Europa pel tractament de la FPI d'intensitat lleu-moderada.

Taula 1.- Descripció de les recomanacions pel tractament farmacològic de la fibrosi pulmonar idiopàtica.

Agent	Mecanisme d'acció	Recomanacions
Recomanat en pacients seleccionats		
Pirfenidona	Antifibròtic + Antiinflamatori + Antioxidant + anti-TGF-β1	Sí, recomanació moderada*
NAC en monoteràpia	Antioxidant	No, recomanació dèbil
No recomanats		
Esteroides + Azatioprina + NAC	Immunosupressor + Antioxidant + Antiinflamatori	No utilitzar
Anticoagulació	Anticoagulant	No utilitzar
Bosentan	Antagonisme dual del receptor de la endotelina	No utilitzar
Esteroides en monoteràpia	Immunosupressor	No utilitzar
Esteroides + teràpia immunomoduladora	Immunosupressor	No utilitzar
Colchicina	Inhibidor de proliferació i síntesi de col·lagen	No utilitzar
Ciclosporina A	Immunosupressor	No utilitzar
Etanercept	Anti TNF-alfa	No utilitzar
Interferó gamma	Antifibròtic i immunomodulador	No utilitzar

* en pacients amb FPI lleu-moderada

▪ Tractament no farmacològic

En l'actualitat el trasplantament pulmonar és l'únic tractament en que ocasiona una important millora funcional i un increment de la supervivència a 1, 5 i 10 anys del 74%, 45% y 22% respectivament (George *et al.*, 2011). Degut a factors com l'edat o les comorbiditats presents en pacients amb FPI fan que sovint no puguin ser candidats a un transplament de pulmó.

Una de les estratègies que està en fase d'estudi experimental com a tractament per FPI és la teràpia cel·lular. S'han realitzat estudis amb cèl·lules mare mesenquimals i amb cèl·lules epitelials alveolars tipus II amb l'objectiu de regenerar l'epiteli alveolar danyat durant la fibrosi.

S'ha observat que les cèl·lules mare mesenquimals són capaces d'adoptar un fenotip epitelial alveolar però també poden diferenciar-se a fibroblastes, empitjorant el procés fibròtic. Aquest fet planteja dubtes sobre la possibilitat d'utilitzar-les com a teràpia per la FPI (McNulty *et al.*, 2012).

L'administració de cèl·lules epitelials alveolars tipus II ha aconseguit detenir i revertir el procés fibròtic en un model de ratolins amb fibrosi induïda per bleomicina. Els assajos clínics determinaran si l'administració de cèl·lules tipus II és una teràpia vàlida en humans (Serrano-Mollar *et al.*, 2007).

2. PATOGENIA I FISIOPATOLOGIA DE LA FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA

L'alvèol és la unitat funcional del pulmó on es realitza l'intercanvi de gasos entre la circulació sanguínia i l'aire atmosfèric. L'epiteli alveolar està compost per cèl·lules epitelials tipus I (pneumòcits tipus I) i tipus II (pneumòcits tipus II). La membrana basal subepitelial separa aquest espai de l'interstici alveolar, que es troba entre l'endoteli capil·lar pulmonar i l'epiteli alveolar i està format essencialment per matriu extracel·lular i fibroblastes. A l'espai alveolar també es troben els macròfags alveolars.

Les cèl·lules epitelials tipus I cobreixen aproximadament el 96% de la superfície de l'epiteli pulmonar i són les encarregades de realitzar l'intercanvi de gasos. Aquestes cèl·lules no són capaces de dividir-se. Les cèl·lules epitelials tipus II, tot i que cobreixen menys superfície alveolar, són més nombroses i tenen diverses funcions. Una d'aquestes és produir surfactant, que és emmagatzemat als orgànuls anomenats cossos lamel·lars. La funció principal del surfactant és recobrir la superfície alveolar per evitar que es col·lapsi l'alveol durant el procés d'intercanvi de gasos. Alhora, les cèl·lules epitelials tipus II són les progenitores de les cèl·lules tipus I i per tant, serien les responsables de la reepitelització de l'alveol en cas de danys a l'epiteli (Serrano-Mollar, 2012).

Inicialment, al voltant de la dècada dels 80, es creia que en la fibrosi pulmonar idiopàtica es donava una resposta inflamatòria exagerada i descontrolada, on les cèl·lules inflamatòries eren les principals efectores. Aquesta idea va portar a la creença de que era possible prevenir la fibrosi inhibint la resposta inflamatòria. Degut a la falta d'efectivitat dels tractaments anti-inflamatoris i a l'absència de lesions inflamatòries en pacients amb FPI aquesta visió ha perdut importància en l'actualitat (Selman *et al.*, 2001).

El model animals de fibrosi pulmonar més utilitzat es basa en la instil·lació de bleomicina en ratolins. Aquest model no reflecteix de manera fiable la resposta clínica a noves teràpies (Jenkins *et al.*, 2011) degut a que la instil·lació intratraqueal de bleomicina resulta en una resposta inflamatòria inicial més pròxima a una lesió pulmonar aguda que a la FPI. Durant la segona setmana post-bleomicina, es produeix una transició de la fase inflamatòria a la fase fibròtica. El grau de fibrosi en resposta a bleomicina és directament depenent de la quantitat de resposta inflamatòria inicial (Scotton *et al.*, 2010). Aquest factor, conjuntament amb el fet de que la fibrosi induïda per bleomicina és reversible (Degryse *et al.*, 2010) diferencia el model de la patologia en humans.

Actualment, els mecanismes patogenètics precisos de la FPI són desconeguts, però la hipòtesi fisiopatològica més acceptada és que el desenvolupament de la fibrosi està relacionat amb una resposta epiteli-mesenquimal aberrant davant d'una lesió epitelial alveolar reiterada (Figura 6). En circumstàncies normals, el diàleg entre les cèl·lules epitelials i mesenquimals és la base per a la resposta del teixit davant d'una lesió, tancant la ferida formada i recuperant l'arquitectura del teixit pulmonar normal amb una pèrdua de funció mínima (Scotton *et al.*, 2010). En canvi, al procés fibròtic es produeix una apoptosi massiva de les cèl·lules epitelials alveolars

i la disrupció de la membrana basal, amb la conseqüent alliberació de factors solubles profibròtics.

El desequilibri entre factors solubles pro-fibròtics i anti-fibròtics activa el procés de proliferació de fibroblasts intersticials, la transformació de cèl·lules epitelials, fibroblastes i fibròcits a miofibroblastes amb la formació de focus fibroblàstics característics de la patologia. Aquesta resposta cel·lular fibròtica té com a conseqüència la deposició excessiva de col·lagen i matriu extracel·lular (Maher *et al.*, 2007). Aquesta situació de desequilibri epiteli-mesenquimal es cronifica donant lloc a un procés de reparació del teixit permanent, arribant al col·lapse alveolar per causa de la fibrosi (Selman *et al.*, 2014).

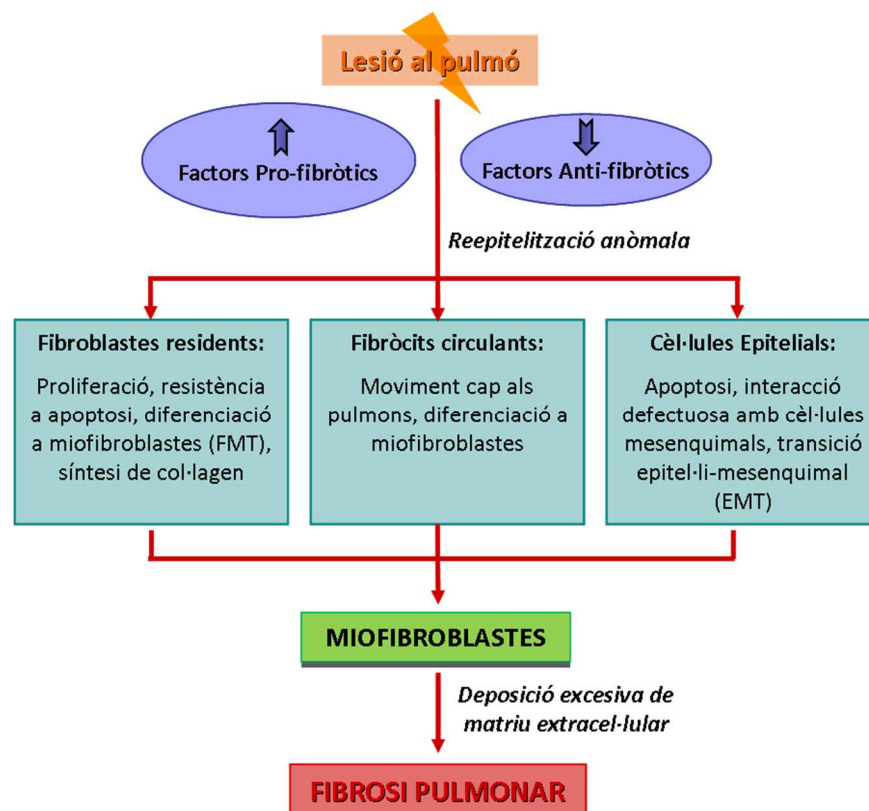


Figura 6.- Esquema de la hipòtesi fisiopatològica del desenvolupament de la fibrosi pulmonar idiopàtica. Una lesió reiterada provoca una destrucció de les cèl·lules epitelials alveolars, seguida per l'alliberació de factors solubles amb propietats pro-fibròtiques que estimulen un excés d'apoptosi epitelial i una re-epitelització anormal. Dins d'aquests mediadors, destaca especialment el TGF- β 1, que indueix l'activació, migració i proliferació de fibroblastes i la diferenciació a miofibroblastes. Aquests sintetitzen grans quantitats de matriu extracel·lular, especialment col·làgens, provocant la deposició progressiva i l'acumulació de matriu extracel·lular. Les cèl·lules epitelials podrien ser una font de miofibroblastes, a través de la transició epiteli-mesenquimal (EMT). Els fibròcits circulants també podrien participar al procés d'acumulació de miofibroblastes al pulmó i a l'acumulació de matriu, promovent així el desenvolupament de la fibrosi.

2.1 Balanç de factors solubles

Es coneix que durant el procés fibròtic, hi ha un desequilibri de factors solubles que afavoreix aquells amb propietats pro-fibròtiques enfront dels que posseeixen propietats anti-fibròtiques. S'han identificat múltiples mediadors i factors de creixement implicats en la patogènia de la malaltia. Entre ells, destaca el paper pro-fibrogènic del factor de transformació de creixement beta 1 (TGF- β 1) (Broekelmann *et al.*, 1991). Altres factors profibròtics han estat implicats en la FPI, com la angiotensina II (ANG II) (Uhal *et al.*, 2007) o la endotelina-1 (ET-1) (Ross *et al.*, 2010).

Alhora, s'ha descrit una disminució de mediadors anti-fibròtics, però la llista d'aquests mediadors és molt més curta. Cal destacar la prostaglandina E2 (PGE₂), una molècula procedent del metabolisme de l'àcid araquidònic amb nombroses propietats antifibrogèniques. De fet, la fibrosi pulmonar idiopàtica es caracteritza per una severa alteració del metabolisme de l'àcid araquidònic (Huang *et al.*, 2008a; Xaubet *et al.*, 2004b).

▪ TGF- β 1

El TGF- β 1 es considera el principal factor pro-fibròtic, ja que està implicat en nombrosos processos fibròtics. Entre ells, actua com inductor de la transformació fibroblast-miofibroblast i de l'increment de la deposició de col·lagen durant la fibrosi. A més a més, té un paper rellevant en la reparació i la formació d'una cicatriu després d'una lesió a l'epiteli i induïx la transformació epiteli-mesenquimal de les cèl·lules alveolars epitelials *in vivo* (Willis *et al.*, 2006; Willis *et al.*, 2007). Hi ha tres isoformes de TGF- β en mamífers: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, que són secretades en la forma latent pro-TGF- β i formen un complex amb altres proteïnes, mantenint-se emmagatzemat per ser alliberat ràpidament en cas d'activació. En la FPI, s'ha descrit una expressió de TGF- β incrementada per part de les cèl·lules epitelials i dels macròfags alveolars (Khalil *et al.*, 1991; Khalil *et al.*, 1996).

2.2 Altres mecanismes patogènics a la fibrosi pulmonar idiopàtica

2.2.1 Paper de les molècules de superfície cel·lular

▪ CD40-CD40L:

El ligand de CD40 (CD40L) i CD40 són membres de la família de citocines i receptors del factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α), respectivament. S'ha descrit que s'expressen a fibroblastes de pulmó i podrien modular la seva capacitat proliferativa.

▪ Integrines:

Les integrines són molècules transmembrana que es troben a la superfície cel·lular i regulen l'adhesió entre cèl·lules o entre la cèl·lula i la matriu extracel·lular, i també tenen un paper en la regulació de la migració, creixement i supervivència cel·lular.

En la patogènesi de la FPI s'han descrit diverses funcions de les integrines. Les integrines $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$ i $\alpha\beta 8$ poden activar el TGF- $\beta 1$ latent. Concretament, la integrina $\alpha\beta 5$, activa el TGF- $\beta 1$ a través de la contracció dels miofibroblastes, procés que seria revertit per la presència de la glicoproteïna antifibròtica Thy-1 (Zhou *et al.*, 2010). La integrina $\alpha\beta 6$ està sobreexpressada a l'epiteli alveolar de pacients amb FPI i la integrina $\alpha\beta 8$ s'expressa a cèl·lules epitelials i fibroblastes.

2.2.2 Estrès oxidatiu

L'estrès oxidatiu té lloc quan es produeix un desequilibri entre la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i la capacitat d'eliminar-les per part dels mecanismes antioxidants. Les ROS causen la degradació dels components de la cèl·lula i poden arribar a induir la mort cel·lular. Al pulmó, les ROS poden ser produïdes per diversos mecanismes, ja que és un òrgan en constant contacte amb l'oxigen. Per aquest motiu, s'han desenvolupat nombrosos mecanismes de defensa contra l'estrès oxidatiu, incloent la família de superòxid dismutases (SOD), la catalasa peroxidasa i el glutatió reduït (GSH), un dels principals antioxidants presents al pulmó.

En FPI, s'ha descrit que els fibroblastes produeixen nivells augmentats de ROS i globalment presenten nivells disminuïts de GSH (Bocchino *et al.*, 2010). En zones de focus fibroblàstics s'ha descrit absència de SOD i presència de NOX4 a les cèl·lules hiperplàsiques tipus II que envolten els focus. En conjunt, el pulmó fibròtic sembla presentar un desequilibri oxidatiu global en favor de l'oxidació i en contra dels mecanismes antioxidants.

El TGF- $\beta 1$ també té un paper en els mecanismes oxidatius del pulmó a través de la regulació de les ROS. S'ha demostrat que les ROS activen el TGF- $\beta 1$ latent i aquest al seu torn estimula la producció de ROS per part dels fibroblastes. A més a més, el TGF- $\beta 1$ disminueix els nivells de GSH en cèl·lules epitelials i fibroblastes i incrementa la producció de peròxid d'hidrogen (H_2O_2). El TGF- $\beta 1$ indueix l'expressió de NOX4, un enzim de la família d'enzims NADPH oxidasa, fet que podria estimular la transformació a miofibroblast a través de la producció de ROS (Hecker *et al.*, 2009).

En aquest àmbit, s'està utilitzant la N-acetilcisteïna (NAC) com a fàrmac en pacients amb FPI, ja que ha mostrat nombroses propietats antioxidants *in vitro*, tot i que en l'actualitat no ha demostrat efectes positius antifibròtics evidents.

2.2.3 Coagulació al pulmó fibròtic

Els mecanismes de coagulació són essencials en el procés de cicatrització en resposta a una ferida o dany tissular. S'ha descrit que existeixen alteracions en el balanç de mecanismes de coagulació en pulmons amb fibrosi pulmonar (Kotani *et al.*, 1995).

La coagulació sovint s'inicia a les zones on es produeix una lesió al teixit. El factor tissular (FT) és exposat a les serines proteïnases del plasma, unint-se al factor activat VIIa. Així s'inicia la via de coagulació extrínseca, amb l'activació del factor X a Xa, de trombina a protrombina i la

conversió de fibrinògen a fibrina, el principal component del trombe madur. El procés oposat a la coagulació és la fibrinòlisi, on la fibrina és degradada. Aquest procés s'inicia quan el plasminògen es converteix a plasmina pels activadors de plasminògen, l'activitat dels quals és regulada per la presència de inhibidors dels activadors de plasminògen (PAI). Alhora, la trombina i altres proteïnases activades de la cascada de coagulació s'uneixen a la família de receptors proteïnasa-activats (PARs). En conjunt, sembla que en el pulmó fibròtic existeix un desequilibri en favor de l'activitat anti-fibrinolítica (o pro-coagulant), que afavoriria un entorn pro-fibròtic, incrementant la proliferació dels fibroblastes, la síntesi de col·lagen i la transformació a miofibroblastes.

3. INFLAMACIÓ A LA FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA

Des de les primeres descripcions de pacients amb fibrosi pulmonar, la inflamació cel·lular al parènquima pulmonar és una troballa patològica constant, amb acumulació variable de limfòcits, macròfags, eosinòfils i neutròfils, i la presència de fol·licles limfoides s'ha observat en diversos pacients a l'interstici pulmonar (Todd *et al.*, 2012).

Durant els darrers 20 anys, el paper de la inflamació ha passat a un segon terme i es considera que la inflamació cel·lular activa al pulmó no és un requeriment important pel desenvolupament de la fibrosi pulmonar idiopàtica, en favor del paper de les cèl·lules epitelials, mesenquimals i la regulació anormal de la matriu extracel·lular. El principal argument a favor de la disminució de la importància de la inflamació en la FPI és l'absència d'efectivitat dels tractaments antiinflamatoris en la millora de la funció pulmonar i de la supervivència dels pacients amb FPI. Tot i així, nombrosos estudis han analitzat el paper de les cèl·lules inflamatòries, citoquines, quimioquines i molècules de la superfície cel·lular en la FPI.

Nombrosos estudis han descrit fàrmacs amb propietats antifibròtiques capaços d'aturar o fins i tot revertir el procés fibròtic en el model de bleomicina, però és necessari distingir entre aquells fàrmacs que interfereixen en la fase inflamatòria i resposta fibrogènica inicial d'aquells que eviten la progressió de la fibrosi. Per arribar a ser efectius en la patologia humana, els agents potencialment antifibròtics són aquells que haurien d'actuar en la fase fibròtica ja establerta i no en el període inicial d'inflamació induïda per bleomicina, ja que aquesta no es troba reflectida en la FPI en humans.

3.1 Paper de les cèl·lules inflamatòries en la fibrosi pulmonar idiopàtica

- **Limfòcits T:**

La majoria dels estudis realitzats sobre limfòcits T a la fibrosi pulmonar s'han realitzat a la fase inflamatòria inicial present al model animal de fibrosi pulmonar induït per bleomicina. En aquests casos, s'han estudiat animals sense limfòcits T i s'ha observat una conseqüent disminució en el desenvolupament fibròtic per bleomicina, menor proliferació de fibroblastes i deposició de col·lagen.

Podria existir un balanç en FPI entre subtipus de limfòcits T, amb un increment dels limfòcits T regulatoris amb característiques pro-fibròtiques a través de l'increment dels factors TGF- β 1 i PDGF (factor de creixement derivat de plaquetes). En pacients amb FPI, s'ha observat presència d'infiltració de cèl·lules T en teixit i en rentat broncoalveolar de manera freqüent. En conjunt, la contribució principal de les cèl·lules inflamatòries al procés fibròtic podria ser la producció de citoquines Th-1 i Th-2, a més d'interacció per molècules de superfície amb les cèl·lules epitelials i mesenquimals.

- **Limfòcits B:**

S'han descrit papers contradictoris dels limfòcits B en la fibrosi pulmonar. D'una banda, la sobreexpressió d'un marcador de cèl·lules B en el model de bleomicina en ratolí va tenir com a conseqüència un increment de la fibrosi i del contingut de col·lagen al pulmó. D'altra banda, els limfòcits B podrien tenir un paper protector anti-fibròtic a través de la síntesi de la citoquina antifibròtica interleuquina-9 (IL-9). El paper dels limfòcits B així com dels T podria dependre de l'entorn de factors solubles del pulmó, promovent o disminuint el procés fibròtic.

▪ **Macròfags:**

Els macròfags constitueixen la majoria de cèl·lules recuperades del rentat broncoalveolar d'individus normals (Reynolds *et al.* 2005) i s'ha postulat que tenen nombroses funcions en la patogènesi de la FPI, incloent sobreexpressió d'espècies reactives d'oxigen, de citoquines profibròtiques, receptors proteïnasa-activats o del ligand de Fas (FasL).

S'ha observat a diversos models animals i la majoria de pacients amb FPI que els macròfags presents a la fibrosi pulmonar presenten una activació alternativa, induïda per les citoquines Th2 interleuquina-4 (IL-4) i interleuquina-13 (IL-13), generant nivells superiors de quimioquines proinflamatòries.

3.2 La via de l'àcid araquidònic

Els icosanoides són un grup de mediadors lipídics derivats de l'àcid araquidònic (AA), un àcid gras de 20 carbonis. Després de l'alliberació de la bicapa lipídica de membrana cel·lular per l'acció de la fosfolipasa A2 (PLA2), l'àcid araquidònic és metabolitzat per la via de la 5-lipoxigenasa (5-LO) cap als leucotriens (LTs) o bé per la via de les ciclooxigenases (COX) 1 i 2 cap a les prostaglandines (PGs) (figura 7).

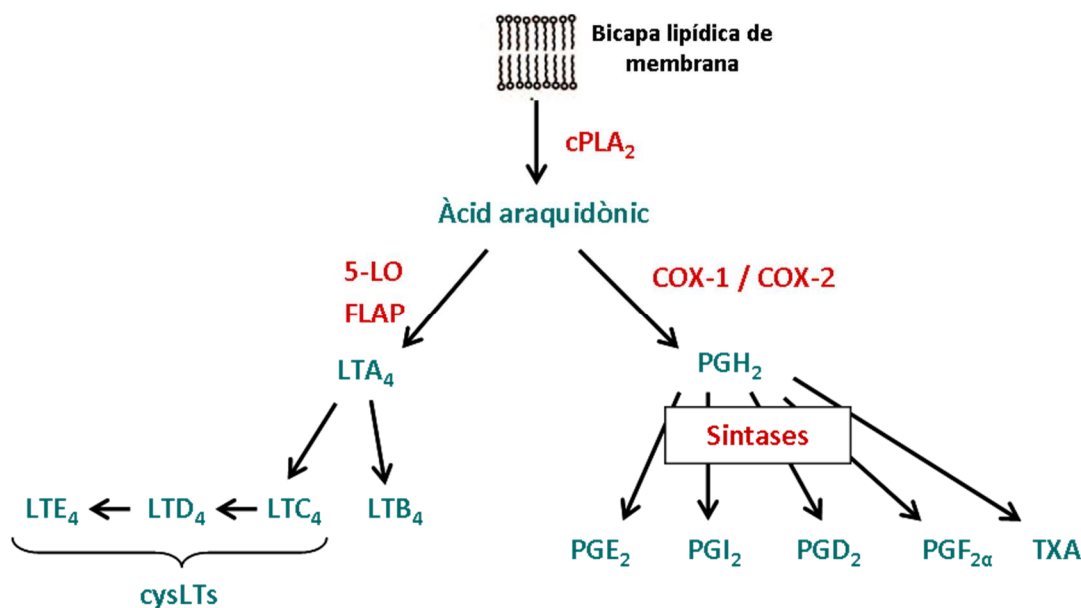


Figura 7.- Via de síntesi dels icosanoides des de l'àcid araquidònic cap als leucotriens o les prostaglandines.

Hi ha dues isoformes de l'enzim ciclooxigenasa: ciclooxigenasa-1 (COX-1), que s'expressa de forma constitutiva, i ciclooxigenasa-2 (COX-2), que és induïble (Brock *et al.*, 1999). Les dues isoformes de l'enzim ciclooxigenasa, COX-1 i COX-2, catalitzen les mateixes reaccions i mostren aproximadament un 60% d'identitat en la seva seqüència d'aminoàcids però estan codificats per dos gens localitzats en cromosomes diferents. Aquests enzims estan localitzats a la membrana del reticle endoplasmàtic i a la membrana nuclear (Chandrasekharan *et al.*, 2004). L'enzim COX-1 realitza nombroses funcions de regulació de l'homeòstasi tissular de manera constitutiva, especialment a la mucosa gàstrica. En condicions i teixits específics, s'ha descrit que es pot donar una inducció de l'expressió de COX-1 (Rocca *et al.*, 1999).

La COX-2 és d'expressió induïble i és la principal responsable de la síntesi de prostanoids en un procés inflamatori (Baigent *et al.*, 2003). En fibroblastes, macròfags, cèl·lules endotelials vasculars, cèl·lules musculars llises o cèl·lules epitelials és altament induïble per diverses citokines, factors de creixement i agents inductors de tumors. De fet, en nombrosos tipus de tumors l'expressió de COX-2 es troba incrementada. Els fàrmacs anti-inflamatoris no-esteroïdals (AINEs) inhibeixen la producció de prostaglandines bloquejant l'acció de COX-1 i COX-2. Els inhibidors selectius de la COX-2 tenen menys possibilitats de causar efectes gastrointestinals adversos, però poden causar problemes cardiovasculars, ja que la supressió de COX-2 inhibeix la síntesi de prostacicles cardioprotectors. D'altra banda, l'expressió de COX-2 està incrementada en diversos càncers. En aquests casos, la inhibició de COX-2 pot tenir beneficis terapèutics.

En la via de l'àcid araquidònic, un cop aquest és alliberat de la bicapa lipídica, els enzims COX catalitzen la formació de PGH₂ a través de una reacció redox en dues fases: en primer lloc, l'AA és oxidat a l'intermediari inestable PGG₂ i a continuació, aquest és reduït a PGH₂ per l'activitat peroxidasa de l'enzim COX. PGH₂ és el precursor de diversos prostanoids, formats a través de l'acció específica de isomerasas. Les prostaglandines inclouen la PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF_{2α} i el tromboxà A₂ i són sintetitzades tant per leucòcits com per cèl·lules estructurals. Els leucotriens inclouen tant el LTB₄ com els cisteinil leucotriens (CysLTs) C₄, D₄ i E₄ i són sintetitzats principalment pels leucòcits.

3.2.1 Prostaglandina E₂

La PGE₂ és un dels prostanoids més abundants i es caracteritza per tenir gran varietat de funcions biològiques, entre elles destaca el seu paper en els processos inflamatoris (Ricciotti *et al.*, 2011). El motiu d'aquesta variabilitat podria estar relacionat amb els múltiples receptors a través dels quals realitza les seves funcions, anomenats receptors de prostaglandina E₂ (EP). Existeixen quatre isoformes de EP: EP1 – EP4, codificats per gens diferents, però amb una alta afinitat per la PGE₂. Així doncs, segons al receptor al que s'uneixi, la PGE₂ pot induir diferents vies de transducció de senyal amb efectes finals diversos, fins i tot oposats, dins de la mateixa cèl·lula o teixit, ja que sovint el mateix tipus cel·lular coexpressa més d'un tipus de receptor EP (Rocca, 2006).

Al contrari que en altres òrgans, els pulmons representen una situació d'acció peculiar per la PGE₂. En aquest teixit, la concentració de PGE₂ normalment és molt superior que la present

al plasma, suggerint que al pulmó la PGE₂ té un paper diferent i que el seu increment podria representar un benefici terapèutic (Vancheri *et al.*, 2004).

3.2.2 Icosanoides a la fibrosi pulmonar

Una fibroproliferació anormal es caracteritza per un excés de LTs profibròtics i una deficiència de PGs antifibròtiques (Huang *et al.*, 2008a)(Taula 2).

Taula 2.- Propietats pro-fibròtiques dels leucotriens i antifibròtiques de les prostaglandines descrites en diversos tipus cel·lulars (Huang *et al.*, 2008a).

Tipus cel·lulars i accions	Efectes dels LTs	Efectes de les PG
Leucòcits		
<i>Quimiotaxi</i>	↑	↓
<i>Adhesió</i>	↑	↓
<i>Resposta Th2</i>	↑	↓
<i>Alliberació de citoquines pro-inflamatòries</i>	↑	↓
<i>Espècies reactives d'O2</i>	↑	↓
Cèl·lules epitelials		
<i>Supervivència</i>	↓	↑
<i>Alliberació de TGF-β1</i>	↑	?
<i>Transició epiteli-mesenquimal</i>	?	↓
Fibroblastes		
<i>Quimiotaxi</i>	↑	↓
<i>Proliferació</i>	↑	↓
<i>Síntesi de col·lagen</i>	↑	↓
<i>Entrecreuament de col·lagen</i>	?	↓
<i>Degradació de col·lagen</i>	?	↑
<i>Diferenciació a miofibroblastes</i>	↑	↓
<i>Contracció de la matriu</i>	?	↓
<i>Proliferació de fibròcits</i>	↑	?
<i>Factors de supervivència epitelial</i>	?	↑
Efectes nets	<i>Pro-fibròtic</i>	<i>Anti-fibròtic</i>

LTs i PGs realitzen nombroses funcions implicades tant en l'homeostasi com en la malaltia d'un teixit. Poden actuar de manera paracrina o autocrina unint-se als seus receptors

transmembrana específics acoblats a proteïna G. Aquests senyalitzen via canvis en el fosfat d'adenosina cíclic (AMPc) intracel·lular, calci o diacilglicerol, depenent del tipus de proteïna G associada. Els seus efectes sovint s'associen al dolor i la febre, però s'ha demostrat que tenen capacitat de regular nombroses vies importants en la fibrosi pulmonar.

Els LTs promouen la inflamació leucocitària, l'activació dels macròfags i l'alliberació de citoquines pro-inflamatòries, com TNF- α , IL-6, and IL-8 i factors de creixement. Els CysLTs, estimulen la síntesi de TGF- β 1 per part de les cèl·lules epitelials (Bosse *et al.*, 2008). Els LTs també es caracteritzen per estimular la proliferació dels fibroblastes, la síntesi de col·lagen i la diferenciació a miofibroblastes (Phan *et al.*, 1987).

La PGE₂ és el principal producte prostanoide sintetitzat per fibroblastes i cèl·lules epitelials. Les accions de la PGE₂ són proinflamàtòries en certes malalties però en un context diferent, té un paper antiinflamatori i antifibròtic. La PGE₂ incrementa la supervivència de les cèl·lules epitelials (Horowitz *et al.*, 2010), inhibeix l'activació dels fibroblastes, incloent migració, proliferació, síntesi de col·lagen (Goldstein *et al.*, 1982; Saltzman *et al.*, 1982). A més promou la destrucció del col·lagen que ja s'ha format (Brilla *et al.*, 1995) i inhibeix la transformació fibroblast-miofibroblast produïda per TGF- β (Fine A. *et al.*, 1989; Kolodsick *et al.*, 2003; White *et al.*, 2005). Alhora, s'ha descrit que inhibeix la transició epitel-li-mesenquimal induïda per TGF- β 1 en cèl·lules epitelials renals (Zhang *et al.*, 2006). En conjunt, els estudis mostren un paper "pro-fibròtic" dels leucotriens i "anti-fibròtic" de la PGE₂.

Aquests estudis *in vitro* estan recolzats per estudis en models animals. El ratolí deficient en 5-LO presenta una fibrosi menys severa en resposta a bleomicina que el normal (Peters-Golden *et al.*, 2002). El mateix efecte s'ha observat administrant un inhibidor de la 5-LO. Pel contrari, en un model de ratolí deficient per COX-2 la inducció de fibrosi per bleomicina és més severa (Hodges *et al.*, 2004), així com en animals tractats amb l'inhibidor de COX-2 indometacina (Moore *et al.*, 2000). Aquest efecte va ser atenuat per l'administració de prostaciclina (Lovgren *et al.*, 2006) i d'un anàleg de la PGI₂ (Murakami *et al.*, 2006).

En models animals de fibrosi pulmonar s'ha observat un desequilibri en la via dels icosanoides, amb un increment dels LT pro-fibròtics i una disminució de la PGE₂ (Bonner *et al.*, 2002). A més a més, el rentat broncoalveolar dels pacients amb FPI presenta nivells disminuïts de PGE₂ en comparació amb el normal (Borok *et al.*, 1991) i els seus macròfags tenen disminuïda la capacitat de produir PGE₂ (Ozaki *et al.*, 1987). S'ha descrit que *in vitro*, els fibroblastes procedents de teixit pulmonar de pacients amb FPI sintetitzen menys PGE₂ que els fibroblastes normals degut a una expressió de COX-2 disminuïda (Wilborn *et al.*, 1995; Vancheri *et al.*, 2000; Keerthisingam *et al.*, 2001). Aquest fet té importants conseqüències patològiques ja que el descens de COX-2 i PGE₂ està associat a un increment de la síntesi de col·lagen i la proliferació cel·lular en resposta a TGF- β 1 (Keerthisingam *et al.*, 2001). D'altra banda, el fluid de rentat broncoalveolar i l'homogenat de teixit obtingut de pacients amb FPI contenen nivells superiors de LTB₄ que el control (Wardlaw *et al.*, 1989).

3.2.3 Diàleg entre els icosanoides i altres mediadors en la fibrosi

Els icosanoides i les citokines tenen la capacitat de modular-se entre ells, un diàleg que podria tenir un paper important en la fibrogènesi. Un descens en la síntesi de PGE₂ permet un increment de molècules amb propietats pro-fibròtiques, com la CCL2 (proteïna quimioattractant de monòcits) (Moore *et al.*, 2003). La mateixa PGE₂ induïx la síntesi d'altres molècules anti-fibròtiques com el factor de creixement d'hepatòcits (Marchand-Adam *et al.*, 2003).

Un desequilibri en favor de les citokines Th2 sobre les Th1 és un factor clau al desenvolupament de la fibrosi pulmonar. Els icosanoides poden regular aquest balanç. S'ha descrit que els leucotriens promouen un increment en la resposta Th2 per les cèl·lules T, incrementant la síntesi d'IL-4, IL-5 i IL-13. Aquestes citokines tenen la capacitat de disminuir la síntesi de PGE₂ a través de la inhibició de l'expressió de COX-2 i alhora de promoure l'expressió de LT (Espinosa *et al.*, 2003).

Alhora, els icosanoides poden interactuar amb altres vies implicades en la patogènesi de la FPI, reduint l'estrés oxidatiu, regulant la cascada de coagulació i incrementant la síntesi de metal·loproteinases amb un paper anti-fibròtic en la FPI.

3.2.4 Icosanoides com a dianes terapèutiques

Compostos anàlegs de la PGEI₂ així com inhibidors de 5-LO i antagonistes del receptor cysLT s'utilitzen en l'actualitat per tractar la hipertensió pulmonar i l'asma, respectivament. Tot i que ambdues patologies es caracteritzen per cert remodelat del teixit, l'aproximació terapèutica no es basa en millorar ni disminuir la resposta fibroproliferativa, fet que degut a la quantitat de publicacions que indiquen que els icosanoides podrien reduir la resposta fibròtica, caldria tenir en compte.

La PGE₂ és el prostanoïde més abundant sintetitzat per cèl·lules epitelials i fibroblastes i és el que presenta una eficiència establerta com a anti-fibròtic. Per tant, l'administració de PGE₂ podria ser una opció terapèutica a considerar. Fins al moment, s'ha provat a administrar PGE₂ per aerosol a curt termini, però no es van analitzar efectes funcionals a llarg termini (Borok *et al.*, 1991). Una limitació pràctica de la inhalació de PGE₂ és que en alguns pacients provoca tos, fet que podria ser superat a través de l'activació selectiva del receptor EP2, el responsable de la majoria d'efectes antifibròtics de la PGE₂. Una altra limitació potencial és l'aparent resistència que presenten alguns fibroblastes procedents de pacients amb FPI a les accions anti-fibròtiques de la PGE₂, fet que caldria evaluar *in vivo* (Huang *et al.*, 2008c).

D'altra banda, segons aquest punt de vista, caldria anar amb compte en l'ús de fàrmacs que inhibeixen la via de les prostaglandines, com és el cas dels corticosteroides, ja que no només no semblen aportar cap efecte beneficiós directe sobre el desenvolupament del procés fibròtic i alhora disminueixen la síntesi de PGE₂ al pulmó. Els corticosteroides actuen inhibint la síntesi de COX-2 i de PGE sintasa i alhora no són eficients disminuint la via dels leucotriens, fet que podria fins i tot ser perjudicial i empitjorar la patologia.

Altres fàrmacs podrien tenir un efecte beneficiós incrementant de manera indirecta la secreció de PGE₂. Un exemple és l'antioxidant N-acetilcisteïna (NAC), que incrementa els nivells de glutatió. L'enzim PGE sintasa és depenent de glutatió, de tal manera que el NAC afavoriria la síntesi de PGE₂. A més a més, l'antagonista del receptor d'angiotensina II Losartan disminueix la fibrosi induïda per bleomicina, fet associat a la seva habilitat per incrementar la PGE₂ (Molina-Molina *et al.*, 2006).

3.3 Interleuquina-1 β

La Interleuquina-1 beta (IL-1 β) és una potent citoquina proinflamatòria codificada pel gen IL1B. El seu precursor pro-IL-1 β és hidrolitzat per l'enzim caspasa 1, alliberant-se la IL-1 β madura, que és la forma activa i secretable (Hoffman *et al.*, 2010). Un cop la IL-1 β deixa la cèl·lula, s'uneix al receptor 1 d'interleuquina-1, amb el resultat de la inducció de la resposta inflamatòria. És sintetitzada fonamentalment pels macròfags activats, però les cèl·lules epitelials i endotelials també la produeixen. La IL-1 β incrementa la síntesi de proteases, antagonitzant l'efecte del TGF- β 1 sobre la matriu extracel·lular. Alhora, la IL-1 β s'ha utilitzat com a estímul de l'expressió de l'enzim induïble ciclooxigenasa-2 *in vitro* (Roca-Ferrer *et al.*, 2011), ja que és capaç d'incrementar el metabolisme de l'àcid araquidònic en diversos tipus cel·lulars, entre ells fibroblastes, cèl·lules endotelials, hepatòcits i osteoclasts (Hoffman *et al.*, 2010).

S'ha descrit que nivells elevats de IL-1 β estan associats al desenvolupament de la lesió fibròtica (Wynn, 2012), particularment en models animals amb sobreexpressió d'aquesta citoquina, on la inflamació inicial condueix a una resposta fibròtica progressiva (Kolb *et al.*, 2001). En FPI, s'han descrit nivells incrementats de secreció de IL-1 β per macròfags (Zhang *et al.*, 1993).

3.4 Receptor d'interleuquina-1

El receptor d'interleuquina-1 (IL-1R) es troba dins de la superfamília de receptors amb el domini citosòlic "*Toll-Interleukin-1*" (TIR), que és una àmplia família de molècules involucrades en l'activació de la resposta immune innata, la defensa inicial no-específica contra microorganismes patogènics i altres agressions. En situacions no patològiques, els receptors de la superfamília TIR estan implicats en el manteniment de l'homeòstasi dels teixits. L'estimulació d'aquests receptors inicia una reacció inflamatòria que inclou la producció de citoquines inflamatòries (Boraschi *et al.*, 2013).

Els *Toll-like receptors* (TLR) són una altra família de receptors que formen part de la superfamília TIR. Tenen dominis extracel·lulars amb repeticions riques en leucina però comparteixen un domini TIR pràcticament idèntic amb tots els membres de la família del receptor d'IL-1. Per aquest motiu, la transducció de senyal i les conseqüències biològiques dels lligands

de TLR i dels lligands de la família d'IL-1 són sovint les mateixes i ambdós famílies de receptors contribueixen a la defensa de l'hoste.

Per tant, els receptors de la superfamília TIR es caracteritzen per la presència d'una seqüència comú (domini TIR) en el domini de senyalització intracel·lular de la molècula de receptor (O'Neill, 2000; Martin *et al.*, 2002). D'acord amb l'estructura extracel·lular d'unió al lligand, la família TIR es pot dividir en:

- LRR: *Leucine-rich repeat domain*. Inclou els *Toll-like Receptors* (TLR)
- Receptors amb domini d'immunoglobulina (Ig). Inclou els 10 membres de la família del receptor IL-1

3.4.1 Família del receptor d'interleuquina-1

Tots els membres es caracteritzen per un fragment extracel·lular que conté tres dominis Ig i una regió intracel·lular que conté un domini TIR (excepte IL-1RII). Els membres principals són (Figura 8):

- IL-1RI: La cadena d'unió a interleuquina-1. S'uneix a IL-1 α , IL-1 β i IL-1Ra.
- IL-1R2: Un receptor "esquer" (*decoy*), ja que no té el domini intracel·lular TIR. També conegut com a IL-1RII. S'uneix a IL-1 α , IL-1 β i IL-1Ra.
- IL-1R3: Proteïna accessòria al receptor IL-1, també coneguda com a IL-1RAcP.
- Altres des de IL-1R4 fins a IL-1R10, inclouent les cadenes d'unió a IL-33, IL-18 i IL-36 a més de dos receptors orfes.

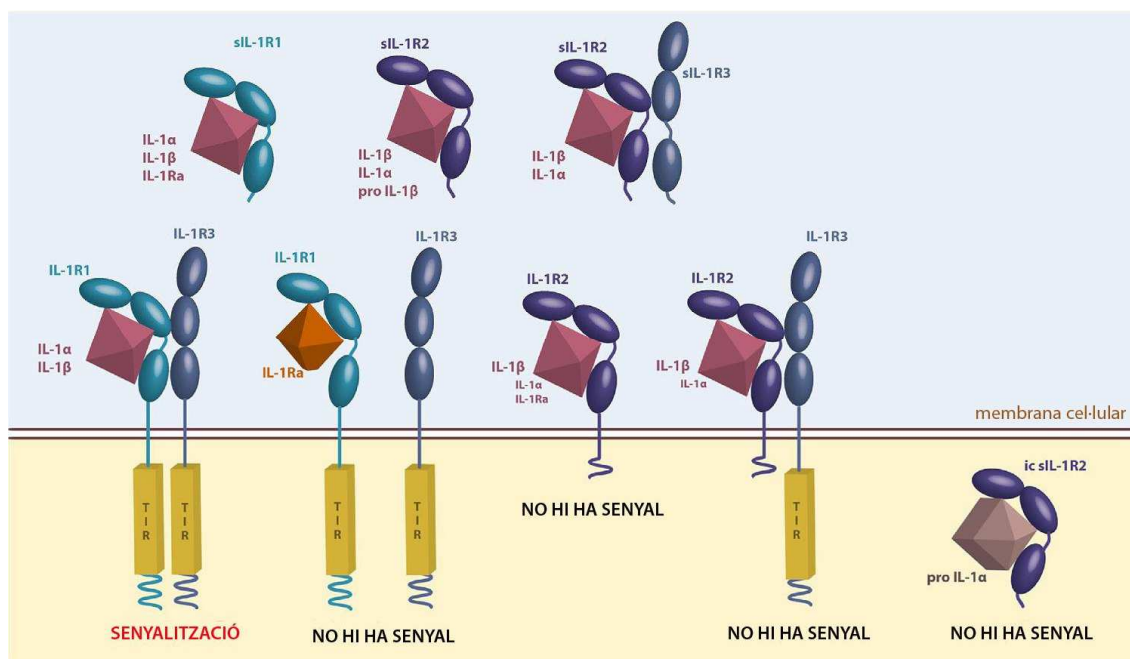


Figura 8.- Complexes del receptor d'interleuquina-1. (Adaptació de Boraschi *et al.*, 2013)

3.4.2 Complexe d'activació del receptor d'interleuquina-1 tipus I

Existeixen tres lligands capaços d'unir-se a del receptor d'interleuquina-1 tipus I (IL-1RI): les citoquines agonistes IL-1 α i IL-1 β i l'antagonista IL-1Ra, que tot i ser altament homòleg a IL-1 β , no té capacitat de reclutar la cadena accessòria IL-1RAcP i per tant, no permet la transducció de senyal.

Cada lligand IL-1 s'uneix de manera específica a la regió extracel·lular del receptor, que conté tres regions tipus Ig. Una segona cadena anomenada cadena o proteïna accessòria és reclutada a continuació, formant un complex heterotrimèric conjuntament amb el lligand i el receptor i s'inicia la transducció de senyal. L'aproximació del domini intracel·lular TIR de la cadena d'unió al lligand del receptor amb la proteïna accessòria és el que inicia la senyalització.

Després de la formació del complex heterotrimèric, es recluten la molècula adaptadora factor de diferenciació mieloide 88 (MyD88) i la quinasa associada al receptor-1 d'interleuquina (IRAK), seguit de la interacció amb el factor associat al receptor de TNF 6 (TRAF6). L'activació de la quinasa I κ B (IKK) causa la degradació de l'inhibidor de kappa B (IKB) amb la consegüent activació del factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades (NF- κ B) (Martin *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2010).

Existeixen nombrosos mecanismes de regulació negativa de l'activació dels receptors de IL-1R:

- Antagonisme: IL-1Ra és una citocina antagonista del receptor IL-1RI amb una estructura molt similar a IL-1 i que s'uneix a IL-1RI però no permet la unió de la proteïna accessòria IL-RAcP i per tant, segresta IL-1RI en un complex inactiu lligand-receptor.
- Receptor esquer: IL-1RII s'uneix als lligands agonistes IL-1 formant un complex inactiu lligand-receptor, ja que no té el domini intracel·lular TIR i per tant no permet la transducció de senyal. Impedeix als agonistes unir-se a la forma activa del receptor IL-1RI. Té una afinitat molt elevada per IL-1 β i molt baixa per IL-1Ra, fet que permet una inhibició molt eficient.
- Esquers solubles: Diversos membres de la família IL-1R es troben de forma soluble, generats per splicing alternatiu o per escisió de la membrana cel·lular, capturant el lligand i evitant que s'uneixi al receptor actiu.
- Inhibició de la maduració del lligand: La forma precursora de les citoquines IL-1 ha de ser madurada per proteases per tornar-se biològicament activa. El precursor d'IL-1 β pot unir-se a IL-1RII, que evita la seva maduració proteolítica.
- Competició pel co-receptor: IL-1RII pot unir-se a la proteïna accessòria IL-1RAcP formant un complex inactiu i limitant la disponibilitat de IL-1RAcP per unir-se a un complex capaç d'activar la senyalització.

3.4.3 Receptors d'interleuquina-1 en la fibrosi pulmonar idiopàtica

Takeuchi *et al.*, (1999) van descriure la presència del receptor IL-1RI en fibroblastes aïllats de biòpsies de pulmó de pacients amb FPI. Utilitzant IL-1 α marcada, van observar que no hi havia diferències en el nombre ni en l'afinitat de IL-1RI entre FPI i fibroblastes procedents d'individus fumadors i amb càncer. Alhora, s'ha descrit que el TGF- β 1 és capaç d'inhibir l'expressió basal de IL-1RI en línies cel·lulars murines progenitores limfoides i mieloides així com d'inducció per IL-3 en cèl·lules de la medul·la òssia humana (Dubois *et al.*, 1990).

Smith *et al.*, van descriure a l'any 1995 nivells de IL-1Ra augmentats en rentat broncoalveolar de pacients amb FPI, acompanyat d'un increment proporcional d'IL-1 β . Per immunohistoquímica van observar positivitat en l'expressió d'IL-1Ra en cèl·lules epitelials hiperplàsiques, macròfags i fibroblastes. Quan van analitzar l'expressió d'IL-1Ra en fibroblastes control i FPI en cultiu *in vitro* no van observar diferències. Sí les van observar en presència de TGF- β 1, amb una inducció superior a fibroblastes FPI.

Diversos estudis de polimorfismes de la família del receptor d'IL-1 han estat realitzats en pacients amb FPI, amb resultats controvertits. Huytrová *et al.*, (2002) no van detectar polimorfismes associats a IL-1 α , IL-1 β , IL-1RI o IL-1Ra associats a FPI, però sí a sarcoïdosi. Més recentment, Barlo *et al.*, (2011) van descriure un ràtio IL-1Ra/IL-1 β inferior a sèrum i rentat broncoalveolar d'individus amb FPI en comparació amb els controls. Sí van trobar un polimorfisme de nucleòtid simple (SNP) al gen IL-1RN que codifica per l'antagonista IL-1Ra associat a la susceptibilitat a patir FPI. Korthagen *et al.*, (2012) també van descriure que variacions en el gen IL-1RN poden predisposar a patir la malaltia, assumint que l'antagonista tindria un paper protector en la FPI.

Gasse *et al.*, 2007 van descriure que la resposta inflamatòria induïda per bleomicina en ratolí es veia atenuada en ratolins deficients en IL-1R1 i en la proteïna de transducció de senyal MyD88. La resposta fibròtica va ser, en conseqüència, inferior en aquests animals, ja que és proporcional a la fase inflamatòria inicial. Així doncs, en la fase inflamatòria del model de bleomicina, el receptor IL-1RI sembla incrementar la fibrosi que es desenvolupa posteriorment, fet que no s'ha estudiat en la patologia en humans.

4. CÈL·LULES EPITELIALS I MESENQUIMALS ALVEOLARS I FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA

4.1 Cèl·lules alveolars a la fibrosi pulmonar idiopàtica

A la fibrosi pulmonar l'epiteli alveolar és el principal lloc danyat per una lesió reiterada. A més a més, l'epiteli pulmonar participa en la reacció de resposta inflamatòria a través de diversos mecanismes, incloent l'alliberació de mediadors i factors de creixement, citoquines i quimioquines i els seus receptors, proteases, proteïnes del surfactant, molècules d'adhesió i components de la matriu extracel·lulars, tots ells participants de la resposta fibròtica (Gharaee-germani *et al.*, 2009). Hi ha nombroses proves histològiques que indiquen que hi ha alteracions profundes en l'epiteli alveolar dels pacients amb FPI, entre elles la presència de cèl·lules epitelials hiperplàsiques. Una troballa consistent en pulmons amb FPI és la disminució en el nombre de cèl·lules epitelials tipus I com a resultat de l'apoptosi i el desprendiment de la paret alveolar (Selman *et al.*, 2001). Sembla que les cèl·lules tipus I són més susceptibles a una lesió que les tipus II. En cas de ferida, les cèl·lules tipus II supervivents podrien proliferar i diferenciar-se a cèl·lules tipus I i repoblar la membrana basal nua. En àrees danyades de manera més severa, la membrana basal és destruïda i les cèl·lules epitelials són desplaçades per fibroblastes i miofibroblastes, una part d'ells procedirien de les cèl·lules epitelials tipus II a través del procés d'EMT.

El paper de les cèl·lules epitelials alveolars en la FPI no està completament definit. D'una banda, es considera que l'apoptosi massiva de cèl·lules epitelials que es dona a la patologia és una de les principals causes de l'inici del procés fibròtic. Alhora, la desaparició de les cèl·lules epitelials causaria l'eliminació de les funcions "antifibròtiques" de l'epiteli, incloent la síntesi constitutiva de PGE₂, la producció de metaproteïnases amb capacitat de degradació dels col·làgens fibril·lars i el seu paper com a barrera física per evitar que les citoquines produïdes pels macròfags alveolars induïxin l'activació de les cèl·lules intersticials subjacents (Uhal *et al.*, 2002). D'altra banda, hi ha estudis (Selman *et al.*, 2006) que indiquen que les cèl·lules epitelials actives que es mantenen al llarg de la progressió de la fibrosi tindrien un paper pro-fibròtic a través de la síntesi de citoquines, afavorint la proliferació, migració i activació de les cèl·lules mesenquimals i per tant, el procés de reparació anormal i la formació dels focus de fibroblastes i miofibroblastes. Les cèl·lules epitelials sobreexpressen diversos mediadors que tenen un paper destacat en la progressió de la FPI, entre ells TGF- β , PDGF, TNF- α o ET-1.

Les cèl·lules de la línia cel·lular d'adenocarcinoma pulmonar humà A549 s'utilitzen com a model *in vitro* de les cèl·lules epitelials alveolars tipus II. Aquesta línia va ser establerta al 1972 i té trets característics de les cèl·lules epitelials pulmonars, incloent la presència de cossos lamel·lars i citocrom P450, igual que les cèl·lules epitelials tipus II. Les cèl·lules A549 formen monocapes confluents polaritzades amb la morfologia característica de les cèl·lules tipus II i presenten marcatge per àcid tànnic, típic dels cossos lamel·lars on s'emmagatzema el surfactant.

4.2 Paradoxa de l'apoptosi a la fibrosi pulmonar idiopàtica

L'apoptosi és un factor clau en la resolució del tancament d'una ferida *in vivo*, ja que per que tingui lloc la reparació normal del teixit, en la fase final de tancament és necessària la desaparició de les cèl·lules mesenquimals. En la FPI, l'excés d'apoptosi de les cèl·lules epitelials combinat amb una resistència dels fibroblastes i miofibroblastes a l'apoptosi podria ser un mecanisme important en el desenvolupament de la fibrosi progressiva (Uhal *et al.*, 1998; Uhal, 2002; Lappi-Blanco *et al.*, 1999; Moodley *et al.*, 2003).

Diversos mecanismes han estat proposats per explicar aquest desequilibri entre l'apoptosi en fibroblastes i cèl·lules epitelials. Els fibroblastes procedents de pulmons amb FPI indueixen apoptosi de cèl·lules epitelials alveolars *in vitro* a través de la secreció d'angiotensina II (Wang R *et al.*, 1999). D'altra banda, els fibroblastes FPI presenten resistència a l'apoptosi induïda pel ligand de Fas (FasL) *in vitro* (Moodley *et al.*, 2004; Buhling *et al.*, 2005). Fas és un membre de la família de TNF de receptors de superfície i indueix l'apoptosi cel·lular quan se l'hi uneix el ligand de Fas (FasL), una proteïna transmembrana expressada per limfòcits T i cèl·lules *natural killer*. A més a més, s'ha descrit una expressió reduïda de Fas en la fibrosi pulmonar. Una possible causa d'aquesta reducció podria ser una disminució de l'acetilació d'histones i un increment de les desacetilases en el promotor de Fas observat tant en el model de fibrosi pulmonar induïda per bleomicina en ratolí com en fibroblastes FPI (Huang *et al.*, 2013).

En el model animal de bleomicina també s'ha descrit un increment de la via Fas-FasL en cèl·lules epitelials alveolars i en canvi una resistència inherent a l'apoptosi induïda per Fas en les cèl·lules mesenquimals, probablement per una menor expressió del receptor Fas. L'anormal expressió i funcionament de la via Fas-FasL podria ser un mecanisme destacat en la progressió de la fibrosi pulmonar. Sembla que la interacció entre el comportament de cèl·lules epitelials i fibroblastes envers l'apoptosi afectaria el diàleg entre els dos tipus cel·lulars. Alhora, en el model de bleomicina, els miofibroblastes han demostrat major capacitat de síntesi de FasL, incrementant la inducció de l'apoptosi de les cèl·lules epitelials *in vitro*, un efecte també produït per acció del TGF- β 1.

Fora del pulmó, la sobreexpressió de ciclooxigenasa-2 (COX-2) té un paper important en el desenvolupament de diversos tumors epitelials a través de la inhibició de l'apoptosi de les cèl·lules epitelials (Jabbour *et al.*, 2002). En canvi, s'ha descrit que la PGE₂ exògena promou l'apoptosi de fibroblastes sinovials i colònics (Houchen *et al.*, 2003; Jovanovic *et al.*, 2002). La capacitat disminuïda dels fibroblastes FPI de sintetitzar PGE₂ (Wilborn *et al.*, 1995) *in vitro* podria tenir com a resultat una sensibilitat augmentada de les cèl·lules epitelials a l'apoptosi induïda per FasL i alhora induir la resistència dels fibroblastes al mateix estímul (Maher *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2009).

D'altra banda, no tots els estudis indiquen que els fibroblastes fibròtics són resistents a l'apoptosi. Ramos *et al.*, (2001) van descriure que els fibroblastes procedents d'individus amb FPI presentaven una taxa de creixement *in vitro* inferior i una apoptosi espontània superior als fibroblastes procedents d'individus control. Alhora també van observar un percentatge superior de cèl·lules α -SMA positives en cultius FPI. S'ha descrit que la IL-1 β causa un descens dosi-dependent de la proteïna α -SMA en fibroblastes de pulmó de rata (Zhang *et al.*, 1997), però es

desconeix si un increment de l'apoptosi dels miofibroblastes induïda per IL-1 β és la causa d'aquest descens.

4.3 El miofibroblast

La cèl·lula efectora de la fibrosi és el miofibroblast: un fenotip diferenciat de fibroblast amb capacitat contràctil igualable a les cèl·lules musculars llises i presenta expressió de alfa-actina del múscul llis (α -SMA) (Hinz *et al.*, 2007). Una característica clau comú a les lesions fibròtiques i durant el procés de reparació i cicatrització d'una ferida és la presència de miofibroblastes a les zones de síntesi activa de matriu extracel·lular i remodelat.

En condicions normals, els fibroblastes quiescents tenen escassos contactes cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu extracel·lular associades a actina i presenten una síntesi escassa de matriu extracel·lular (Tomasek *et al.* 2002). Després del dany a un teixit, s'activen i migren cap a la zona danyada on sintetitzen components de la matriu extracel·lular estimulats per la secreció de citoquines per part de cèl·lules inflammatòries i altres cèl·lules residents. L'estrès mecànic associat als canvis de la matriu extracel·lular present a la zona de la ferida també estimulen la transició fenotípica dels fibroblastes, que adquireixen fibres d'estrès d'actina connectades a les proteïnes de la matriu mitjançant integrines (Tomasek *et al.*, 2002). Aquest fenotip es coneix com a proto-miofibroblast. El pas que el converteix en un miofibroblast diferenciat és la síntesi *de novo* d'alfa actina del múscul llis (α -SMA), el marcador més utilitzat per definir un miofibroblast i que li confereix una gran capacitat contràctil. Per generar α -SMA s'han de donar almenys tres factors: 1) la presència de TGF- β 1 actiu, 2) la presència de proteïnes específiques de la matriu extracel·lular i 3) certa tensió mecànica mínima semblant a les propietats d'un teixit en procés de remodelat (Gabbiani, 2003).

El principal inductor de l'activació a miofibroblast, el TGF- β 1, incrementa l'expressió dels components de la matriu necessaris per la diferenciació a miofibroblast, com la fibronectina (Thannickal *et al.*, 2003). Nombroses citoquines fibrogèniques com factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF) (Rubbia-Brandt *et al.* 1991), factor de creixement de fibroblastes (FGF), factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α) (Desmoulière *et al.*, 1992a), interleuquina 4 (IL-4) i interleuquina 13 (IL-13) (Hashimoto *et al.*, 2001), incrementen l'expressió d' α -SMA, mentre que l'interferó-gamma (IFN- γ) i IL-1 β disminueixen la seva expressió (Gharaee-Kermani *et al.*, 2009).

4.4 Origen dels miofibroblastes

L'origen dels miofibroblastes en la lesió fibròtica no està completament establert (Hinz *et al.*, 2012). S'han descrit diversos possibles tipus cel·lulars que es transformarien en miofibroblastes en la FPI (Figura 9):

- 1) Fibroblastes perivasculars i peribronquiolars residents a l'interstici pulmonar pel procés anomenat transició fibroblast-miofibroblast (FMT).
- 2) Cèl·lules epitelials alveolars pel procés anomenat transició epiteli-mesenquimal (EMT) i cèl·lules endotelials (EnMT).
- 3) Fibròcits circulants procedents de la medul·la òssia.

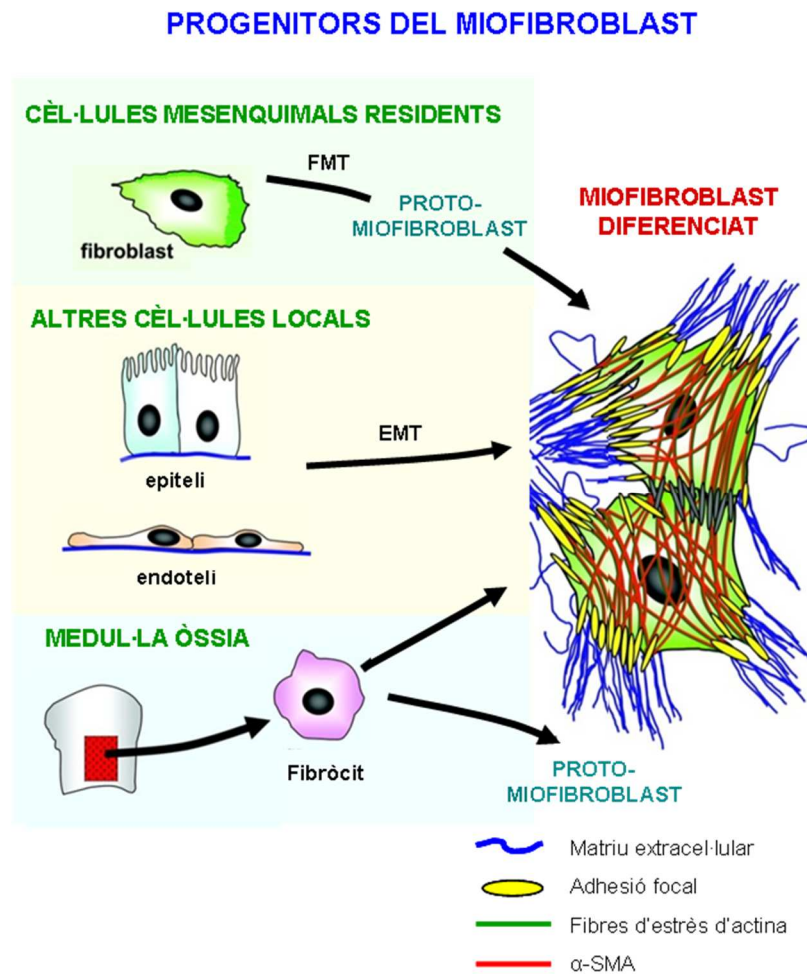


Figura 9.- Possibles orígens descrits del fenotip miofibroblast (Adaptació de Hinz *et al.*, 2007)

Una de les principals fonts serien els fibroblastes locals residents en estat de quiescència, que s'activarien en resposta a estímuls extracel·lulars com el TGF- β 1, Wnt, Jagged/Notch, endotelina-1, àcid lisofosfatídic o altres molècules de senyalització, així com per causa de la hipòxia i l'extrès mecànic causat per l'increment de la duresa i rigidesa de la matriu extracel·lular (Varga *et al.*, 2007, Kis *et al.*, 2011). Tots aquests estímuls indueixen l'expressió d' α -SMA i la formació de fibres d'estrès en cultius de fibroblastes procedents de diversos òrgans.

Els fibròcits circulants també es consideren possibles precursors dels miofibroblastes. En condicions normals, les cèl·lules derivades de la medul·la òssia representen menys d'un 1% del total de cèl·lules circulants. En resposta a lesions, s'alliberen fibròcits en quantitats superiors i

arriben fins a la zona danyada, on es diferencien a miofibroblastes i incrementen la deposició de matriu extracel·lular, contribuint al procés fibròtic.

Els miofibroblastes es troben en abundància en àrees de fibrosi activa i, a més de representar la font principal de l'increment en l'expressió de matriu i citoquines (Zhang *et al.*, 1994), intervenen en l'apoptosi de les cèl·lules alveolars i retarden la regeneració epitelial (Waghray *et al.*, 2005). Per tant, el miofibroblast té un paper significatiu promovent la deposició de matriu extracel·lular, l'alliberació de mediadors inflamatoris i el dany epitelial, tots ells factors considerats clau en el manteniment del cicle fibròtic.

S'ha demostrat mitjançant diverses aproximacions que existeixen diferències en els perfils proteïcs, genètics i transcripcionals entre precursors de miofibroblasts procedents de diferents orígens i els seus equivalents fibròtics (Larsson *et al.*, 2008). S'ha descrit que es mantenen les característiques específiques dels miofibroblastes durant diversos passatges *in vitro*, suggerint una memòria de miofibroblast que preserva el fenotip. Aquesta memòria estaria relacionada amb la regulació de modificacions epigenètiques, ja sigui de metilació de DNA, modificació de les histones o regulació de diversos gens a través de miRNAs. (Hinz *et al.*, 2012). Es desconeix, però si els miofibroblastes procedents de diferents orígens cel·lulars tenen papers diferents en el procés de reparació d'una ferida normal, així com en la resposta fibròtica.

4.4.1 Transició epiteli-mesenquimal

El procés de transició epiteli-mesenquimal (EMT) es caracteritza per un conjunt de canvis morfològics i fenotípics de les cèl·lules epitelials, que perden la polaritat apical-basal i adquireixen un fenotip amb elongat, amb capacitat migratòria (figura 10). Durant el procés es produeix una disminució de proteïnes específiques epitelials, entre elles les unions estretes i adherents i la proteïna E-cadherina, amb la conseqüent pèrdua de contacte entre cèl·lules. Alhora, s'incrementa l'expressió de diverses proteïnes mesenquimals, com vimentina o N-cadherina, i la síntesi de procol·lagen tipus 1. Les cèl·lules alveolars epitelials perden la capacitat de sintetitzar surfactant quan han dut a terme la EMT (Grünert *et al.*, 2003). Actualment, s'utilitza el terme EMT de manera àmplia per designar qualsevol canvi de les cèl·lules epitelials cap a una morfologia fibroblastoide (Thiery *et al.*, 2002).

El procés d'EMT és necessari durant l'embriogènesi i l'organogènesi, permetent que les cèl·lules puguin alternar entre el fenotip epitelial i mesenquimal (Kalluri *et al.*, 2003; 2009). Hi ha nombroses causes tant en el desenvolupament com en edat adulta per que les cèl·lules epitelials perdin el seu fenotip polaritzat (Grünert *et al.*, 2003). Una pèrdua temporal de la polaritat acompanyada de la redistribució de marcadors de les unions estretes i adherents com per exemple la E-cadherina i la migració de les cèl·lules o de grups de cèl·lules, té lloc en diversos processos del desenvolupament. Aquests inclouen per exemple, la tubulogènesi, la ramificació en la glàndula mamària o la reorganització tissular durant el tancament i regeneració d'una ferida. Altres processos normals de desenvolupament, com la formació del mesoderm durant la gastrulació o la migració de les cèl·lules de la cresta neural del tub neural inclouen la EMT.

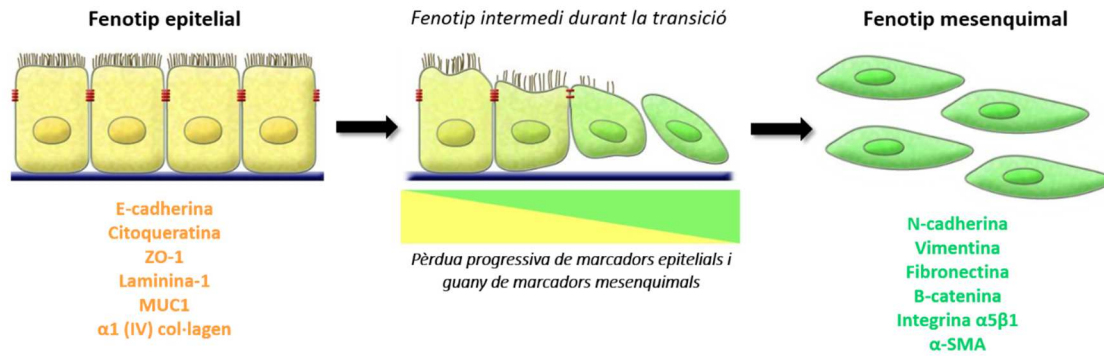


Figura 10.- Procés de transició epiteli-mesenquimal (EMT) (Adaptació de Kalluri *et al.*, 2009). La EMT implica una transició funcional de cèl·lules epitelials polaritzades cap a cèl·lules mesenquimals mòbils i secretores de matriu extracel·lular. Una llista d'alguns dels marcadors de EMT més comuns s'indica a sota de cada fenotip cel·lular. La colocalització de marcadors d'ambdós grups indica que la cèl·lula es troba en un fenotip intermedi del procés d'EMT. Quan la transició és completa, la major part de cèl·lules mesenquimals perden completament els marcadors epitelials, dificultant la detecció del seu possible origen epitelial. ZO-1, zona occludens 1; MUC1, mucina 1.

De manera similar, varietat de canvis associats a la plasticitat epitelial tenen lloc durant processos patològics. A més de participar en la formació d'òrgans i teixits i en el procés de reepitelització d'un teixit durant la reparació d'una ferida, la EMT desenvolupa un paper molt important en el potencial metastàtic de càncers de cèl·lules epitelials (Thiery *et al.*, 2002). Fins fa relativament poc, s'assumia que en teixits madurs, el fenotip epitelial era terminal. En l'actualitat, nombrosos estudis que indiquen presència d'EMT en cèl·lules epitelials de diversos òrgans posen en dubte aquesta idea (Kalluri *et al.*, 2003; Iwano *et al.*, 2002). La inflamació crònica implica la pèrdua de polaritat epitelial, alteració de deposició de matriu extracel·lular i processos migratoris i contribueix a malalties com la fibrosi pulmonar i renal, malaltia pulmonar obstructiva crònica i asma crònica, que podrien implicar també la desdiferenciació de cèl·lules epitelials a miofibroblastes (Yang *et al.*, 2002).

4.4.2 Transició epiteli-mesenquimal en la fibrosi pulmonar idiopàtica

Willis *et al.*, (2005) i Kim *et al.*, (2006) van ser els primers en descriure un possible procés d'EMT a la fibrosi, observant en teixit procedent de pacients amb FPI cèl·lules que expressaven de manera conjunta el marcador epitelial prosurfactant B amb els marcadors mesenquimals α-SMA i N-cadherina, respectivament. Al 2006 es va establir un model de ratolí transgènic utilitzant l'expressió de β-galactosidasa (β-gal) com a gen reporter de les cèl·lules epitelials alveolars i estudiar la seva transformació a miofibroblastes *in vivo* en un model de fibrosi per sobreexpressió de TGF-β1. Aquelles cèl·lules que havien realitzat EMT, mantenien expressió de β-gal i alhora eren positives per marcadors mesenquimals. D'altra banda, Tanjore *et al.*, (2009) van descriure en el model de bleomicina que les cèl·lules epitelials sí duïen a terme el procés d'EMT, però no expressaven α-SMA, concloent que els miofibroblastes presents a la fibrosi induïda per bleomicina no eren d'origen epitelial.

Kim *et al.*, (2009) van descriure que la matriu extracel·lular en contacte amb les cèl·lules epitelials alveolars és un factor determinant en la seva resposta a TGF- β 1, induint apoptosi o EMT en funció de la seva composició. Així, una matriu amb composició provisional sintetitzada pels miofibroblastes durant el tancament d'una ferida estimularia la migració de les cèl·lules epitelials per reparar l'epiteli danyat. En canvi, una composició més permanent, amb presència de col·lagen 1 α 1 induiria el procés d'apoptosi.

En l'actualitat la presència d'EMT a la fibrosi pulmonar idiopàtica és en gran mesura acceptada, però es desconeix el grau precís en el qual la EMT contribueix a la població de miofibroblastes presents al pulmó dels pacients amb FPI.

4.5 Procés de reparació d'una ferida

Els processos de reparació d'una ferida tenen típicament dues fases: una fase regenerativa en la qual les cèl·lules danyades són substituïdes per cèl·lules del mateix tipus, sense conseqüències visibles del dany reparat; i una fase fibròtica, en la qual el teixit connectiu substitueix el parènquima normal del teixit. Tot i ser necessari i beneficiat inicialment, el procés reparatiu es converteix en patogènic si no és controlat apropiadament, resultant en una deposició anormal de matriu extracel·lular, on el teixit normal és substituït per una cicatriu permanent (Wynn *et al.*, 2008).

En condicions normals, quan es produeix una ferida en un teixit i es trenquen els vasos sanguinis, s'alliberen factors quimiotàctics com el TGF- β 1 o el factor de PDGF que permeten i promouen la migració cap a la zona de la ferida de cèl·lules inflamatòries, fibroblastes i cèl·lules endotelials (Amadeu *et al.*, 2003). En aquest procés, hi ha fibroblastes que adquireixen el fenotip miofibroblast, procés en el que participen diverses citoquines, factors de creixement i components de la matriu extracel·lular com la heparina (Desmoulière *et al.*, 1992b) i la ED-A fibronectina (Serini *et al.*, 1998).

Posteriorment, es produeix la reepitelització del teixit. Les cèl·lules epitelials perden la seva polaritat apical-basal i proliferen i migren utilitzant la matriu provisional de fibrina i fibronectina, degut a que existeix una disrupció de la membrana basal. A continuació es dona el procés de remodelat que acaba amb la formació d'una cicatriu. En aquesta fase es substitueix la matriu provisional per una de col·lagen tipus I, un procés mediat pels enzims metaloproteïnases (MMP's) i els seus inhibidors (TIMPS). S'incrementa la contracció de la ferida i es reorganitzen els filaments de la matriu. Els miofibroblastes, connectats a la matriu per mitjà de les integrines, són els encarregats del procés contràctil. Finalment, quan finalitza el procés de reparació tant la composició de la matriu extracel·lular reparada com el descens en la tensió mecànica indueixen una desaparició massiva dels miofibroblastes per apoptosi (Desmoulière *et al.*, 1995; Desmoulière *et al.*, 1997).

En la FPI, aquesta desaparició no es produeix ja que els miofibroblastes mostren una resistència incrementada a l'apoptosi. Es dona per tant, un procés de resposta a una ferida permanent i es produeix la cicatrizació constant que desemboca en fibrosi.

▪ Regulació de la matriu extracel·lular en la FPI:

Els components de la matriu extracel·lular són sintetitzats per les cèl·lules residents i secretats a la matriu, on s'agreguen amb els components existents i tenen una potent influència sobre les funcions cel·lulars (Clarke *et al.*, 2013). La matriu està formada per una barreja de proteïnes fibroses i glicosaminoglicans, però el component més abundant és el col·lagen. Els principals col·làgens són el tipus I i tipus III, que creen una xarxa de fibres a l'interstici dels teixits. El col·lagen tipus IV és el component principal de la membrana basal.

En FPI, existeix un increment de la síntesi i deposició de col·lagen per part de fibroblastes i miofibroblastes. En condicions normals, la matriu sintetitzada pels fibroblastes presents al pulmó serveix d'entramat de suport per les cèl·lules i de via pels mediadors solubles i permet una resposta ràpida davant dels canvis en les tensions físiques que rep l'òrgan. En el pulmó, els fibroblastes es troben principalment en àrees subepitelials de les vies aèries i en l'interstici del parènquima pulmonar. S'ha observat que els fibroblastes aïllats de pulmons amb FPI presenten característiques fenotípiques diferents als fibroblastes normals, com alteracions en la resposta a factors de creixement i increment en l'expressió de receptors de quimiocines.

La secreció de matriu extracel·lular està altament regulada per part de les metal·loproteïnases (MMPs) i els seus inhibidors (TIMPs). Les MMPs són enzims amb activitat proteolítica que s'encarreguen de la degradació de la matriu extracel·lular. Les cèl·lules epitelials, fibroblastes i miofibroblastes i macròfags tenen capacitat de síntesi de MMPs al pulmó, controlant les taxes de recanvi de la matriu i per tant, l'arquitectura del teixit pulmonar i l'inici i resolució dels processos de cicatrització d'una ferida. Els miofibroblastes, que en condicions normals generalment són absents al parènquima pulmonar, també contribueixen a aquest procés mitjançant la seva capacitat contràctil. Nombrosos mediadors poden alterar l'homeostasi del teixit, incloent factors de creixement com el TGF- β 1, interleuquines i enzims cel·lulars.

A FPI, s'ha descrit un increment de MMP2, MMP7 i MMP9 en les zones del focus fibroblàstics, que podrien contribuir a una destrucció del teixit (Clarke *et al.*, 2013). L'acumulació excessiva de matriu en la FPI no només afecta a la capacitat respiratòria física del pulmó sinó que altera de manera activa les funcions biològiques de les cèl·lules amb les que està en contacte, promovent el procés de cicatrització permanent i desequilibrant el balanç de síntesi i degradació de matriu.

II - OBJECTIUS

L'objectiu general de la tesi ha estat estudiar el fenotip miofibroblast i la seva implicació en l'expressió de ciclooxygenasa-2 i la secreció de prostaglandina E2 en la fibrosi pulmonar idiopàtica.

Els objectius concrets han estat els següents:

- Caracteritzar la població de miofibroblastes presents en un cultiu *in vitro* de fibroblastes primaris de pulmó procedents d'individus control i amb fibrosi pulmonar idiopàtica.
- Obtenir un model enriquit de miofibroblastes *in vitro* utilitzant factor de creixement transformant beta 1 (TGF- β 1) com a factor inductor de la transformació fibroblast-miofibroblast i de la transició epiteli-mesenquimal.
- Estudiar la diferent capacitat de proliferació i migració dels fibroblastes i miofibroblastes procedents d'individus control i amb fibrosi pulmonar idiopàtica.
- Descriure l'expressió de ciclooxygenasa-2 i la secreció de prostaglandina E2 en resposta a a interleuquina-1 β al fenotip miofibroblast i al procés de transició fibroblast-miofibroblast comparant cultius primaris de fibroblastes de pacients amb FPI amb cultius control i la seva repercussió als processos de proliferació i migració.
- Analitzar utilitzant a línia cel·lular epitelial A549 el fenotip miofibroblast procedent de la transició epiteli-mesenquimal en relació a l'expressió de ciclooxygenasa-2 i la secreció de prostaglandina E2 en resposta a la interleuquina-1 β .
- Avaluar l'expressió de la família del receptor de interleuquina-1 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica, així com en el fenotip miofibroblast i en la transició epiteli-mesenquimal.

III - MATERIAL I MÈTODES

1. MATERIAL

1.1 Població

Els estudis van ser realitzats en fibroblastes primaris procedents de pulmó humà i en la línia cel·lular epitelial alveolar d'adenocarcinoma A549. Per realitzar l'estudi de fibroblastes primaris de pulmó, es van obtenir biòpsies de pulmó humà. Aquestes biòpsies provenien de dos grups diferents de pacients amb l'objectiu de realitzar comparacions dels resultats obtinguts: un grup de pacients amb fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) i un altre grup format per individus control. El teixit del grup fibròtic es va obtenir durant la biòpsia pulmonar quirúrgica pel diagnòstic de pacients amb FPI (N=12). El diagnòstic de FPI es va establir d'acord amb els criteris de l'American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society (ERS)(ATS/ERS 2000). Cap d'aquests pacients amb FPI havia rebut tractament amb corticosteroides o altres tractaments immunosupressors al moment de la recollida de la mostra.

Com a grup control es va obtenir teixit pulmonar d'individus sense antecedents de malaltia respiratòria, no fumadors i en absència d'infecció respiratòria als darrers tres mesos, als quals se'ls va realitzar cirurgia com a tractament de pneumotòrax espontani. A aquests pacients se'ls va realitzar una pleurodesi per videotorascòpia i es van obtenir explants de teixit pulmonar normal, sense evidència histopatològica de malaltia (N=10).

Degut a que no és possible obtenir mostres de teixit de pulmó completament sa, es va considerar el teixit procedent d'individus joves amb pneumotòrax sense senyal de cap malaltia respiratòria subjacent com a la opció més adequada i alhora realista de disposar de teixit pulmonar normal. En altres estudis ja s'han utilitzat mostres de teixit de pulmó de pacients amb pneumotòrax amb resultats positius (Pujols *et al.*, 2004; A. Xaubet *et al.*, 2004a).

Es va obtenir consentiment informat de tots els pacients d'acord amb les guies institucionals i l'estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic de l'Hospital Clínic de Barcelona.

La línia cel·lular epitelial alveolar d'adenocarcinoma de pulmó humà A549 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) va ser utilitzada per dur a terme els estudis de transició epiteli-mesenquimal. Aquestes cèl·lules són àmpliament utilitzades en estudis *in vitro* com a model de cèl·lules pulmonars epitelials tipus II (Kim *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2009; Buckley *et al.*, 2010).

2. MÈTODES

2.1 Cultiu cel·lular

2.1.1 Aïllament de fibroblasts primaris de pulmó

Es van aïllar fibroblastes primaris a partir de les biòpsies de pulmó, utilitzant mètodes descrits amb anterioritat amb algunes modificacions (Roca-Ferrer *et al.* 2011). Explants d'1 mm² del teixit pulmonar es van incubar en plaques de cultiu de 6 pous (NUNC, Wiesbaden, Alemanya) en condicions estèrils en medi de cultiu *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM) (Lonza, Verviers, Bèlgica) suplementat amb penicil·lina (100 IU/ml), estreptomina (100 µg/ml, Invitrogen Carlsbad, California, USA) i amfotericina B (2 µg/ml)(Sigma, St Louis, MO, USA) i 10% sèrum boví fetal *Gold* (FBS) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Alemanya). Els cultius es va mantenir en una atmosfera humida al 5% de CO₂, a 37°C.

En aquestes condicions, els fibroblasts migren de l'explant i s'adhereixen a la superfície de la placa. Quan els fibroblasts ocupen al voltant del 80% de la superfície del pou, aproximadament 20 dies després, es retira l'explant i es recullen les cèl·lules amb un tractament amb 0,05% tripsina – 0,02% àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) (Invitrogen). Posteriorment, es realitzen cultius seriatos o subcultius en el mateix medi en flascons de 150 cm² (NUNC, Wiesbaden, Alemanya) per tal d'augmentar la quantitat de cèl·lules disponibles per realitzar els diferents dissenys experimentals i evitar la contaminació d'altres tipus cel·lulars. Tots els estudis es van realitzar entre els passatges 5 i 6 ja que passatges superiors poden alterar el fenotip normal del fibroblast. Cal, doncs, fer una congelació al tercer passatge i així mantenir un fenotip més estable.

2.1.2 Congelació cel·lular

Per garantir el manteniment de les línies cel·lulars a llarg termini, es van congelar en nitrogen líquid. En el tercer passatge, es van tripsinitzar i recollir les cèl·lules seguint el mateix procediment que als subcultius. Es van comptar les cèl·lules en un comptador cel·lular *Luna™ automated cell counter* (Logos Biosystems) utilitzant la tècnica d'exclusió de blau tripan (Sigma) per tal de comptabilitzar les cèl·lules viables i les mortes. Així doncs, el colorant blau tripan no és capaç d'introduir-se a les cèl·lules vives amb la membrana intacta i en canvi, sí pot atravesar la membrana de les cèl·lules mortes, tenyint-les de blau. Es van comptar i repartir aproximadament dos milions de cèl·lules viables per cada criovial.

Es va resuspendre el pellet cel·lular en medi *Eagle's Minimal Essential Media* (EMEM) (Lonza) al 20% FBS i la mateixa quantitat de medi Crioprotective (Medi *Basal Eagle* amb *Hanks* i un 15% dimetil sulfòxid (DMSO) sense L-glutamina) (Lonza). Tot el procés es va realitzar en fred i en condicions estèrils. Els criovials es van passar a un contenidor de congelació *Mr. Frosty* (Nalgene, VWR) que es van mantenir durant 24h en un congelador de -80°C per permetre una disminució progressiva de la temperatura d'1°C per minut, degut a que conté alcohol isopropílic, millorant així la qualitat del procés de congelació. Posteriorment es van emmagatzemar els criovials en tancs de nitrogen líquid fins al moment de la seva utilització.

2.1.3 Caracterització del cultiu

Per tal d'assegurar la puresa del cultiu de fibroblastes primaris obtinguts a partir d'explants de pulmó control i amb FPI, es va realitzar una immunofluorescència per determinar la presència de marcadors característics de cèl·lules mesenquimals i de cèl·lules epitelials.

Per dur-ho a terme, els fibroblastes es van cultivar fins a subconfluència i es va realitzar una immunofluorescència seguint el protocol detallat a l'apartat 2.4, per les proteïnes del citoesquelet vimentina (Dako) i pan-citoqueratina (C2562, Sigma). La vimentina és present als fibroblastes però no a les cèl·lules epitelials i les citoqueratines en cèl·lules epitelials però no en fibroblastes.

El total dels fibroblastes van mostrar positivitat per vimentina i negativitat per citoqueratines, demostrant que no hi havia cèl·lules epitelials contaminants als cultius de fibroblastes. Com a control positiu del marcatge amb citoqueratines, es van utilitzar cèl·lules epitelials primàries procedents de mucosa nasal humana (Figura 11).

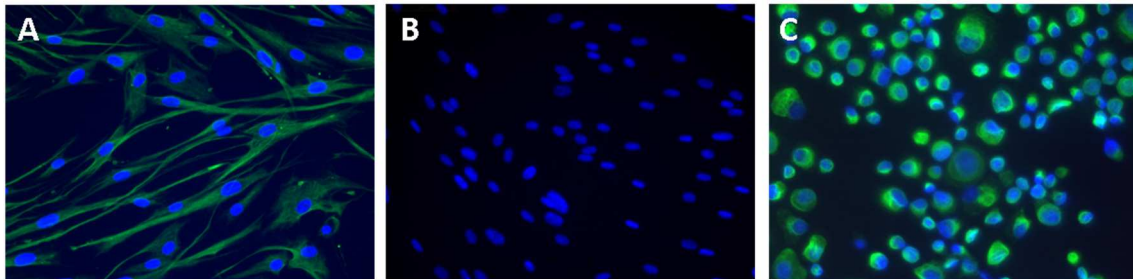


Figura 11.- Caracterització d'un cultiu primari de fibroblastes de pulmó per immunofluorescència. A) Marcatge positiu per vimentina (verd) i (B) marcatge negatiu per citoqueratines en un cultiu de fibroblastes primaris de pulmó. (C) Control positiu de la immunofluorescència de citoqueratina (verd) utilitzant cèl·lules epitelials de mucosa nasal. Els nuclis van ser marcats amb DAPI en blau (augment original x200).

2.1.4 Cultiu de la línia cel·lular epitelial de pulmó A549

La línia cel·lular epitelial alveolar d'adenocarcinoma de pulmó humà A549 es va cultivar en medi RPMI 1640 (Lonza) amb 1 mM L-Glutamina (Lonza) i suplementat amb penicil·lina (100 IU/ml), estreptomicina (100 µg/ml), amfotericina B (2 µg/ml) i 10% FBS. Els cultius es va mantenir en una atmosfera humida al 5% de CO₂, a 37°C. Els experiments es van realitzar en les mateixes condicions que als cultius de fibroblastes primaris i cada condició es va realitzar com a mínim per quadruplicat.

2.2 Disseny experimental

Es van dur a terme dos models experimentals diferents segons les condicions desitjades a cada estudi:

- **Mesura de la capacitat de migració i proliferació *in vitro* de fibroblastes i miofibroblastes:**

En primer lloc, per tal d'analitzar la capacitat de migració i proliferació *in vitro* de fibroblastes i miofibroblastes procedents de cultius control i FPI, es va dissenyar un model de tall o ferida en les cèl·lules en confluència i amb un **1% de sèrum boví fetal (FBS)**. Prèviament, les cèl·lules es van mantenir durant 24 h en medi sense sèrum per sincronitzar el cicle cel·lular i realitzar estudis de proliferació cel·lular.

En estat de confluència, es va poder controlar el moviment cel·lular: Al realitzar un tall a la monocapa es va crear un espai sense cèl·lules, de tal manera que migrar cap a aquesta zona va ser l'únic moviment possible de les cèl·lules confluents. El baix percentatge de sèrum present al medi va permetre que el metabolisme cel·lular estigués activat, facilitant un nivell adequat de proliferació i migració.

- **Estudi de l'expressió de COX-2 en fibroblastes i miofibroblastes obtinguts d'individus control i pacients amb fibrosi pulmonar idiopàtica:**

En la segona tanda d'experiments, les cèl·lules es van estudiar en subconfluència i **absència de sèrum al medi**. En aquestes condicions, les cèl·lules aturen la seva proliferació i es sincronitzen els cicles cel·lulars. En aquest moment, la seva resposta a estímuls exògens és més homogènia i per aquest motiu, molts estudis *in vitro* es realitzen després de retirar el sèrum del medi de cultiu cel·lular durant 24h.

Cal tenir en compte que el sèrum conté una gran varietat de factors de creixement i citoquines que en un percentatge del 10% podrien alterar la resposta cel·lular als estímuls exògens i l'expressió gènica i proteica objectiu de l'estudi (Lemons *et al.*, 2010).

A continuació es detallaran els estudis realitzats segons les dues aproximacions experimentals.

2.2.1 Mesura de la capacitat de migració i proliferació *in vitro* de fibroblastes i miofibroblastes

Dos mètodes diferents d'anàlisi de la migració i proliferació dels fibroblastes i miofibroblastes control i FPI es van dur a terme.

En ambdós casos, les cèl·lules es van cultivar fins a un 90% de confluència aproximadament i a continuació es van incubar durant 24h en medi sense sèrum per tal de sincronitzar els seus cicles cel·lulars. Amb l'objectiu de tenir un cultiu amb un alt percentatge de

miofibroblastes, les cèl·lules es van incubar amb medi amb o sense TGF- β 1 durant 72 h (5 ng/ml, R&D systems Minneapolis, USA), un potent inductor de la transformació de fibroblast a miofibroblast. Com a resultat, es va obtenir un cultiu enriquit en miofibroblastes. Els experiments a partir d'aquest punt es van realitzar en presència d'un 1% de sèrum boví fetal (FBS). En aquestes condicions, les cèl·lules són capaces de migrar i / o proliferar.

2.2.1.1 Estudi dels fenotips cel·lulars presents en el tancament d'una ferida *in vitro* en un cultiu de fibroblastes procedents d'individus control i de pacients amb fibrosi pulmonar idiopàtica

En el primer estudi, vam avaluar els fenotips cel·lulars presents en el tancament d'una ferida *in vitro* creada en un cultiu de fibroblastes control i FPI. Per fer-ho, les cèl·lules van ser cultivades en CultureSlides® (BD Biosciences, USA) de 4 pous en les condicions esmentades en el punt anterior. A continuació, es va realitzar un tall o ferida *in vitro*, fent un tall recte amb una punta de pipeta estèril. Es van realitzar tres rentats amb tampó fosfat salí (PBS) estèril per eliminar restes cel·lulars.

Les cèl·lules van ser fixades en aquest moment o al cap de 24 h per analitzar per immunofluorescència el marcatge d' α -SMA i la proliferació cel·lular mitjançant la tècnica d'incorporació d'un nucleòsid modificat al nucli de les cèl·lules en divisió (Click-iT®). Es van realitzar comparacions entre el nombre de miofibroblastes i de cèl·lules en estat proliferatiu a la zona de la ferida i a la zona en confluència a diferents temps i entre cultius procedents d'individus control i de pacients amb FPI.

Degut a que la proliferació per sí mateixa pot promoure el tancament d'una ferida (Kanazawa *et al.*, 2010), és necessari excloure l'efecte de la proliferació a l'hora de comparar la capacitat de migració de fibroblastes i miofibroblastes en el tancament d'una ferida *in vitro*. Es va utilitzar la Mitomicina C com a inhibidor de la proliferació cel·lular. En aquest cas, es van incubar les cèl·lules en presència de Mitomicina C durant 24h, es van fixar i es va realitzar una immunofluorescència per α -SMA. Es va comparar el percentatge de miofibroblastes presents a la zona del tall i a la zona confluent en presència o absència de Mitomicina C. La figura 12 detalla el disseny experimental utilitzat per realitzar l'estudi.

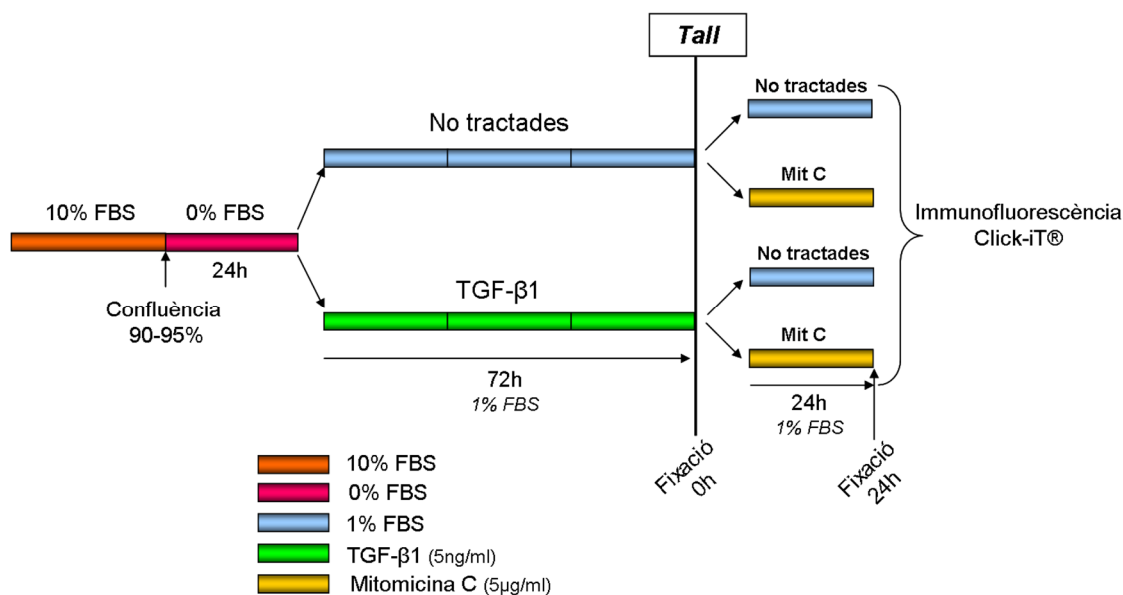


Figura 12.- Disseny experimental utilitzat per estudiar els fenotips cel·lulars presents en el tancament d'una ferida *in vitro* en un cultiu de fibroblastes procedents d'individus control i de pacients amb fibrosi pulmonar idiopàtica.

2.2.1.2 Mesura de la capacitat de tancament d'una ferida realitzada *in vitro* pels cultius de fibroblastes procedents d'individus control i de pacients amb fibrosi pulmonar idiopàtica

En segon lloc, vam avaluar la capacitat de tancament d'una ferida realitzada *in vitro* pels cultius de fibroblastes i miofibroblastes procedents d'individus control i de pacients amb FPI (Figura 13). Es van cultivar les cèl·lules en plaques de 6 pous en les condicions esmentades anteriorment. A continuació, es va realitzar un tall *in vitro* amb una punta de pipeta estèril i es van realitzar diversos rentats amb PBS 1x estèril.

Es van prendre imatges de camp clar de la ferida realitzada al cultiu a temps inicial (0h) i després de 24 i 48h en un microscopi d'epifluorescència invertit (Leica Microsystems, Alemanya) a 50x. Per tal d'obtenir el mateix camp durant l'adquisició de les imatges, es van fer marques properes a la zona del tall que van ser utilitzades com a referència. L'àrea tancada al llarg del temps va ser mesurada mitjançant el programa Image J, calculant la diferència entre l'àrea inicial de la ferida i l'àrea entre els dos marges de la ferida després de 24 i 48h.

Diversos tractaments van ser utilitzats amb aquest protocol experimental, com es detalla a continuació. Per tal d'avaluar el paper de la proliferació (i el de la migració) en el tancament de la ferida, les cèl·lules es van cultivar en presència o absència de Mitomicina C (5 mg/ml) durant 24 i 48h i es va mesurar l'àrea tancada amb el mètode ja esmentat.

Per avaluar l'efecte antifibròtic de la IL-1β i la PGE₂ en el tancament d'una ferida *in vitro* per part de fibroblastes i miofibroblastes, les cèl·lules es van incubar en presència de IL-1β (10 ng/ml;

R&D systems Minneapolis, USA) i de PGE₂ (5 ng/ml, Cayman chemicals, Michigan, USA) durant 24 i 48h i el tancament de la ferida es va mesurar com s'ha esmentat amb anterioritat.

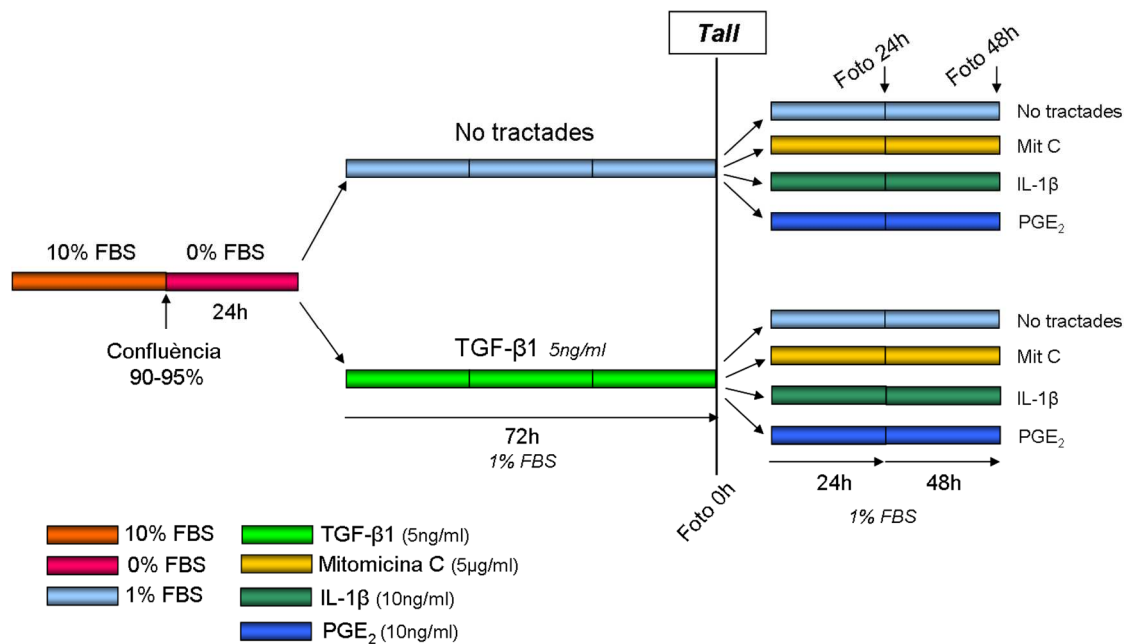


Figura 13.- Disseny experimental utilitzat per mesurar de la capacitat de tancament d'una ferida realitzada *in vitro* pels cultius de fibroblastes procedents d'individus control i de pacients amb fibrosi pulmonar idiopàtica.

2.2.2 Estudi de l'expressió de COX-2 en fibroblastes i miofibroblastes obtinguts d'individus control i pacients amb fibrosi pulmonar idiopàtica i en cèl·lules epitelials alveolars A549

En la resta d'experiments, el medi de cultiu es va retirar quan les cèl·lules estaven a un 80% de confluència i es van incubar en medi sense sèrum durant 24h. A continuació, diversos models experimentals es van dur a terme:

1) En el primer grup d'experiments, els fibroblastes van ser tractats en presència o absència d'IL-1β (10 ng/ml), un potent i conegut inductor de l'expressió de la COX-2 (Wilborn *et al.*, 1995), durant 4 i 24 h i es va mesurar l'expressió de COX-2, α-SMA, IL-1RI, IL-1RII i IL-1RAcP.

2) En el segon grup d'experiments, vam estudiar l'efecte del TGF-β1 (5 ng/ml) en cultius control i FPI durant 4, 24 i 72h sobre l'expressió de COX-2. A 72h de tractament amb TGF-β1 vam mesurar l'expressió de COX-2, α-SMA, col·lagen Iα1, col·lagen 3α1 i de IL-1RI, IL-1RII i IL-1RAcP.

Amb aquests experiments vam establir un model *in vitro* de transformació fibroblast-miofibroblast (FMT) i transició epiteli-mesenquimal (EMT) incubant fibroblastes i cèl·lules de la línia epitelial de pulmó A549 respectivament, amb TGF- β 1 durant 72h. El procés de EMT també va ser caracteritzat per l'estudi dels canvis en l'expressió de col·lagen α 1, de la proteïna E-cadherina i de la proteïna del citoesquelet F-actina per marcatge amb fal·loïdina.

3) En un tercer grup d'experiments, vam estudiar cèl·lules pre-tractades durant 72h amb TGF- β 1 (Figura 14). En aquests experiments, es va retirar el TGF- β 1 després de 72h i es va canviar el medi de cultiu a medi nou amb els estímuls corresponents. Vam estudiar l'efecte d'IL-1 β (10 ng/ml per fibroblastes i 1 ng/ml per cèl·lules A549) i PGE₂ (5 ng/ml), l'efecte de l'inhibidor selectiu de la COX-2 Celecoxib (10 μ M, Sigma) durant 24h addicionals. Les raons d'utilitzar concentracions diferents d' IL-1 β segons el tipus cel·lular, es van basar en primer lloc en la literatura (Roca-Ferrer *et al.*, 2011; Ling *et al.*, 2010) i en segon lloc en l'experiència del laboratori. Vam obtenir nivells similars de PGE₂ en ambdós tipus cel·lulars utilitzant les concentracions descrites, permetent les comparacions entre els diferents grups.

Vam mesurar l'expressió de COX-2, COX-1, α -SMA, IL-1RI, la secreció de PGE₂ i la proliferació en aquestes condicions i es van comparar aquests resultats amb els obtinguts amb un tractament curt de 4h de TGF- β 1.

Alhora, es va estudiar l'efecte conjunt de TGF- β 1 i d'IL-1 β sobre l'expressió de COX-2, COX-1 i α -SMA a temps curts de 4h. A més, es van reincubar amb TGF- β 1 durant 4 i 24h addicionals després del tractament durant 72h amb TGF- β 1.

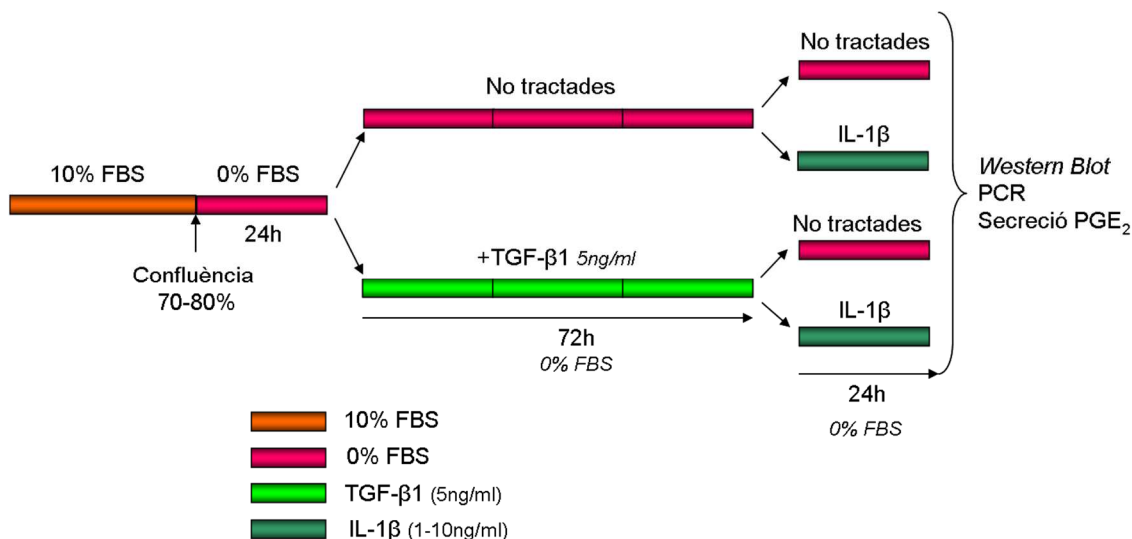


Figura 14.- Disseny experimental utilitzat per estudiar l'expressió de COX-2 fibroblastes i miofibroblastes obtinguts d'individus control i pacients amb fibrosi pulmonar idiopàtica i en cèl·lules epitelials alveolars A549.

2.3 Western blot

2.3.1 Extracció de proteïnes

Les cèl·lules es van cultivar en plaques de cultiu de 90 cm² i es van realitzar els tractaments corresponents segons el disseny experimental. A continuació, per obtenir l'extracte proteic, les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS 1x fred i es van lisar directament en la superfície de la placa amb 200 µl de tampó *RIPA* (TrisHCl 50mM, NaCl 150mM [pH 7,4], NP40 1%, Triton X-100 1%, SDS 0.1% i 5 µl/ml de cocktail inhibidor de proteases (Sigma) afegit immediatament abans de la lisi). El lisat es va mantenir en gel durant 20 minuts i posteriorment es van sonicar les mostres amb dos pols de 15s utilitzant un sonicador (Branson Sonifier 250, Danbury, CT, USA). L'homogenat es va centrifugar immediatament a 14,000 x g durant 10 minuts a 4°C i es va recollir el sobrenedant amb l'extracte proteic en un nou tub, eliminant el pellet amb restes cel·lulars. L'extracte es va mantenir congelat a -80°C fins al moment de mesura de la concentració proteica.

2.3.2 Determinació de la concentració de proteïnes

Per assegurar que la mateixa quantitat de proteïna era carregada a l'assaig de western blot, la quantitat de proteïna present als lisats cel·lulars va ser quantificada utilitzant el mètode de *Lowry*. Aquesta tècnica permet mesurar la quantitat de proteïna total present a la mostra utilitzant concentracions conegudes d'albumina sèrica bovina (BSA) com a estàndard.

Breument, els estàndards es van preparar diluint *Protein Standard Solution* (Sigma) en aigua destil·lada fins a un volum final de 250 µl. De la concentració màxima de 400 µg/ml es van fer dilucions seriadades fins a una concentració mínima de 50 µg/ml. El blanc es va preparar amb 250 µL d'aigua. Les mostres es van analitzar a una dilució 1:20 en aigua.

En primer lloc, es va afegir el reactiu de *Lowry* (Sigma), es van passar les mostres pel vòrtex i es va deixar incubant durant 20 minuts. A continuació, es va afegir el segon reactiu: *Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent Working Solution* (Sigma), que es va incubar durant 30 minuts, temps necessari per desenvolupar la reacció colorimètrica. El contingut de cada tub es va transferir a una placa de 96 pous i totes les mostres es van avaluar per duplicat. L'absorbància es va determinar a 630 nm per espectrofotometria utilitzant un lector de plaques (Thermo Multiskan EX).

2.3.3 Electroforesi de proteïnes

En condicions desnaturalitzants, les proteïnes es poden separar segons la seva mida en gels d'acrilamida. Degut a que la migració de les proteïnes amb similars pesos moleculars pot variar segons les diferències en la seva estructura secundària, terciària o quaternària, es va utilitzar dodecil-sulfat sòdic (SDS) per reduir les proteïnes a la seva estructura primària, tenint una càrrega negativa pràcticament uniforme al llarg de tot el polipèptid. El voltatge aplicat durant l'electroforesi permet la migració dels anions i les proteïnes es separen pel seu pes molecular.

Entre 12,5 i 15 µg de proteïna total de cada mostra van ser desnaturalitzats en un termociclador (MJ Research PTC-100, USA) (100°C, 5 minuts) en presència de tampó de càrrega (*NuPage lithium dodecyl sulfate (LDS) sample Buffer*) i agent reductor NuPAGE, que conté ditiotreitòl (DTT) (ratio 1:10). A continuació, les mostres es van carregar en gels de Tris-Acetats al 7% (Invitrogen) en SDS-Tampó d'electroforesi (*Novex TRIS-Acetate SDS Running Buffer 20X*) col·locats en una cambra d'electroforesi vertical, *XCell Sure Lock Mini-Cell* (Invitrogen). Per mantenir les proteïnes en estat reduït durant l'electroforesi del gel, es va afegir al tampó d'electroforesi 500 µL d'un antioxidant (NuPAGE) amb N,N-Dimetilformamida.

Un marcador de pes molecular conegut (*SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard*) es va carregar al gel com a referència. Aquest marcador facilita la identificació de la banda, ja que indica el pes molecular en kilodaltons (kDa) de les proteïnes i alhora permet una avaluació ràpida de l'eficiència de la transferència. Les proteïnes van ser separades segons pes molecular, es va dur a terme l'electroforesi durant 90 minuts a 125 V utilitzant una font d'alimentació *BioRad Power Pac 1000* (BioRad Laboratories Ltd., Hemel Hemstead, UK).

2.3.4 Transferència a membrana

Les proteïnes van ser transferides utilitzant un sistema de transferència en sec (*iBlot® Dry Blotting System*, Invitrogen). Aquest sistema transfereix les proteïnes des dels gels de poliàcrilamida en 7 minuts sense necessitat de tamps addicionals. El *iBlot* inclou una membrana de nitrocel·lulosa de 0.2 µm integrada, a on es van transferir les proteïnes. L'ordre de les capes en el sistema de transferència va ser, d'abaix a dalt: ànode amb la membrana de nitrocel·lulosa incorporada, gel de poliàcrilamida, paper de filtre, càtode i finalment una esponja.

2.3.5 Bloqueig d'unions inespecífiques

Després de la transferència, amb l'objectiu de bloquejar els llocs d'unió inespecífics de les membranes, es van col·locar en un tampó de bloqueig amb 5% de llet en pols i 0,05 % Tween®20 en PBS durant 1 h a temperatura ambient en agitació suau en un agitador (Stuart Scientific SO3 Orbital Shaker, UK).

2.3.6 Immunodetecció proteica i anàlisi densitomètric

Les membranes es van incubar en una solució de tampó de bloqueig amb anticòs primari detallats a la taula 3, tota la nit a 4°C en agitació.

A continuació, les membranes es van rentar en PBS-Tween®20 al 0,05% i es van incubar amb l'anticòs secundari (*Horseradish Peroxidase-labeled*)(Santa Cruz Biotechnologies) corresponent diluït 1:3000 en tampó de bloqueig durant 2 hores a temperatura ambient. En el cas de la β-actina, la dilució del secundari va ser 1:10.000.

Taula 3.- Anticossos utilitzats en la tècnica de *western blot*

Anticòs	Casa comercial	Pes Molecular	Font	Dilució
Anti COX-2	Cayman	~72 kDa	<i>Mouse</i>	1:1000
Anti COX-1	Santa Cruz	~72 kDa	<i>Goat</i>	1:1000
Anti α -SMA	Sigma	~42 kDa	<i>Mouse</i>	1:1000
Anti β -actina	Sigma	~42 kDa	<i>Mouse</i>	1:10000
Anti ERK 1/2	Cell signaling	~42-44 kDa	<i>Rabbit</i>	1:1000
Anti E-cadherina	BD Biosciences	~120 kDa	<i>Mouse</i>	1:1000
Anti IL-1RI	Santa Cruz	~80 kDa	<i>Rabbit</i>	1:1000
Anti IL-1RII	Santa Cruz	~46 kDa	<i>Mouse</i>	1:1000
Anti IL-1RAcP	Santa Cruz	~66 kDa	<i>Mouse</i>	1:1000

Finalment, després rentar un altre cop les membranes, es van incubar amb ECL (*Enhanced Chemiluminescent Substrate*) (Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Rockford, IL, USA) durant 5 minuts. Les bandes proteiques quimioluminiscentes es van detectar amb el CCD càmera System LAS 3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan).

Les densitometries es van realitzar utilitzant el software Image Gauge v.4.0. Els resultats es van analitzar en comparació amb la proteïna constitutiva β -actina en el cas dels fibroblastes i respecte a p44/42 MAPK (ERK1/2) en el cas de les cèl·lules A549, degut a que els nivells de β -actina van experimentar canvis després del tractament amb TGF- β 1.

2.4 Immunofluorescència

Les cèl·lules es van cultivar en CultureSlides® de 4 pous (BD Biosciences, USA) i després de realitzar els tractaments segons disseny experimental, es van fixar amb paraformaldehyd al 4% fred durant 15 minuts.

Per realitzar la immunocitoquímica, les cèl·lules es van permeabilitzar amb Triton-X 100 al 0,2% i posteriorment es van bloquejar en PBS-BSA 1% durant 1 hora. A continuació, es van incubar a 37°C amb els anticossos primaris *goat* policlonal anti-COX-2 (Santa Cruz Biotechnologies), *mouse* monoclonal anti- α -SMA (Sigma) o *rabbit* policlonal anti-IL-1RI (Santa Cruz Biotechnologies) a concentració 1:500 durant 1 hora i posteriorment amb els secundaris corresponents units a un fluorocrom.

Es van utilitzar anticossos secundaris *Alexa Fluor 555[®] donkey anti-goat IgG* (H+L, verd), *Alexa Fluor 488[®] goat anti-mouse IgG* (H+L, verd), *Alexa Fluor[®] 594 Goat Anti-Mouse IgG* (H+L, vermell), i *Alexa Fluor[®] 594 Donkey Anti-rabbit IgG* (H+L, vermell) (Invitrogen) en una dilució 1:500, durant 1h a 37°C. Pel marcatge de la F-actina, les cèl·lules es van incubar amb Faloidina-TRITC (Sigma) durant 1h. Els nuclis es van tenyir amb DAPI 1:10.000 durant 5 minuts i es van muntar les preparacions amb el medi *Prolong[®] Gold Antifade reagent* (Invitrogen, Molecular Probes).

Les preparacions es van analitzar utilitzant un microscopi d'epifluorescència invertit DMI6000 B (Leica Microsystems, Germany) a x200 o x400 augments. Per realitzar comptatges cel·lulars, es van fotografiar de 10 a 12 camps aleatoris per pou. Les imatges van ser analitzades utilitzant el programa Image J.

2.4.1 Coimmunofluorescència

Pels experiments amb doble marcatge per immunofluorescència de COX-2 i α -SMA o bé de IL-1RI i α -SMA, es va incubar primer l'anticòs primari per COX-2 o per IL-1RI i el seu corresponent secundari durant 45 min cadascun i després es va repetir el procés amb l'anticòs primari i secundari per α -SMA durant 45 min cadascun. Aquest ordre va ser establert de manera empírica en un conjunt d'experiments que van demostrar una reactivitat creuada molt baixa entre anticossos. La fal·loïdina tampoc va mostrar reactivitat creuada amb els anticossos primari i secundari de COX-2.

2.5 Immunohistoquímica

Es van obtenir talls histològics procedents de biòpsies d'individus sans amb pneumotòrax espontani (N = 10) i de pacients amb fibrosi pulmonar idiopàtica (N = 12).

Els talls es van desparafinar durant 15 minuts a 65°C seguits d'una bateria de desparafinat composta per alcohols en concentració decreixent. Les mostres es van sotmetre a un desenmascarament antigènic durant 40 minuts a 80°C en tampó citrat (0.01M) a pH de 6. Posteriorment, es van incubar en tampó de bloqueig PBS 1x + 0.05% de Trítion X-100 + 3% *Goat serum* (Sigma) durant 30 minuts a temperatura ambient.

Es van incubar amb l'anticòs primari *goat* policlonal IgG anti COX-2 (Santa Cruz Biotechnology), *mouse* monoclonal anti α -SMA (Sigma), *rabbit* policlonal anti IL-1RI o bé *mouse* monoclonal anti Vimentina (Clon Vim 3B4, Dako) diluïts 1:1000 en solució de bloqueig durant tota la nit a 4°C. Es van rentar les preparacions amb PBS, es va realitzar la inhibició de l'enzim peroxidasa endògena durant 5 minuts, seguits d'una incubació d'1 hora amb l'anticòs secundari del Kit *EnVision[™] Detection Systems Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse* (Dako, Dinamarca).

Finalment, es va revelar incubant les preparacions entre 5 i 7 minuts amb diaminobencidina (DAB) i es van contrastar els nuclis cel·lulars amb hematoxilina de Gill I durant

1 minut. Es van rentar les preparacions amb aigua corrent i es van contrastar submergint-les repetidament en una solució d'àcid acètic al 1%.

Les preparacions es van muntar amb el medi aquós *GlycerGel® Mounting Medium* (Dako) i es van observar al microscopi Olympus BX41 (Olympus Corporation, Tokio, Japan) a 200x.

2.6 Anàlisi de la replicació de DNA (Click-iT®)

Amb l'objectiu de determinar la proliferació cel·lular, es va utilitzar el kit comercial Click-iT® (Invitrogen). Aquest mètode es basa en la incorporació del nucleòsid modificat EdU (5-etinil-2'-deoxiuridina), un anàleg de la timidina que és incorporat al DNA durant la fase síntesi activa de DNA.

La detecció es basa en una reacció de "click": una reacció covalent catalitzada per Cu(I) entre una azida i un alquí. Aquest es troba integrat al EdU mentre que l'azida està conjugada a un marcador *Alexa Fluor® 488*, que emet fluorescència verda. El principal avantatge del marcatge amb Click-iT® EdU és que la petita mida de l'azida permet la detecció de l'EdU prèviament incorporat a les cèl·lules utilitzant condicions de fixació i permeabilització estàndards, que són suficients per que la detecció per Click-iT® arribi fins al DNA sense necessitat de desnaturalitzar-lo.

Es van realitzar dues variants del mateix mètode: una per citometria de fluxe (*Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Flow Cytometry Assay Kit*, Invitrogen) i l'altra per marcatge fluorescent observat per microscopia (*Click-iT® EdU Imaging Kit*, Invitrogen).

La preparació del cocktail de Click-iT® va ser comú per ambdues tècniques. La proporció dels reactius del kit es detalla a la taula 4.

Taula 4.- Cocktail de la reacció de Click-iT®

Components	µL per reacció
PBS	438
CuSO ₄	10
Alexa Fluor® 488 azida	1,2
10x <i>Reaction Buffer Additive</i>	50
Volum Total	500

2.6.1 Avaluació de la proliferació cel·lular per citometria de fluxe

Les cèl·lules van ser cultivades en plaques de 96 pocells per l'anàlisi de citometria. Un cop realitzats els tractaments corresponents, es van incubar els cultius durant un total de 2h amb 10 μ M de EdU abans de ser recollides. D'aquesta manera, es va poder visualitzar el total de cèl·lules en fase proliferativa del cultiu al llarg d'aquest període de temps, ja que són les que havien incorporat el nucleòsid EdU. A continuació, es van tripsinitzar les cèl·lules i es van fixar amb etanol de 70° fred, afegit al tub gota a gota i en agitació. Es van mantenir almenys 24h en etanol a -20°C. A continuació es van realitzar rentats amb PBS-BSA al 1% i es van incubar durant 15min amb Triton-X 100 a 0,5% per permeabilitzar-les.

Posteriorment, es va preparar el cocktail de reactius de Click-iT[®] segons les instruccions del fabricant. Es van afegir 500 μ L de cocktail per tub i es van incubar protegits de la llum durant 30 min. A continuació es va realitzar un rentat amb PBS-BSA 1% i es va resuspendre el pellet cel·lular en PBS-BSA al 0,5% per passar-lo per un citòmetre FACSCanto II (BS Biosciences). Els resultats van ser analitzats amb el programa FACSDiva.

La tècnica va ser validada amb un conjunt d'experiments realitzats incubant les cèl·lules amb concentracions creixents de sèrum. Els resultats estan presentats com a percentatge de cèl·lules que van incorporar el nucleòsid modificat EdU (% cèl·lules Click-iT[®] positives) respecte a les cèl·lules totals. Alhora, es van realitzar controls d'autofluorescència mesurant la fluorescència pròpia de les cèl·lules sense EdU i es va mesurar un control negatiu sense cocktail de Click-iT[®] per tal d'establir el criteri de positivitat.

2.6.2 Avaluació de la proliferació cel·lular per anàlisi d'imatge

Les cèl·lules van ser cultivades en CultureSlides[®] de 4 pocells per l'anàlisi per microscòpia de fluorescència. Un cop realitzats els tractaments corresponents, es van incubar els cultius durant un total de 2h amb 10 μ M de EdU i després van ser fixades amb paraformaldehid fred al 4% durant 15 minuts. Es van permeabilitzar les cèl·lules amb 0.5% Triton X-100 durant 30 min i es va afegir el cocktail Click-iT[®] d'acord amb les instruccions del fabricant durant 30 min a temperatura ambient i en fosc.

En alguns experiments, es va realitzar un marcatge conjunt per Click-iT[®] i per α -SMA. En aquest cas, després de la incubació amb el cocktail de Click-iT[®], es van bloquejar les preparacions durant 1h en PBS-BSA 1% a temperatura ambient i es va continuar el procés amb una immunofluorescència per α -SMA.

En tots els casos, els nuclis es van teñir amb DAPI 1:10000 durant 5 minuts i es van muntar les preparacions amb el medi *Prolong[®] Gold Antifade reagent* (Invitrogen, Molecular Probes). Les cèl·lules es van visualitzar en un microscopi d'epifluorescència (Leica Microsystems, Germany) a 200x.

Es van comptar 10 camps aleatoris per pocell el nombre de cèl·lules positives i negatives per Click-iT[®] i per α -SMA en els casos de marcatge conjunt. Els resultats estan presentats com a percentatge de cèl·lules que van incorporar el nucleòsid modificat EdU (% cèl·lules Click-iT[®] positives) respecte a les cèl·lules totals.

2.7 Detecció de citotoxicitat per kit LDH

Per tal de determinar la possible citotoxicitat de la Mitomicina C sobre un cultiu de fibroblastes primaris, es va utilitzar el kit *Cell-death LDH cytotoxicity detection kit* (Roche), d'acord amb les instruccions d'ús.

El kit de detecció de citotoxicitat és un mètode colorimètric basat en la mesura de l'activitat de l'enzim lactat deshidrogenasa (LDH) alliberat per part de les cèl·lules danyades. El LDH és un enzim citoplasmàtic estable present a totes les cèl·lules que és ràpidament alliberat al sobrenedant del cultiu cel·lular en cas de dany a la membrana plasmàtica, on es pot mesurar mitjançant una lectura d'espectrofotometria.

Per fer-ho, es recull el medi de cultiu lliure de cèl·lules i s'incuba amb els reactius del kit. L'activitat LDH es determina per un test enzimàtic detallat a la figura 15. En el primer pas, NAD^+ és reduït a NADH/H^+ per la conversió catalitzada per LDH de lactat a piruvat. En el segon pas, el catalitzador transfereix H^+ del NADH/H^+ a la sal de tetrazòlium que es redueix a formazan (color vermell). El formazan mostra un rang d'absorció amb un màxim al voltant dels 500 nm, on la sal de tetrazòlium no té absorció.

Un increment en el nombre de cèl·lules mortes resulta en un augment de l'activitat enzimàtica de la LDH en el sobrenedant del cultiu, que correlaciona directament amb un augment de formazan format durant un període de temps limitat. Per tant, la quantitat de color formada durant l'assaig és proporcional al nombre de cèl·lules lisades.

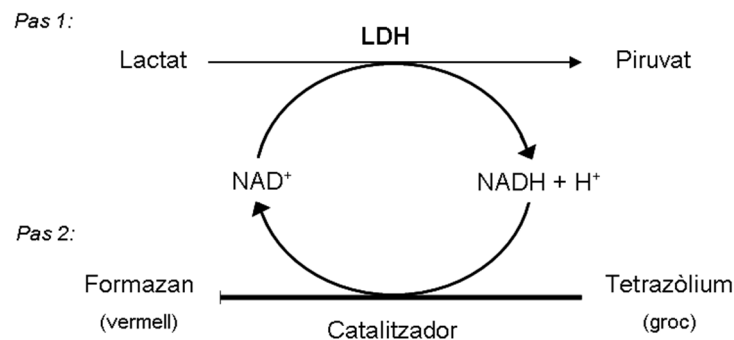


Figura 15.- Funcionament del kit *Cell-death LDH cytotoxicity detection* basat en la reacció catalitzada per l'enzim lactat deshidrogenasa (LDH).

De manera breu, els fibroblastes control i FPI van ser cultivats en plaques de 24 pous i cada condició es va realitzar per triplicat. Es van destinar pous als controls de la tècnica, corresponents de màxima alliberació de LDH o mort cel·lular màxima (*High Control*: amb un 2% Triton X-100) i mínima alliberació de LDH (*Low control*: medi de cultiu amb un 1% FBS). Les cèl·lules es van incubar durant 24h a 37°C i els sobrenedants es va recollir, es van transferir a una placa de 96 pous. Es va afegir la barreja de reactius del kit, es va incubar la placa durant 30 minuts a temperatura ambient i finalment es va fer la mesura d'absorbància a 490 nm en un lector de plaques.

Es va restar l'absorbància dels blancs a l'absorbància promig de les mostres i dels controls *high* i *low*. El percentatge de citotoxicitat va ser calculat com a: (Absorbància mostra – Absorbància del *low* control)/(Absorbància del *high* control – Absorbància del *low* control).

2.8 Aïllament de RNA i RT-qPCR

2.8.1 Extracció de RNA

L'RNA total va ser aïllat a temps 0h, 24h i 72h utilitzant el kit *RNeasy mini* (Qiagen) segons les instruccions del fabricant. El mètode d'extracció *RNeasy* es basa en la unió selectiva dels RNA de mida superior a 200 bases a una membrana de silici.

Les cèl·lules es van lissar en 600µL de tampó RLT, que ràpidament inactiva les RNases per mantenir la integritat del RNA. A continuació, es va afegir el mateix volum d'etanol per millorar les condicions d'unió del RNA a la columna *RNeasy Mini*. Els següents passos van ser una sèrie de rentats seguits de pols de centrífuga per eliminar les restes no desitjades i permetre la unió del RNA a la membrana present a la columna d'extracció. Finalment, es va eluir el RNA en 30µL d'aigua lliure de RNases i es va procedir a la seva quantificació utilitzant un espectrofotòmetre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Es va mesurar la seva absorbància a 260 nm i la seva puresa amb el ràtio A_{260}/A_{280} . Es va considerar el RNA com a pur quan el ràtio va presentar un valor proper al 2.

2.8.2 Retrotranscripció

Es va obtenir cDNA a partir d'1 µg d'RNA per transcripció-inversa amb el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcriptase kit* amb *RNase Inhibitor* (Applied Biosystems, Life Technologies).

En primer lloc, es va calcular el volum necessari de cada mostra per obtenir 1 µg d'RNA i es va afegir aigua lliure de nucleases fins a un volum final de 10 µL en tubs siliconats *Clear-view™ Snap-Cap microtubes* (Sigma). A continuació es va preparar la *Mix* amb els components necessaris per dur a terme la retrotranscripció en les proporcions indicades a la taula 5, amb un volum final de 10 µL de mix per reacció.

Taula 5.- Cocktail dels components utilitzats per la retrotranscripció

Components	µL per reacció
10x Buffer RT	2
dNTP Mix	0,8
10x Random Primers	2
MultiScribe™ MuLV transcriptasa inversa.	1
RNase Inhibitor	1
H ₂ O Lliure de Nucleases	3,2

Es van afegir 40 µL d'oli mineral a cada tub per evitar l'evaporació de les mostres durant la retrotranscripció. El procés es va realitzar en un termociclador (MJ Research PTC-100, USA) seguint els passos següents:

- 10 min a 25°C
- 120 min a 37°C
- 5 min a 85°C

Un cop finalitzada la retrotranscripció, les mostres es van mantenir a 4°C en cas de ser utilitzades durant les 24h posteriors o bé a -20°C per guardar-les durant períodes més llargs de temps.

2.8.3 PCR quantitativa

Amb el cDNA obtingut es va realitzar una PCR quantitativa en temps real amb sondes *TaqMan® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Life Technologies) pels següents gens:

- Col·lagen tipus I, alfa 1: *COL1A1*; Hs00164004_m1
- Col·lagen tipus III, alfa 1: *COL3A1*; Hs00164103_m1
- COX-2: *PTGS2*; Hs00153133_m1
- IL-1RI: *IL1R1*; Hs00991002_m1
- IL-1RII: *IL1R2*; Hs01030384_m1
- IL-1RAcP: *IL1RAP*; Hs00895050_m1
- RNA polimerasa II, polipèptid A: *POLR2A*; Hs00172187_m1

Les sondes Taqman® estan dissenyades per hibridar específicament amb la part central del cDNA objectiu, també anomenat amplicó i permeten mesurar la producció de productes de PCR mitjançant un sistema de sondes marcades mitjançant un fluorocrom a l'extrem 3' de la sonda i una molècula *quencher* a l'extrem 5'. Quan la sonda està intacta, la proximitat entre fluorocrom i *quencher* bloqueja l'emissió de fluorescència degut a l'efecte de transferència d'energia de ressonància de fluorescència (FRET). Durant la PCR, la sonda hibrida amb l'amplicó. Durant l'extensió de la cadena, la polimerasa es troba amb la sonda i la hidrolitza amb la seva activitat exonucleasa 5', fet que provoca la separació del *quencher* del fluorocrom i per tant, permet l'emissió de fluorescència. Així doncs, la fluorescència emesa està directament relacionada amb la quantitat de l'amplicó produït.

Per realitzar l'amplificació es va utilitzar *TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix 2X* (Applied Biosystems), que conté els *primers* necessaris per que s'iniciï la reacció d'amplificació i la polimerasa *AmpliTaq® Fast DNA Polymerase*, que talla les sondes Taqman® un cop s'han hibridat a la seqüència objectiu, alliberant els senyals fluorescents detectats durant la PCR.

La PCR es va dur a terme en un aparell 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) i es van utilitzar les plaques *MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate* (Applied Biosystems). Les condicions van ser les següents: 20 segons a 95°C per l'activació enzimàtica seguits de 40 cicles d'1 segon a 95°C i 20 segons d'elongació a 60°C. Els resultats es van normalitzar respecte a l'expressió del gen constitutiu o de referència RNA polimerasa II, polipèptid A. Els resultats es van calcular en funció del mètode $\Delta\Delta Ct$ i es van expressar en *expressió relativa* a les mostres control (t=0h).

2.9 Quantificació del col·lagen soluble pel mètode de *Sircol*

La quantitat de col·lagen soluble en els sobrenedants dels cultius de fibroblastes va ser quantificada mitjançant el kit comercial *Sircol Collagen Assay* (Biocolor, Belfast, UK).

Les proteïnes de col·lagen contenen un o més dominis amb una estructura de triple hèlix, descrites com a cadenes alfa. Els col·làgens fibril·lars (tipus I, II, III, V i XI) tenen la majoria de la seva estructura de cadena alfa formada per una seqüència repetida d'un tripèptid format per una Glicina cada tres residus d' aminoàcids [(Gly-X-Y)_n]. El mètode es basa en la unió del reactiu *Sirius Red* a aquesta estructura helicoidal [(Gly-X-Y)_n]. El *Sirius Red* és un tint aniònic amb cadenes àcides laterals que reacciona amb les cadenes laterals presents al col·lagen, sense distinció entre els tipus de col·lagen.

Aquest mètode és útil per quantificar el col·lagen sintetitzat per un cultiu cel·lular durant un experiment *in vitro*, però no per mesurar les fibres de col·lagen insoluble amb enllaços creuats covalents, que es poden mesurar pel mètode d'hidroxiprolina.

Breument, es van recollir 500 µL de sobrenedant de cada condició i es van concentrar durant tota la nit utilitzant el reactiu de concentració del kit. A continuació, es va afegir 1ml de colorant *Sirius Red* a cada tub i es van incubar en rotació suau durant 30 minuts a temperatura ambient per permetre la precipitació del col·lagen unit al colorant. Després de centrifugar a 12.000 g durant 10 minuts, els pellets de col·lagen tenyit van ser rentats amb 750 µL de reactiu

Acid-Salt Wash Reagent fred per retirar l'excés de colorant i tornats a centrifugar en les mateixes condicions esmentades. El pellets es van re-dissoldre en 250 μ L de NaOH 0,5 M i es va determinar l'absorbància a 540nm en un lector de plaques d'ELISA. Els resultats es presenten com a μ g de col·lagen secretat/ μ g de proteïna total per cada condició.

2.10 Determinació de PGE₂

Amb l'objectiu de mesurar la secreció de PGE₂ els sobrenedants dels cultius cel·lulars de fibroblastes i cèl·lules A549 van ser recollits, filtrats a través de filtres de 0,22 μ m (BD Biosciences) i congelats a -80 °C fins al moment de la mesura.

La concentració de PGE₂ es va determinar utilitzant el kit comercial *Prostaglandin E2 EIA Kit – Monoclonal* (Cayman chemicals) seguint les instruccions del fabricant.

Prostaglandin E2 EIA Kit – Monoclonal és un assaig competitiu basat en la competitivitat entre la PGE₂ i un conjugat de la PGE₂-acetilcolinesterasa (AChE)(PGE₂ *Tracer*) per una quantitat limitada d'anticòs monoclonal anti-PGE₂. Degut a que la concentració de PGE₂-*Tracer* es manté constant mentre que la de PGE₂ varia segons les mostres, la quantitat de PGE₂-*Tracer* que s'uneixi a l'anticòs monoclonal anti-PGE₂ serà inversament proporcional a la concentració de PGE₂ al pou (Figura 16).

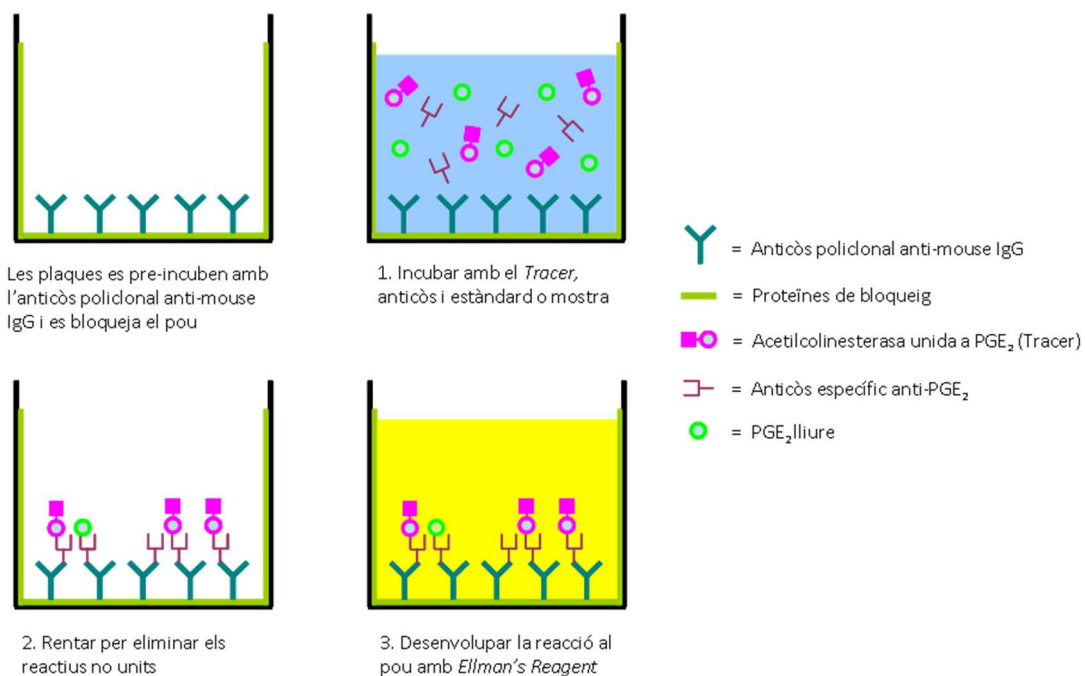


Figura 16.- Esquema del funcionament de l'assaig *Prostaglandin E2 EIA Kit – Monoclonal*

El complex PGE_2 -anticòs s'uneix a un anticòs policlonal *goat anti-mouse IgG* que ha estat prèviament adherit als pous. La placa es renta per eliminar aquells reactius que no s'han adherit i s'afegeix el reactiu *Ellman's Reagent*, que conté el substrat per la AChE. Es dona una reacció enzimàtica que produeix un color groc que absorbeix a 412 nm. La densitat d'aquest color, determinada per espectrofotometria, és proporcional a la quantitat de PGE_2 -Tracer unit al pou i alhora és inversament proporcional a la quantitat de PGE_2 lliure present en el pou durant la incubació. La tècnica va mostrar un límit de detecció d'aproximadament 15 pg/ml.

Breument, el contingut d'un vial de *EIA Buffer Concentrate* es va diluir amb 90 ml d'aigua doblement destil·lada (ddH₂O). El contingut d'un vial de 2,5 ml de *Wash Buffer Concentrate* es va diluir fins a 1L amb ddH₂O i es van afegir 0,5 mL de Tween®20. El contingut d'estàndard de PGE_2 van ser reconstituïts amb 1ml de *EIA Buffer* i guardats a 4°C. L'estàndard es va preparar mitjançant dilucions seriades des de 1000 pg/mL fins a 7,8 pg/mL. Els reactius *PGE₂ acetylcholine esterase tracer* i *PGE₂ monoclonal antibody* van ser reconstituïts amb 6ml de *EIA Buffer*.

Per dur a terme l'assaig, els reactius i 50 µL de mostra per duplicat es van afegir a la placa, segons les instruccions del kit. Es va incubar la placa tapada durant 18h a 4°C. Els pous de la placa es van rentar 5 vegades amb *Wash buffer* abans d'afegir 200µL de *Ellman's Reagent* a cada pou. La placa aïllada de la llum, es va incubar a temperatura ambient entre 60-90 minuts en agitació. Finalment, es va realitzar la lectura a 405 nm utilitzant un espectrofotòmetre (Thermo Multiskan EX). Els resultats es van expressar com a pg de PGE_2 /mg proteïna total per cada condició.

2.11 Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic es va dur a terme amb els programes SPSS 14.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) i GraphPad Prism (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA). Els resultats es presenten com a mediana i els percentils 25 a 75. Els comptatges cel·lulars es presenten com a valors mitjans ± SE (Error Standard).

El test estadístic no-paramètric Mann-Whitney U-test va ser utilitzat per realitzar comparacions entre els grups Control i FPI. Les comparacions entre tractaments dins de cada grup es van dur a terme amb el test de Wilcoxon. Per els experiments amb la línia cel·lular epitelials A549 es va utilitzar anàlisi estadístic paramètric, amb ANOVA seguida de la comparació múltiple del test post hoc de Dunnett. Les diferències es van considerar significatives quan el p-valor va ser inferior a 0,05.

IV - RESULTATS

1. ESTUDI DE LA POBLACIÓ BASAL DE MIOFIBROBLASTES EN CULTIUS DE FIBROBLASTES PRIMARIS CONTROL I DE FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA

Per a estudiar la població de miofibroblastes en cultius primaris de fibroblastes control i de FPI es va analitzar la presència de α -SMA, que es un marcador reconegut dels mateixos. La mesura de l'expressió d'aquest marcador en els nostres cultius de fibroblastes es va realitzar per mitjà de dues tècniques experimentals.

La primera tècnica va consistir en la mesura de l'expressió proteica d' α -SMA per *western blot*. El resultat es va normalitzar amb l'expressió de β -actina dels mateixos cultius. Es va observar una major expressió d' α -SMA en cultius de fibroblastes procedents de pacients amb FPI en comparació amb els cultius control (Figura 17).

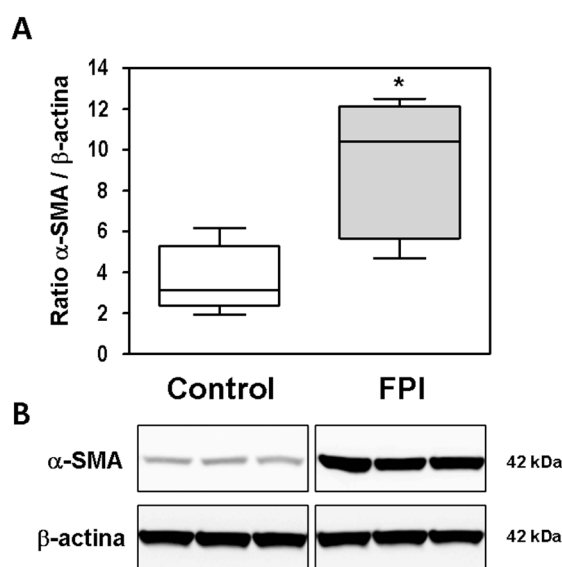


Figura 17.- Expressió d' α -SMA en cultius de fibroblastes primaris control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). Densitometria (A) i *western blot* representatiu de l'expressió d' α -SMA i de β -actina en llisats cel·lulars procedents de cultius de fibroblastes control i FPI (B). El resultat es mostra en relació a la expressió de β -actina. N = 5. * $p < 0.05$ comparat al grup control.

La segona tècnica emprada per estudiar l'expressió de α -SMA als cultius control i FPI va consistir en el marcatge per immunofluorescència de les cèl·lules positives per la proteïna (Figura 18). Aquesta tècnica, a diferència del *western blot*, ens permet comptabilitzar el percentatge de miofibroblastes que hi ha als cultius en relació al fibroblastes totals.

Un cop realitzada la immunofluorescència, es van comptar en 12 camps aleatoris les cèl·lules que presentaven marcatge per α -SMA. El percentatge de cèl·lules α -SMA positives va ser significativament superior als cultius procedents de pacients amb FPI en comparació als cultius control, confirmant els resultats observats per *western blot*. A la figura 19 es presenta una imatge representativa d'aquesta tècnica, a on podem observar un major nombre de miofibroblastes als cultius de fibroblastes de pacients fibròtics que als cultius control.

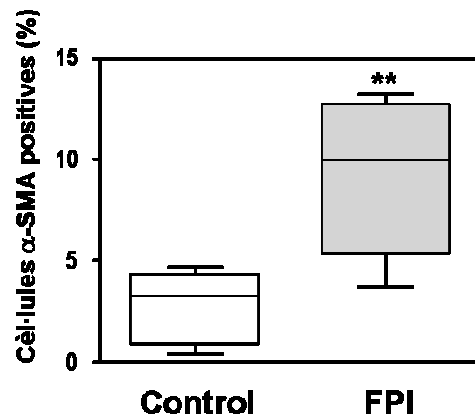


Figura 18.- Determinació del percentatge de cèl·lules α -SMA positives en cultius de fibroblastes primaris control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) per immunofluorescència. Es va realitzar una immunofluorescència d' α -SMA i es van comptar en 12 camps aleatoris les cèl·lules positives per aquesta proteïna. Els resultats es presenten en percentatge respecte a les cèl·lules totals. N = 6. ** $p < 0.01$ comparat al grup control.

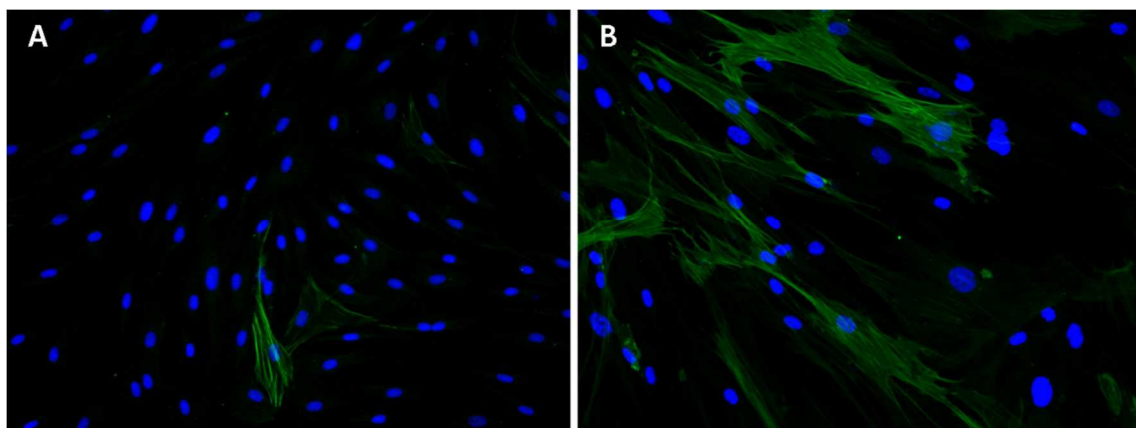


Figura 19.- Imatge representativa d'immunofluorescència d' α -SMA en cultius de fibroblastes primaris control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). Marcatge d' α -SMA en un cultiu control (A) i en FPI (B) on la tinció d' α -SMA es presenta en verd i els nuclis estan tenyits amb DAPI en color blau (augment original 200x).

2. OBTENCIÓ D'UN CULTIU ENRIQUIT EN MIOFIBROBLASTES UTILITZANT TGF- β 1 COM AGENT INDUCTOR DE LA TRANSICIÓ FIBROBLAST-MIOFIBROBLAST

2.1 El tractament amb TGF- β 1 indueix un increment de la transició fibroblast-miofibroblast dosi-depenent

Amb l'objectiu d'obtenir un cultiu amb un alt percentatge de miofibroblastes, es va utilitzar el factor pro-fibròtic factor de transformació de creixement beta 1 (TGF- β 1), un potent inductor de la transició de fibroblast a miofibroblast (FMT).

En primer lloc, es va realitzar una dosi resposta a TGF- β 1, per tal de determinar la concentració òptima d'inducció de transformació de fibroblastes a miofibroblastes per TGF- β 1. Els cultius de fibroblastes control i FPI van ser incubats a concentracions creixents de TGF- β 1 (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 i 10 ng/ml) durant 24h. Posteriorment, les cèl·lules van ser fixades i es va realitzar una immunofluorescència per marcar la presència d' α -SMA i comptabilitzar el nombre de miofibroblastes al cultiu (figura 20). El comptatge de les cèl·lules α -SMA positives va determinar que el TGF- β 1 va induir un increment significatiu del nombre de miofibroblastes de manera dosi-depenent. Es va escollir la dosi de 5 ng/ml com la concentració idònia per realitzar els posteriors experiments d'inducció de la FMT.

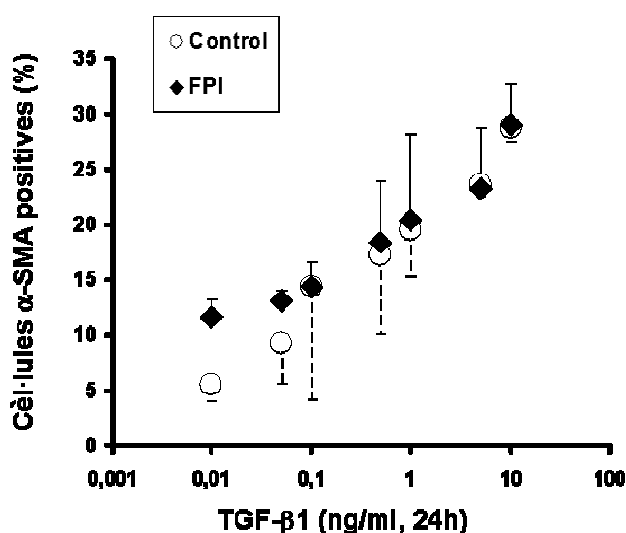


Figura 20.- Increment dosi-depenent del percentatge de cèl·lules α -SMA positives en cultius de fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) en resposta a TGF- β 1. Les cèl·lules van ser tractades durant 24h amb concentracions creixents de TGF- β 1 i es va realitzar el comptatge de cèl·lules α -SMA positives marcades per immunofluorescència. Els resultats estan expressats com a percentatge de cèl·lules α -SMA positives sobre cèl·lules totals. N = 4 Controls, N = 5 FPI.

2.2 El tractament amb TGF- β 1 indueix un increment de la transició fibroblast-miofibroblast temps-depenent

Un cop escollida la dosi de 5 ng/ml de TGF- β 1, es va dissenyar un experiment de temps-resposta per determinar el temps d'incubació necessari per obtenir un cultiu amb un percentatge elevat de miofibroblastes.

Per realitzar-ho, es van incubar els fibroblastes control i FPI durant 4, 24 i 72h amb 5 ng/ml de TGF- β 1. Com s'observa a la figura 21, el tractament amb TGF- β 1 va induir un increment significatiu en el nombre de miofibroblastes de manera temps-depenent, assolint valors estadísticament significatius a 24 i 72h a cultius control i FPI. El tractament va induir un nombre similar de miofibroblastes a ambdós cultius als dos temps, perdent les diferències que hi havia de forma basal. A 72h, al voltant d'un 80% de les cèl·lules quantificades van ser α -SMA positives.

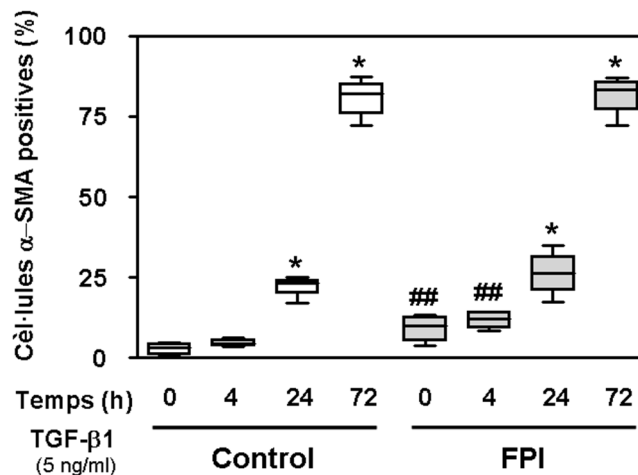


Figura 21.- Increment temps-depenent del percentatge de cèl·lules α -SMA positives en cultius de fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) en resposta al TGF- β 1. Les cèl·lules van ser tractades amb 5 ng/ml TGF- β 1 durant 4, 24 i 72h i es va realitzar el comptatge de cèl·lules α -SMA positives marcades per immunofluorescència. Els resultats estan expressats com a percentatge de cèl·lules α -SMA positives sobre cèl·lules totals. N = 6 * P<0.05 comparat a les respectives cèl·lules no tractades, ## P<0.01 comparat al grup control en les mateixes condicions.

Les imatges obtingues es poden observar a la figura 22, on es mostren imatges representatives d'immunofluorescència. El tractament amb TGF- β 1 a les condicions que em triat (5 ng/ml, 72h) produeix un increment molt evident del nombre de miofibroblastes als cultius control i FPI.

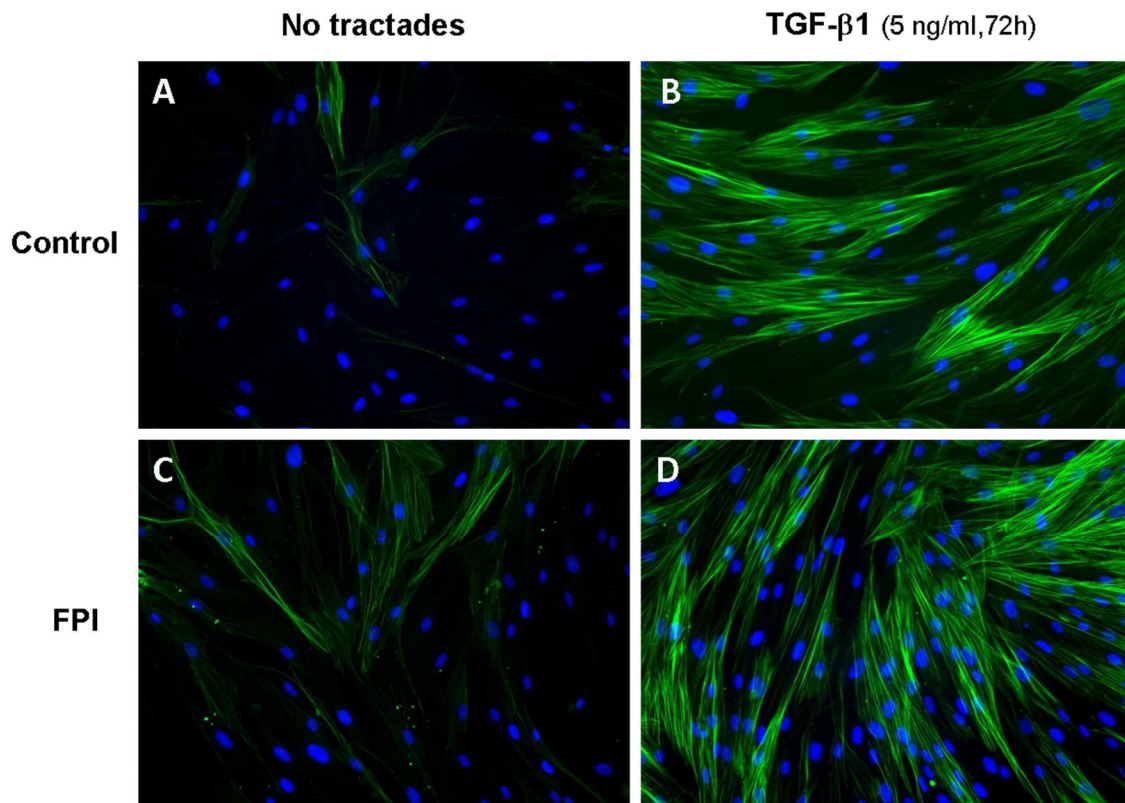


Figura 22.- Immunofluorescència representativa de l'expressió d' α -SMA en cultius control i amb fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) incubats en absència o en presència de TGF- β 1. Les cèl·lules van ser incubades durant 72h amb medi sense sèrum (A,C) o amb 5 ng/ml TGF- β 1 (B, D), es van fixar i es va realitzar una immunofluorescència per marcar els miofibroblastes, és a dir, les cèl·lules positives per α -SMA (verd). Els nuclis van ser tenyits amb DAPI en color blau (augment original 200x).

2.3 Expressió de col·lagen induïda per TGF- β 1 en cultius control i amb fibrosi pulmonar idiopàtica

A continuació vam avaluar la síntesi de col·lagen tipus 1 alfa 1 (COL1A1) i col·lagen tipus 3 alfa 1 (COL3A1) en cultius de fibroblastes control i FPI tractats amb TGF- β 1. L'increment en la producció de matriu extracel·lular és una característica pròpia del fenotip miofibroblast. Per tant, el tractament amb TGF- β 1 hauria d'estar associat a un augment de la síntesi de col·lagen.

Es va mesurar per RT-PCR la síntesi de col·lagen en fibroblastes control i FPI de manera basal i en presència o absència de TGF- β 1 durant 72h. La inducció de la FMT es va veure associada a un increment significatiu de l'expressió del COL1A1 (Figura 23), tant en cultius control com FPI. Aquest increment va ser superior als cultius FPI en comparació als control.

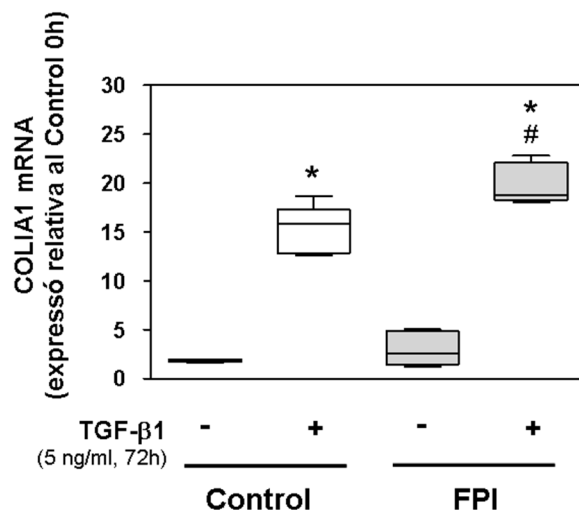


Figura 23.- Expressió de Col·lagen $\alpha 1$ en cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) en presència i absència de TGF- $\beta 1$. Es van incubar fibroblastes control i FPI en presència o absència de TGF- $\beta 1$ (5ng/ml, 72h) i es va mesurar l'expressió de col·lagen $\alpha 1$ per RT-PCR. Els resultats es mostren de forma relativa a l'expressió del grup control a 0h. N = 6. * $p < 0.05$ comparat a les respectives cèl·lules no tractades, # $p < 0.05$ respecte al grup control en les mateixes condicions.

De la mateixa manera, el tractament amb TGF- $\beta 1$ a 5 ng/ml durant 72h també va induir un increment significatiu en la producció de col·lagen $3\alpha 1$ en cultius control i FPI (Figura 24).

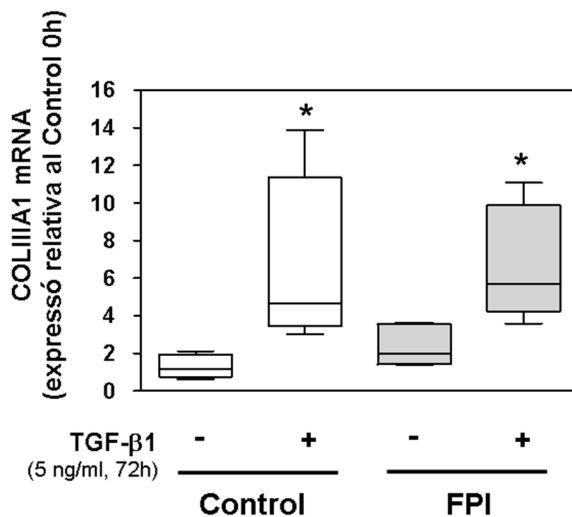


Figura 24.- Expressió de Col·lagen $3\alpha 1$ en cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) en presència i absència de TGF- $\beta 1$. Es van incubar fibroblastes control i FPI en presència o absència de TGF- $\beta 1$ (5ng/ml, 72h) i es va mesurar l'expressió de col·lagen $3\alpha 1$ per RT-PCR. Els resultats es mostren de forma relativa a l'expressió del grup control a 0h. N = 6. * $P < 0.05$ comparat a les respectives cèl·lules no tractades.

Amb l'objectiu de mesurar el col·lagen secretat per fibroblasts control i FPI també vam dur a terme l'assaig del *Sircol* en les mateixes condicions experimentals esmentades anteriorment.

A la figura 25, es presenten els resultats com a col·lagen secretat (μg)/proteïna total (μg). Tot i que es va trobar el mateix patró d'expressió de col·lagen que a la mesura d'expressió de mRNA, no es van observar diferències significatives entre fibroblastes control i FPI. Per aquest motiu, vam considerar que l'anàlisi per *Sircol* del col·lagen secretat no va tenir sensibilitat suficient per trobar aquestes diferències en les nostres mostres.

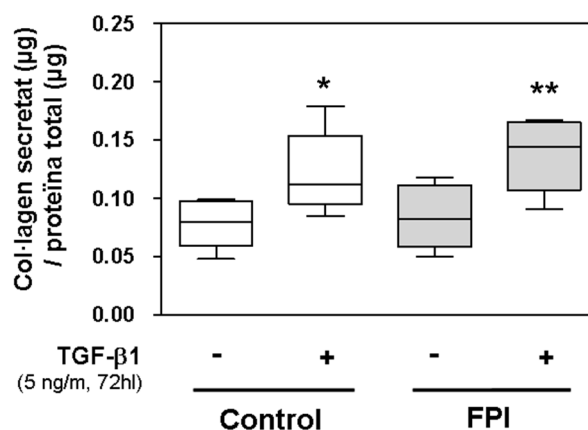


Figura 25.- Col·lagen secretat per fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) en presència o absència de TGF- β 1. Les cèl·lules es van incubar en presència o absència de TGF- β 1 durant 72h (5ng/ml) i es va recollir el sobrenedant dels cultius control i FPI per mesurar el contingut de col·lagen utilitzant el kit comercial *Sircol*. Els resultats es presenten com a col·lagen secretat (μg) / contingut de proteïna total (μg). N = 6 Control, N = 7 FPI. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparat a les respectives 72h no tractades.

3. ESTUDI DE LA MIGRACIÓ I PROLIFERACIÓ DELS MIOFIBROBLASTES PROCEDENTS DE CULTIUS CONTROL I DE FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA

3.1 Percentatge de cèl·lules α -SMA positives a confluència i tractades amb TGF- β 1 en medi suplementat amb 1% de sèrum fetal boví

Per tal d'analitzar la migració i proliferació de fibroblastes i miofibroblastes procedents de cultius control i FPI vam establir un assaig de tancament d'un tall o ferida *in vitro*. Les cèl·lules es van cultivar fins a la confluència per aconseguir que el tall fos la única zona on poguessin migrar i així poder mesurar el seu tancament. A més a més, es van mantenir els cultius amb un percentatge baix de sèrum fetal boví (FBS) d'un 1% per facilitar un metabolisme cel·lular actiu durant l'experiment, aconseguint més migració i proliferació.

▪ Comptatge de cèl·lules α -SMA positives a confluència tractades amb TGF- β 1 en medi amb 1% de sèrum fetal boví

En primer lloc, vam obtenir un cultiu amb un alt percentatge de miofibroblastes incubant les cèl·lules confluents amb TGF- β 1 durant 72h en medi amb un 1% FBS. En aquestes condicions, vam repetir els comptatges de cèl·lules α -SMA positives per immunofluorescència per comprovar si es mantenia la capacitat d'inducció de la transició fibroblast-miofibroblast (FMT) per TGF- β 1 (Figura 26).

Els resultats van ser molt similars als descrits anteriorment en la inducció de la FMT. En les cèl·lules no tractades el percentatge de cèl·lules α -SMA positives va ser significativament superior als cultius FPI en comparació amb els control. Després del tractament amb TGF- β 1, es van perdre aquestes diferències. El percentatge de miofibroblastes després de la incubació amb TGF- β 1 va ser significativament superior en comparació amb els cultius no tractats, però lleugerament inferior al obtingut en les condicions anteriors. Aquest fet pot ser degut a la presència de sèrum al medi de cultiu i a l'estat de confluència de les cèl·lules.

A la figura 27, podem observar l'increment de miofibroblastes en cultius control i FPI tractats amb TGF- β 1 per immunofluorescència.

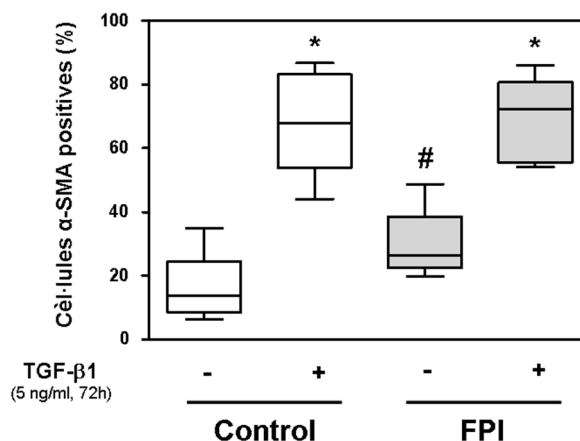


Figura 26.- Percentatge de cèl·lules α -SMA positives en cultius de fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) en confluència, en absència o presència de TGF- β 1 amb 1% sèrum fetal boví (FBS). Les cèl·lules confluents van ser tractades amb 5 ng/ml TGF- β 1 durant 72 en medi a l'1% FBS i es va realitzar el comptatge de cèl·lules α -SMA positives marcades per immunofluorescència. Els resultats estan expressats com a % de cèl·lules α -SMA positives sobre cèl·lules totals. N = 6 Controls, N = 5 FPI. * p <0.05 comparat amb les respectives cèl·lules no tractades, # p <0.05 respecte al grup control en les mateixes condicions.

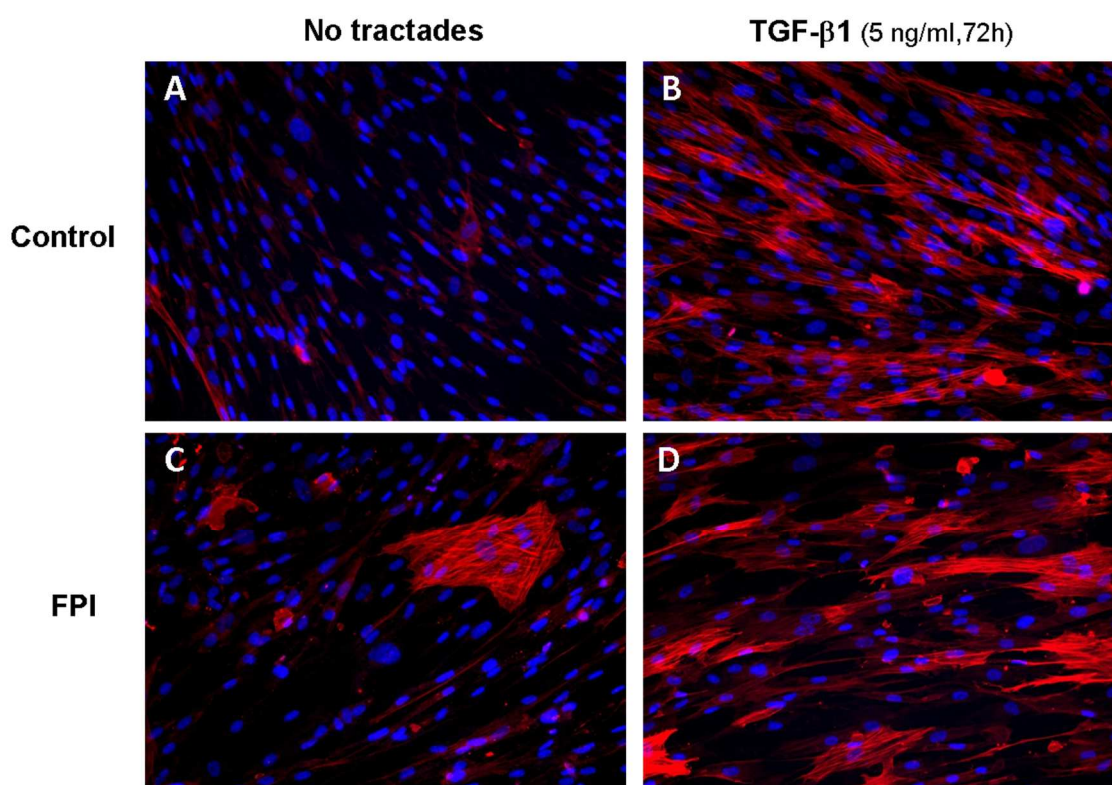


Figura 27.- immunofluorescència de l'expressió d' α -SMA en cultius control i fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) en confluència, en absència o presència de TGF- β 1 amb 1% sèrum fetal boví (FBS). Les cèl·lules confluents van ser incubades durant 72h amb medi al 1% FBS (A,C) o amb 5 ng/ml TGF- β 1 en medi a l'1% FBS (B,D). Els nuclis van ser tenyits amb DAPI en color blau i la presència d' α -SMA s'observa en vermell (augment original 200x).

3.2 Comparació del percentatge de miofibroblastes presents a les zones confluent i del tall en cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica

Un cop obtingut el cultiu amb alt percentatge de miofibroblastes, vam realitzar un tall o ferida a la monocapa cel·lular utilitzant una punta de pipeta com es descriu a l'apartat corresponent de material i mètodes. Es va canviar el medi de cultiu, retirant el TGF- β 1 i es van incubar les cèl·lules amb medi nou a l'1% de FBS. Després de 24h, es van fixar les cèl·lules i es va realitzar una immunofluorescència per marcar els miofibroblastes presents tant a la zona confluent com a la zona del tall.

En la zona del tall després de 24h, el nombre de miofibroblastes va ser significativament superior en cultius FPI respecte els control, tant en aquells pre-tractats amb TGF- β 1 com en els no tractats (Fig. 28). Aquest resultat va indicar diferències en el comportament dels miofibroblastes control i FPI en el tancament d'una ferida *in vitro*.

El percentatge de miofibroblastes va ser significativament inferior en la zona del tall respecte a la zona confluent de cultius control tractats amb TGF- β 1 i no tractats. Als cultius FPI, en canvi, només hi va haver diferències en aquells cultius tractats amb TGF- β 1. En els cultius FPI no tractats el percentatge de miofibroblastes no va variar en la zona confluent respecte a la zona del tall.

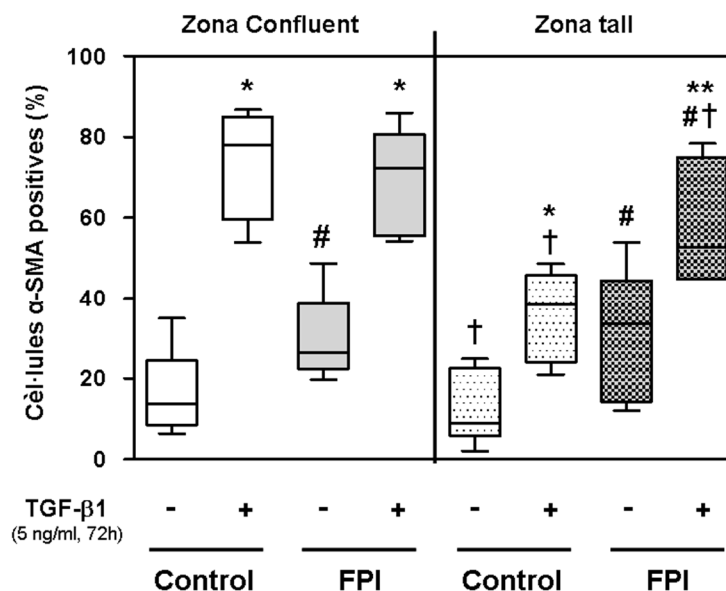


Figura 28.- Miofibroblastes presents a la zona confluent i a la zona del tall de cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) pre-tractats en absència o presència de TGF- β 1. Es van incubar els fibroblastes control i FPI amb o sense TGF- β 1 durant 72h i es va realitzar una ferida en la monocapa cel·lular. Després de 24h es van fixar les cèl·lules i es va realitzar una immunofluorescència per comptar el percentatge de cèl·lules α -SMA positives presents tant a la zona confluent com a la zona del tall. Els resultats estan presentats com a percentatge de cèl·lules α -SMA positives respecte a cèl·lules totals. N = 7. * p <0.05 comparat amb les respectives cèl·lules no tractades, # p <0.05 comparat amb les cèl·lules control en les mateixes condicions, † p <0.05 comparat amb les cèl·lules de la zona confluent en les mateixes condicions.

A la figura 29 podem observar imatges representatives de les cèl·lules α -SMA positives i negatives a dins de la zona del tall, en el procés de tancament de la ferida *in vitro* de cultius control i FPI pre-tractats o no amb TGF- β 1.

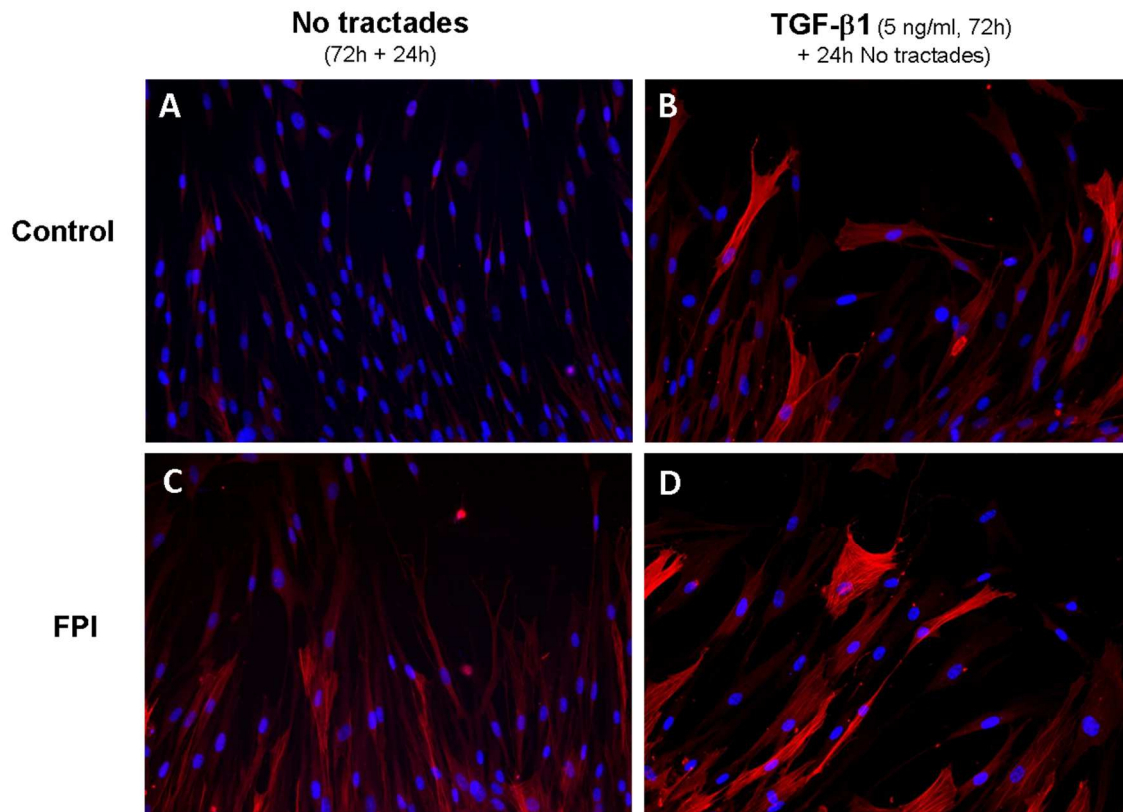


Figura 29.- Immunofluorescència de l'expressió d' α -SMA a la zona del tall després de 24h en cultius control i fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) pre-tractats o no amb TGF- β 1 en 1% sèrum fetal boví (FBS). Les cèl·lules confluentes van ser incubades durant 72h amb medi al 1% FBS (A,C) o amb 5 ng/ml TGF- β 1 en medi a l'1% FBS (B,D). Es va realitzar un tall a la monocapa cel·lular i es van fixar les cèl·lules 24h després per realitzar una immunofluorescència de les cèl·lules α -SMA en la zona del tall. Els nuclis van ser tenyits amb DAPI en color blau i la presència d' α -SMA s'observa en vermell (augment original X200).

3.3 Proliferació de fibroblastes i miofibroblastes control i FPI a la zona del tall

▪ Anàlisi de les cèl·lules en proliferació a la zona de tall

Per tal d'analitzar si existien diferències en la proliferació de fibroblastes i miofibroblastes control i FPI durant el tancament d'una ferida *in vitro*, vam incubar les cèl·lules amb o sense TGF- β 1 (5 ng/ml, 72h) i vam realitzar un tall a la monocapa cel·lular. La proliferació cel·lular va ser analitzada mesurant la incorporació del nucleòsid modificat EdU al DNA utilitzant el kit comercial Click-iT[®]. Les cèl·lules es van incubar amb EdU durant 2h després de realitzar el tall.

Després de 24h, les cèl·lules es van fixar i es van realitzar comptatges de les cèl·lules Click-iT[®] positives a la zona del tall, és a dir, les cèl·lules que estaven realitzant replicació del DNA (Figura 30).

El percentatge de cèl·lules Click-iT[®] positives va ser inferior en cultius FPI no tractats respecte als cultius control. Aquesta diferència es va perdre en cultius control i FPI amb un alt percentatge de miofibroblastes.

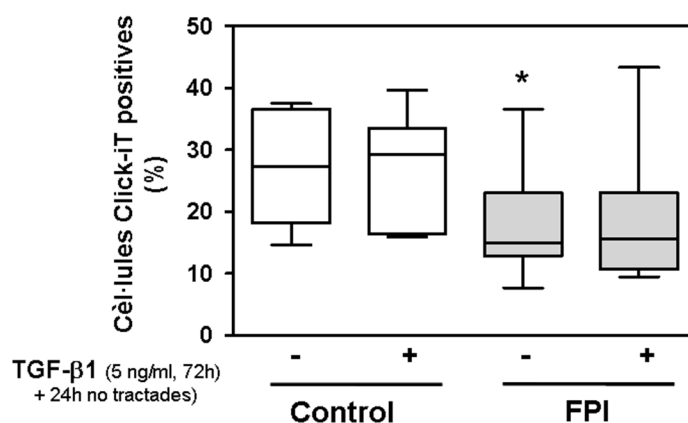


Figura 30.- Percentatge de cèl·lules en fase proliferativa presents a la zona del tall després de 24h en cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) pre-tractats o no amb TGF- β 1. Es van incubar les cèl·lules amb o sense TGF- β 1 (5ng/ml, 72h) i es va realitzar un tall a la monocapa cel·lular. Per tal de mesurar les cèl·lules que estaven proliferant, es va afegir EdU durant 2h i es van fixar després de 24h. Es van realitzar comptatges de les cèl·lules Click-iT[®] positives a la zona del tall. Els resultats es presenten com a percentatge respecte a les cèl·lules totals. N = 9. *p<0.05 comparat amb les cèl·lules control no tractades.

▪ La proliferació dels miofibroblastes a la zona del tall és baixa

Un cop determinat el percentatge de cèl·lules que estaven proliferant a la zona del tall, vam voler analitzar quina proporció d'aquestes eren miofibroblastes. Per fer-ho vam quantificar les cèl·lules Click-iT[®] positives i dins d'aquestes, les que també presentaven marcatge per α -SMA (figura 31).

Del total de cèl·lules que estaven proliferant 24h després de realitzar la ferida, un percentatge baix van ser miofibroblastes, tant en cultius control com FPI. Aquest nombre va augmentar de manera significativa en ambdós cultius pre-tractats durant 72h amb TGF- β 1. A la figura 32 es mostra imatges representatives de aquests condicions experimentals amb tinció específica per cèl·lules en proliferació i miofibroblastes (cèl·lules α -SMA positives).

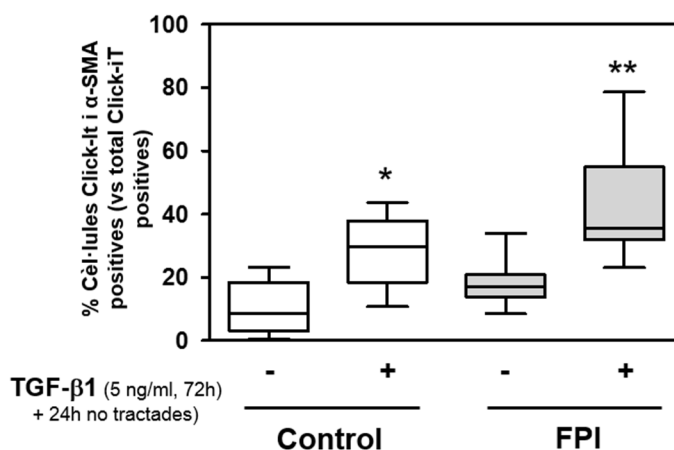


Figura 31.- Percentatge de miofibroblastes sobre el total de cèl·lules proliferatives presents a la zona del tall de cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) pre-tractats o no amb TGF- β 1. Es van incubar les cèl·lules amb o sense TGF- β 1 (5ng/ml, 72h) i es va realitzar un tall a la monocapa cel·lular. Per tal de mesurar les cèl·lules que estaven proliferant, es va afegir EdU durant 2h i es van fixar després de 24h. Vam realitzar comptatges de les cèl·lules en proliferació (Click-iT[®] positives) i alhora miofibroblastes (α -SMA positives) a la zona del tall. Els resultats es presenten com a % respecte a total de cèl·lules Click-iT[®] positives. N = 8. *p<0.05, **p<0.01 comparat amb les respectives cèl·lules no tractades.

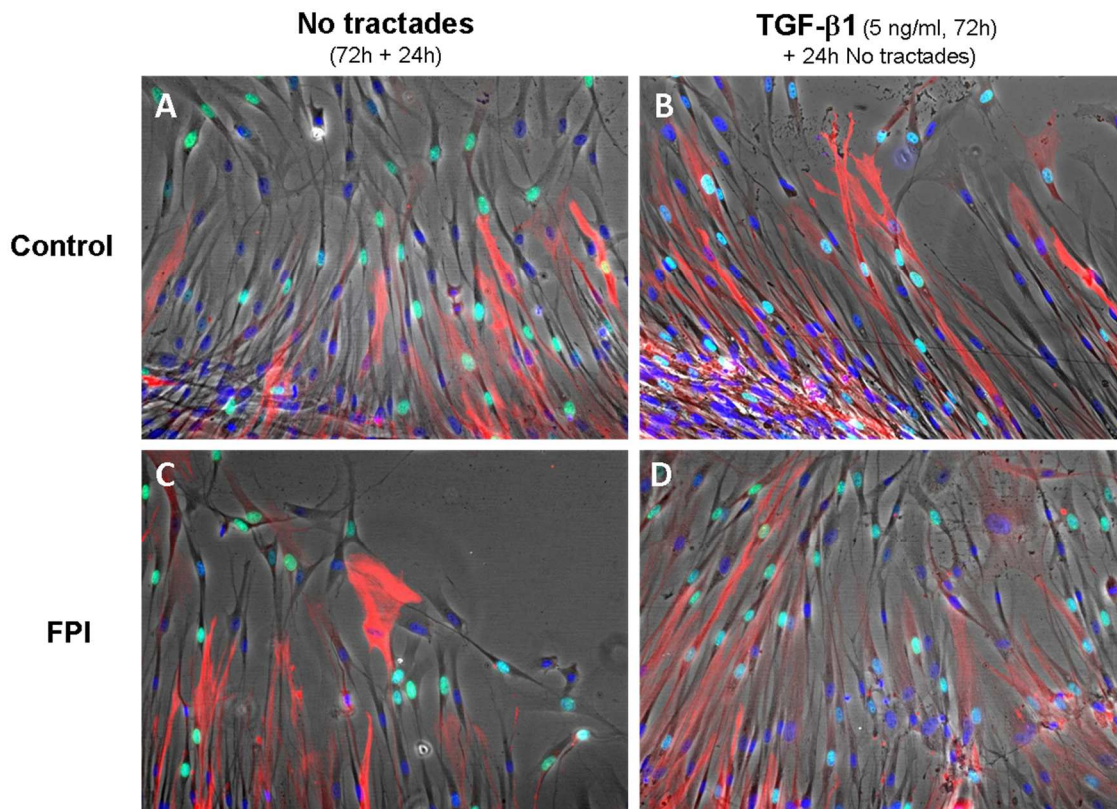


Figura 32.- Immunofluorescència de cèl·lules en proliferació i miofibroblastes de cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) presents a la zona del tall després de 24h. Les cèl·lules confluents van ser incubades durant 72h amb medi al 1% FBS (A,C) o amb 5 ng/ml TGF- β 1 en medi a l'1% FBS (B,D). Es va realitzar un tall a la monocapa cel·lular. Per tal de mesurar les cèl·lules que estaven proliferant, es va afegir EdU durant 2h i es van fixar després de 24h. La imatge mostra les cèl·lules en proliferació (Click-iT[®] positives – nuclis en verd) i els miofibroblastes (α -SMA - vermell) en la zona del tall de cultius control i FPI. Els nuclis van ser tenyits amb DAPI en blau (augment original X200).

3.4 Efecte de la inhibició de la proliferació amb Mitomicina C sobre el tancament d'un tall *in vitro*

▪ La Mitomicina C inhibeix la proliferació cel·lular de manera dosi-depenent

Per tal de distingir el paper de la migració i de la proliferació en el tancament de la ferida, vam incubar les cèl·lules amb Mitomicina C, un antibiòtic que actua com a inhibidor de la proliferació, unint-se al DNA i impedit la seva replicació. Per tant, les cèl·lules incubades amb Mitomicina C només podran tancar el tall mitjançant la migració.

Per realitzar aquest experiment, les cèl·lules van ser cultivades fins a confluència i es va realitzar una ferida *in vitro* com s'ha descrit anteriorment. A continuació, vam afegir Mitomicina C al medi en concentracions creixents (0.1, 1,5 μ g/ml). Alhora, es van incubar les cèl·lules amb EdU durant 2h per tal de marcar les que estaven proliferant i es van fixar les cèl·lules 24h després (Figura 33). Vam observar que a 5 μ g/ml no hi havia cap cèl·lula Click-iT[®] positiva i per tant, la Mitomicina C havia inhibit completament la proliferació.

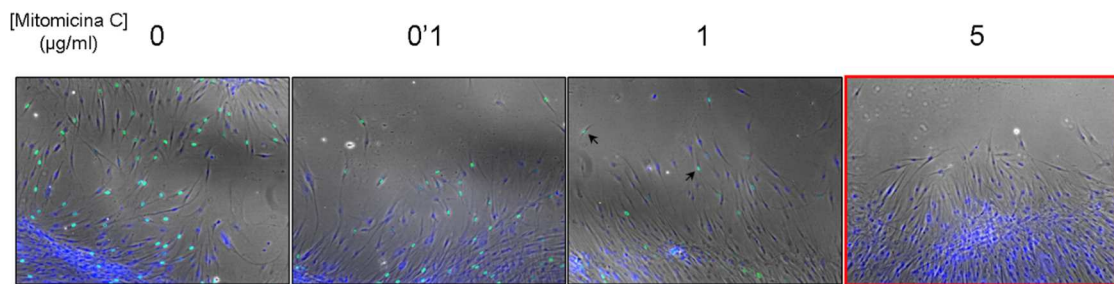


Figura 32.- Imatges representatives de la inhibició de la proliferació per Mitomicina C de les cèl·lules presents després de 24h al tall realitzat al cultiu *in vitro*. En verd es van marcar les cèl·lules que proliferaven (Click-iT[®] positives) i els nuclis van ser tenyits amb DAPI (blau)(Augment original X100).

Un cop definida la dosi de Mitomicina C que era capaç d'inhibir per complet la proliferació cel·lular dels cultius de fibroblastes control i FPI, vam realitzar l'anàlisi de detecció de citotoxicitat LDH, per comprovar que el fàrmac no resultava tòxic per la viabilitat cel·lular. Els resultats van indicar que no hi havia toxicitat en el tractament amb Mitomicina C (Promig LDH a 5µg/ml Mit. C = -0.8 respecte a les cèl·lules no tractades).

▪ Anàlisi de la presència de miofibroblastes a la zona del tall amb i sense Mitomicina C

A continuació vam estudiar si es va modificar la presència de miofibroblastes a la zona del tall en absència de proliferació cel·lular.

Per dur a terme aquests experiments, vam cultivar els fibroblastes control i FPI en absència o presència de TGF-β1 (5ng/ml, 72h). Posteriorment, vam realitzar el tall a la monocapa cel·lular i vam incubar les cèl·lules en presència o absència de Mitomicina C al medi de cultiu (5 µg/ml) durant 24h. En aquest moment, es van fixar les cèl·lules i es van realitzar comptatges de cèl·lules α-SMA positives a la zona de tall.

Com s'observa a la figura 34, no hi va haver diferències en el percentatge de miofibroblastes a la zona del tall en presència o absència de Mitomicina C. Per tant, la inhibició de la proliferació no va modificar el nombre de cèl·lules α-SMA positives a la zona del tall.

El percentatge de miofibroblastes va ser superior en cultius FPI no tractats amb TGF-β1 i en absència de Mitomicina C en comparació al grup control, resultat observat en els experiments descrits anteriorment.

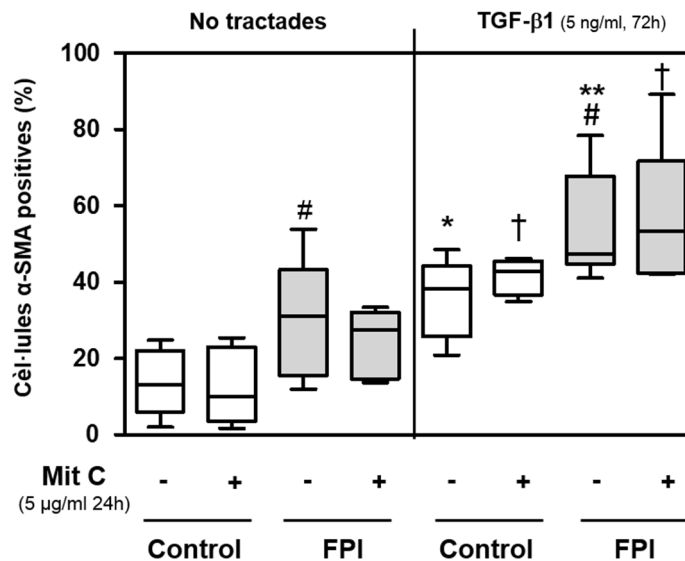


Figura 34.- Percentatge de miofibroblastes a la zona d'un tall realitzat *in vitro* en presència o absència de Mitomicina C en cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). Es van tractar els fibroblastes control i FPI en absència o presència de TGF-β1 (5ng/ml, 72h). Posteriorment, es va realitzar un tall a la monocapa cel·lular i es van incubar les cèl·lules en presència o absència de Mitomicina C (Mit C) al medi de cultiu (5 µg/ml) durant 24h. Es van fixar i es realitzar una immunofluorescència per tal de comptar les cèl·lules α-SMA positives presents a la zona de tall. N = 8 Control, N = 6 FPI. *p<0.05, **p<0.01 comparat amb les respectives cèl·lules no tractades, # p<0.05 comparat amb les cèl·lules control en les mateixes condicions, †p<0.01 comparat amb les respectives cèl·lules sense TGF-β1 en les mateixes condicions.

3.5 Tancament de l'àrea de tall a 24h i 48h per fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica

A continuació vam mesurar la capacitat de tancament d'una ferida *in vitro* per part de fibroblastes i miofibroblastes control i FPI. Amb aquest objectiu, es van incubar els fibroblastes en confluència amb o sense TGF-β1 durant 72h en medi 1% FBS per tal d'obtenir un cultiu amb un alt percentatge de miofibroblastes. Posteriorment, es va crear un tall en la monocapa cel·lular amb una punta de pipeta i després de canviar el medi es va fotografiar el cultiu (temps 0h) i a intervals regulars per seguir el tancament de la ferida. Vam mesurar l'àrea de la ferida a 0, 24 i 48h utilitzant el programa d'anàlisi d'imatge *ImageJ* i vam calcular l'àrea de tancament durant aquests intervals de temps amb la diferència entre la ferida inicial (0h) i les 24 i 48h (figura 35).

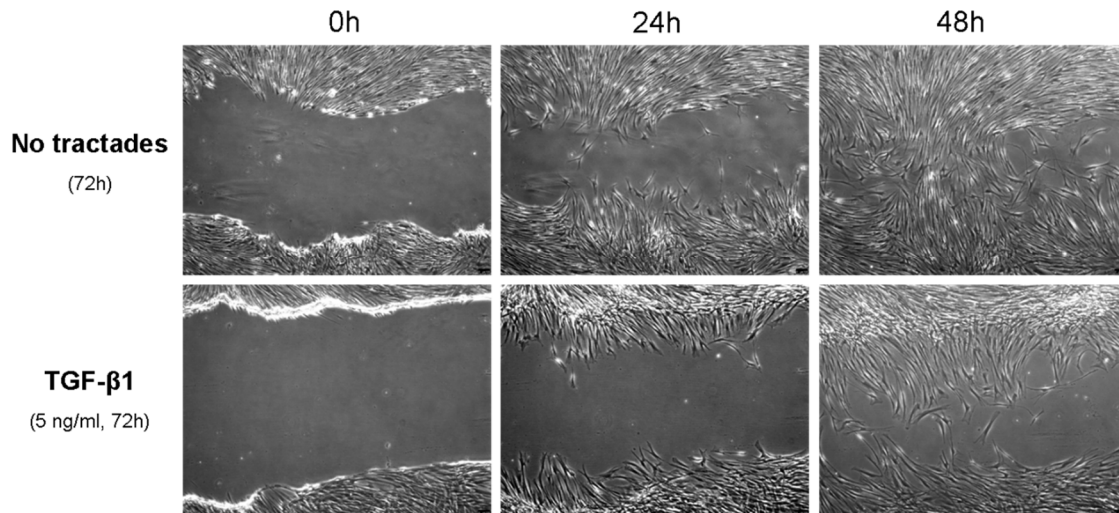


Figura 35.- Imatges representatives de camp clar del tancament d'una ferida *in vitro* realitzada en un cultiu de fibroblastes. Es van cultivar fibroblastes control i FPI fins a confluència i es van incubar les cèl·lules en presència o absència de TGF- β 1 en medi amb un 1% sèrum fetal boví (FBS). A les 72h d'incubació, es va retirar el TGF- β 1 i es va realitzar un tall a la monocapa cel·lular. L'àrea de la ferida es va fotografiar a temps 0, 24 i 48h (Augment original X50).

A la figura 36A, s'observa que l'àrea tancada pels fibroblastes FPI va ser significativament inferior a la tancada pels fibroblastes control 24h després de realitzar el tall al cultiu. Alhora, el pre-tractament amb TGF- β 1 va disminuir l'àrea tancada tant en cultius control com FPI en comparació amb les no pre-tractades. Per tant, els cultius rics en miofibroblastes van presentar una capacitat de tancament d'un tall *in vitro* reduïda. No hi va haver diferències entre miofibroblastes control i FPI, perdent-se així les diferències que hi havia inicialment.

La Mitomicina C va disminuir l'àrea tancada en totes les condicions. Aquest fet indica que la inhibició de la proliferació disminueix la capacitat de tancament d'una ferida *in vitro* de fibroblastes control i FPI en comparació amb els no tractats. En cultius tant de fibroblastes com de miofibroblastes FPI tractats amb Mitomicina C l'àrea tancada va ser menor respecte als cultius control.

A 48h (Figura 36B), es van perdre les diferències presents a 24h entre fibroblastes control i FPI. També es va igualar l'àrea tancada per fibroblastes i miofibroblastes FPI. En canvi, en cultius tant control com FPI on es va inhibir la proliferació amb Mitomicina C, l'àrea va ser significativament inferior en comparació amb els no tractats, mantenint-se les diferències observades a 24h.

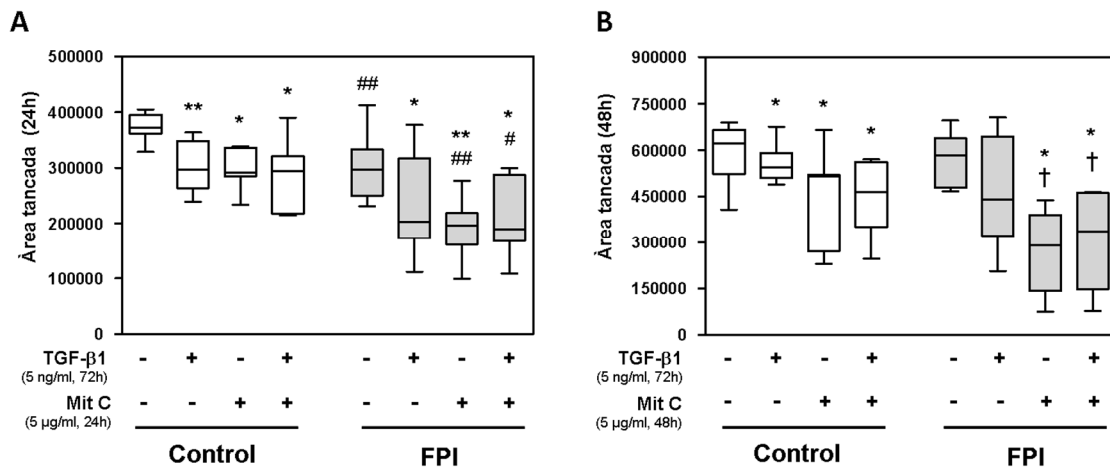


Figura 36.- Àrea tancada per fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) en presència o absència de Mitomicina C a 24 i 48h. Les cèl·lules van ser pre-tractades en presència o absència de TGF-β1 (5ng/ml, 72h), es va realitzar un tall a la monocapa cel·lular i es van fotografiar els cultius a temps 0h. Es van incubar els cultius control i FPI amb o sense Mitomicina C (5µg/ml) durant 24h (A) i 48h (B) i es van tornar a fotografiar. Es va mesurar la diferència d'àrees amb el programa *Image J*. Els resultats es presenten com a Àrea tancada per les cèl·lules durant 24h i 48h. N = 7 Control, N = 10 FPI. *p<0.05, **p<0.01 comparat a les respectives cèl·lules no tractades; # p<0.05, ## p<0.01 comparat al grup control en les mateixes condicions, † p<0.05 comparat a les cèl·lules pre-tractades amb TGF-β1 en absència de Mitomicina C.

4. EXPRESSIÓ DE COX-2 EN FIBROBLASTES I MIOFIBROBLASTES CONTROL I DE FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA

4.1 Expressió proteica de COX-1, COX-2 i α -SMA induïda per interleuquina-1 β a 4 i 24h

Per tal d'estudiar l'expressió dels enzims inflamatoris ciclooxigenasa 1 i 2 (COX-1 i COX-2) en cultius control i FPI, es van incubar les cèl·lules amb IL-1 β (10 ng/ml) durant 4 i 24h. Vam avaluar per *western blot* l'expressió de COX-2, COX-1 i α -SMA en llisats cel·lulars de fibroblastes control i FPI de forma basal i induïda per IL-1 β .

Com es pot observar a la figura 37, els cultius FPI van mostrar una població major de miofibroblastes (cèl·lules α -SMA positives) de forma basal. Aquest resultat està en concordança amb els obtinguts pel apartat 1. Alhora, van presentar una menor inducció d'expressió de COX-2 en resposta a estimulació per IL-1 β en comparació amb els fibroblastes control. Un descens significatiu d' α -SMA es va observar en cultius FPI després del tractament amb IL-1 β durant 24h.

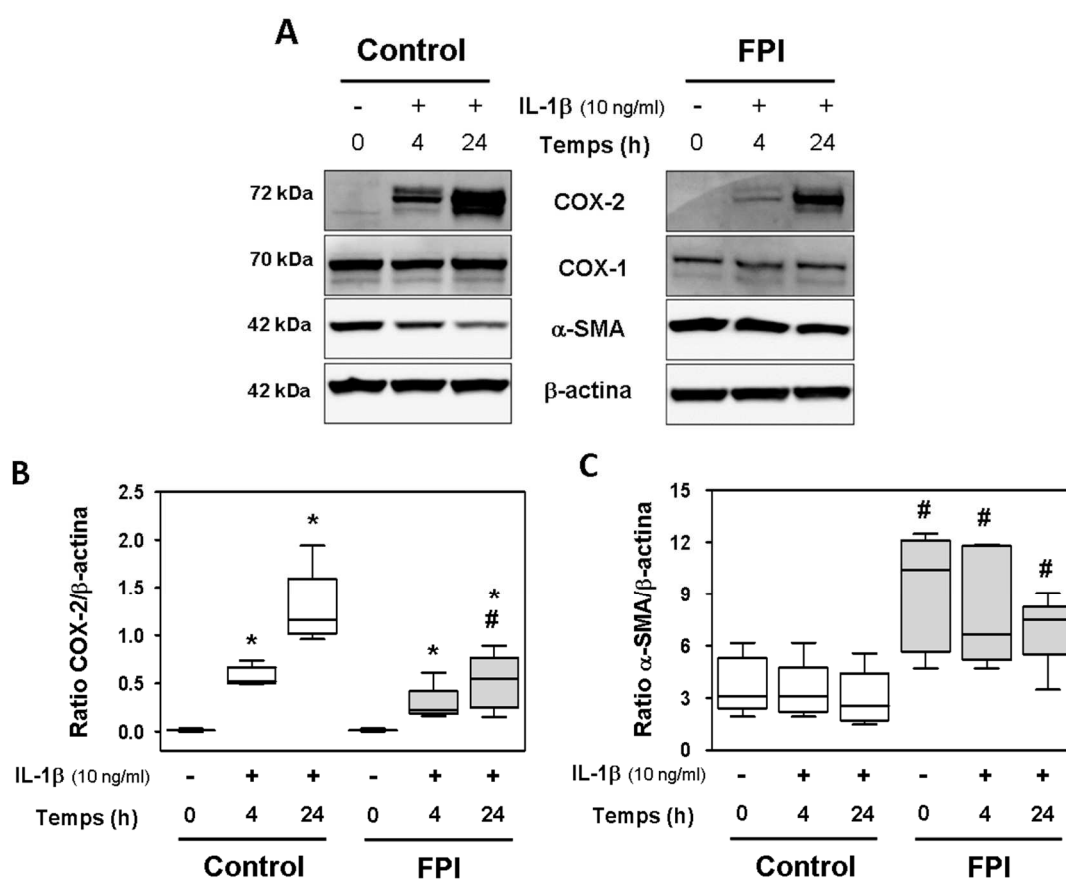


Figura 37.- Expressió de COX-2, COX-1 i α -SMA en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) de forma basal i induïda per interleuquina-1 β (IL-1 β). Les cèl·lules van ser incubades en presència o absència d'IL-1 β (10 ng/ml) durant 4 i 24h i es va mesurar l'expressió proteica de COX-1, COX-2, α -SMA i β -actina per *western blot*. (A) Imatge representativa d'un *Western blot* i anàlisi densitomètric de COX-2 (B) i d' α -SMA (C) expressat com a ràtio respecte a l'expressió de β -actina. N = 5. * P<0.05 comparat a les respectives cèl·lules no tractades, # P<0.05 comparat al grup control en les mateixes condicions.

4.2 Expressió gènica de COX-2 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica tractats amb interleuquina-1 β

A continuació, vam mesurar l'expressió de COX-2 en fibroblastes control i FPI estimulats per IL-1 β (10 ng/ml, 24h) per RT-PCR (figura 38). L'anàlisi de COX-1 no es va realitzar ja que els nivells de proteïna no variaven amb el tractament. La IL-1 β va induir la síntesi de mRNA de COX-2 de manera significativa a cultius control i FPI, tot i que a 24h no vam observar diferències significatives entre els dos grups.

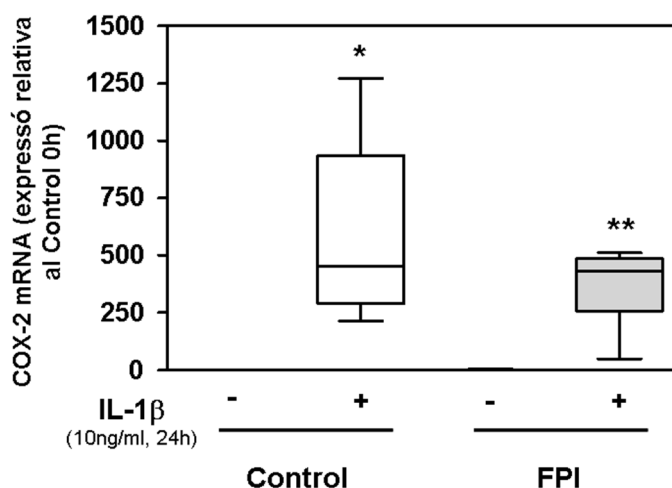


Figura 38.- Expressió gènica de COX-2 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) de forma basal i induïda per interleuquina-1 β (IL-1 β). Les cèl·lules van ser incubades en presència o absència d'IL-1 β (10 ng/ml) durant 24h i es va mesurar l'expressió de COX-2 per RT-PCR, normalitzada pel gen constitutiu RNA polimerasa II. Els resultats estan expressats en relació al control 0h. N = 7 Control, N = 8 FPI. *p<0.05, ** p<0.01 comparat a les respectives cèl·lules no tractades.

4.3 Anàlisi de la expressió de COX-2 als miofibroblastes *in situ*, amb i sense interleuquina-1 β

L'expressió de COX-2 i α -SMA en fibroblastes control i FPI de manera basal i després d'estimulació amb IL-1 β també es va analitzar per immunofluorescència, realitzant comptatges de les cèl·lules positives per COX-2 i α -SMA respecte al percentatge de cèl·lules totals.

Com s'observa a la taula 6, els cultius FPI van mostrar una població major de miofibroblastes (cèl·lules α -SMA positives) de forma basal en comparació als cultius control. A més a més, el percentatge de cèl·lules COX-2 positives en resposta a IL-1 β (10 ng/ml durant 24h) va ser significativament inferior en cultius FPI respecte als control.

En els comptatges d'immunofluorescència, vam observar un descens significatiu en el percentatge de cèl·lules α -SMA positives després del tractament amb IL-1 β en ambdós grups. La IL-1 β es va mostrar per tant com una potent inductora de COX-2 i inhibidora d' α -SMA. Alhora, les cèl·lules α -SMA positives van mostrar escassa o nul·la coincidència amb el marcatge per

COX-2 en resposta a IL-1 β . Aquesta fet va indicar que els miofibroblastes presents de manera espontània als cultius control i FPI estan caracteritzats per una disminució en l'expressió de COX-2 en resposta a IL-1 β , fet que es pot observar a les imatges de la figura 39.

Tractament (24h)	Determinacions	Grups	
		Control	FPI
Cap	COX-2	ND	ND
	α -SMA	2.8 \pm 1.6 %	9.4 \pm 3.7 % **
IL-1 β (10 ng/ml)	COX-2	48.05 \pm 11.09 %	31.7 \pm 5.7 % *
	α -SMA	1.6 \pm 2.7 % †	5.1 \pm 2.8 % *†
	COX-2 & α -SMA	0.01 \pm 0.10 %	0.17 \pm 0.11 %

Taula 6. Quantificació de la immunofluorescència de COX-2, α -SMA i de manera conjunta COX-2 i α -SMA en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). Els fibroblastes control i FPI van ser incubats durant 24h en presència o absència d'IL-1 β (10 ng/ml). Els resultats es presenten com a mitjana \pm SD del percentatge de les cèl·lules totals. ND, no detectat. N = 6. * P<0.05 i ** P<0.01 comparat al grup control, † P<0.05 comparat a les respectives cèl·lules no tractades.

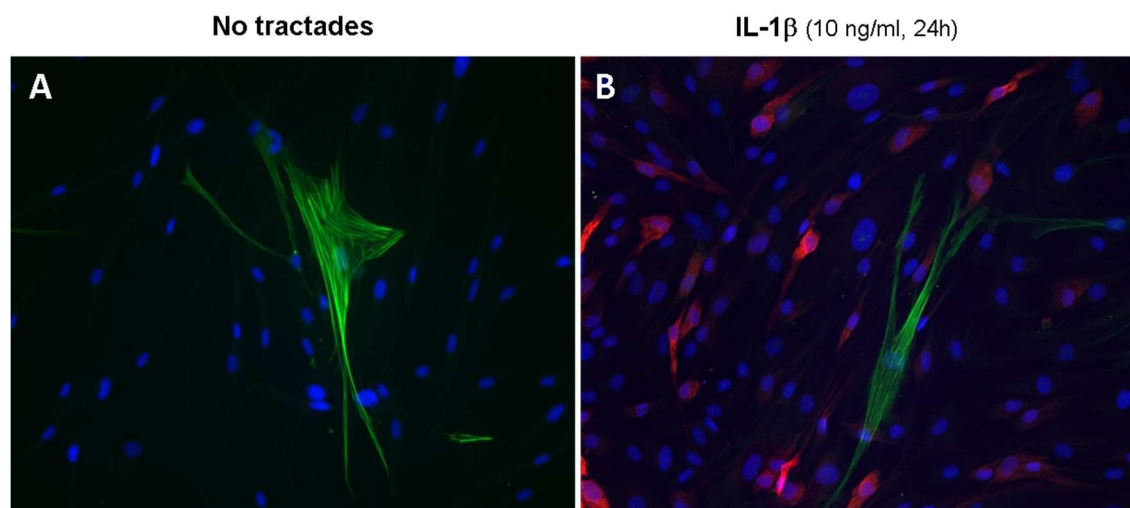


Figura 39.- Imatge representativa de co-immunofluorescència de COX-2 i α -SMA d'un cultiu de fibroblastes control en presència o absència d'interleuquina-1 β (IL-1 β). En condicions basals (A), s'observen cèl·lules α -SMA (verd) positives aïllades i no s'observa expressió de COX-2 (vermell). Després del tractament amb IL-1 β (10 ng/ml) durant 24h (B), s'observa una expressió elevada de COX-2 i absència d'immunoreactivitat per COX-2 en les cèl·lules positives per α -SMA. Els nuclis van ser tenyits amb DAPI (blau)(Augment original X200).

4.4 Efecte del tractament amb TGF- β 1 a 4, 24 i 72h sobre l'expressió de COX-2 en fibroblastes

Degut a que vam utilitzar TGF- β 1 per obtenir miofibroblastes, vam analitzar la capacitat d'aquest factor de creixement per estimular COX-2 en fibroblastes control i FPI a diferents temps (4, 24 i 72h).

Com podem observar a la figura 40, en fibroblastes control, el tractament amb TGF- β 1 va estimular lleugerament l'expressió de COX-2 a 4h i de manera més marcada a 24h, però no es va observar expressió de COX-2 a 72h. En fibroblastes FPI en canvi, no es va observar expressió de COX-2 després del tractament amb TGF- β 1.

En conseqüència, en fibroblastes control, es va observar expressió de COX-2 a 4h induïda per TGF- β 1, temps al qual no hi havia canvis significatius al percentatge de miofibroblastes, com s'havia observat a l'experiment temps-resposta d'inducció d' α -SMA per TGF- β 1. En canvi, a temps llargs de tractament amb TGF- β 1 (72h), es va observar la situació oposada, caracteritzada per una elevada població de miofibroblastes sense expressió de COX-2.

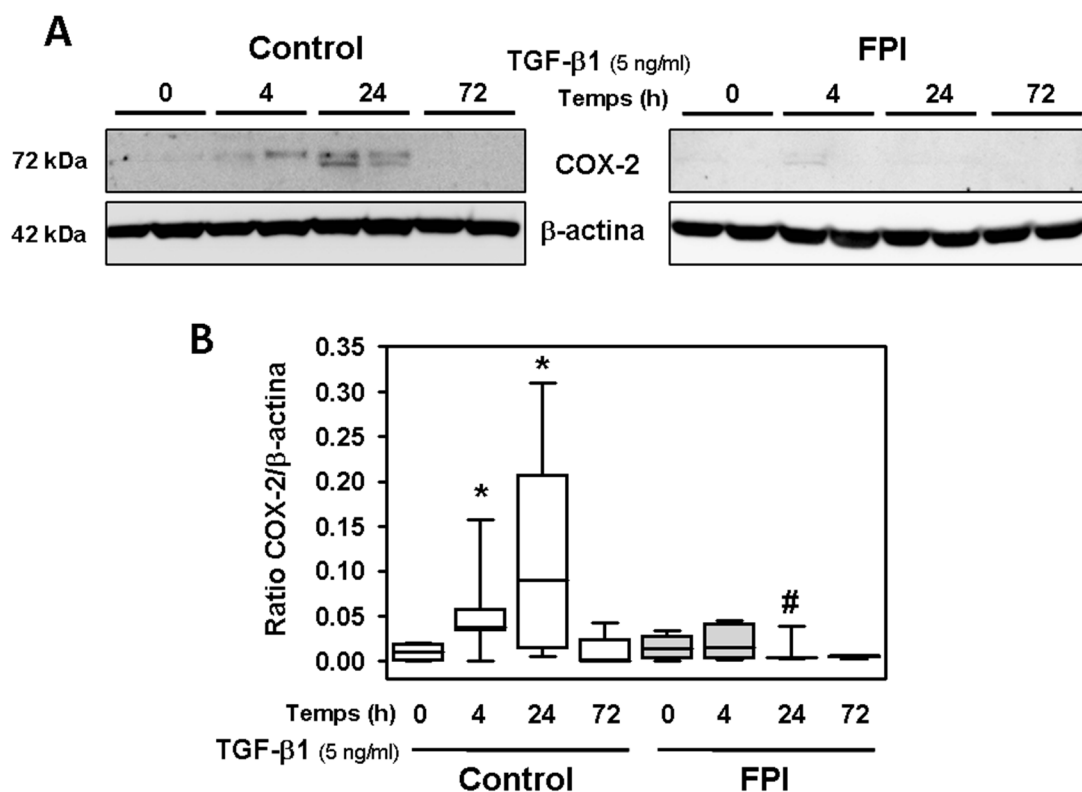


Figura 40.- Efecte del tractament amb TGF- β 1 sobre l'expressió de COX-2 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) a 4, 24 i 72h. (A) Imatge representativa d'un *western blot* de COX-2 i β -actina en dos cultius de fibroblastes control i FPI en resposta al tractament amb TGF- β 1 durant 4, 24 i 72h. (B) Anàlisi densitomètric de COX-2 expressat com a ràtio respecte β -actina. N = 6. * P<0.05 comparat a les respectives cèl·lules no tractades, # P<0.05 comparat al grup control en les mateixes condicions.

4.5 Expressió de COX-2, COX-1 i α -SMA en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica estimulats amb IL-1 β i/o TGF- β 1

Vam realitzar experiments a 4h en presència o absència de TGF- β 1 i en presència o absència d'IL-1 β (figura 41) i vam observar que de manera conjunta, els dos tractaments es van potenciar per incrementar l'expressió de COX-2 en cultius control i FPI.

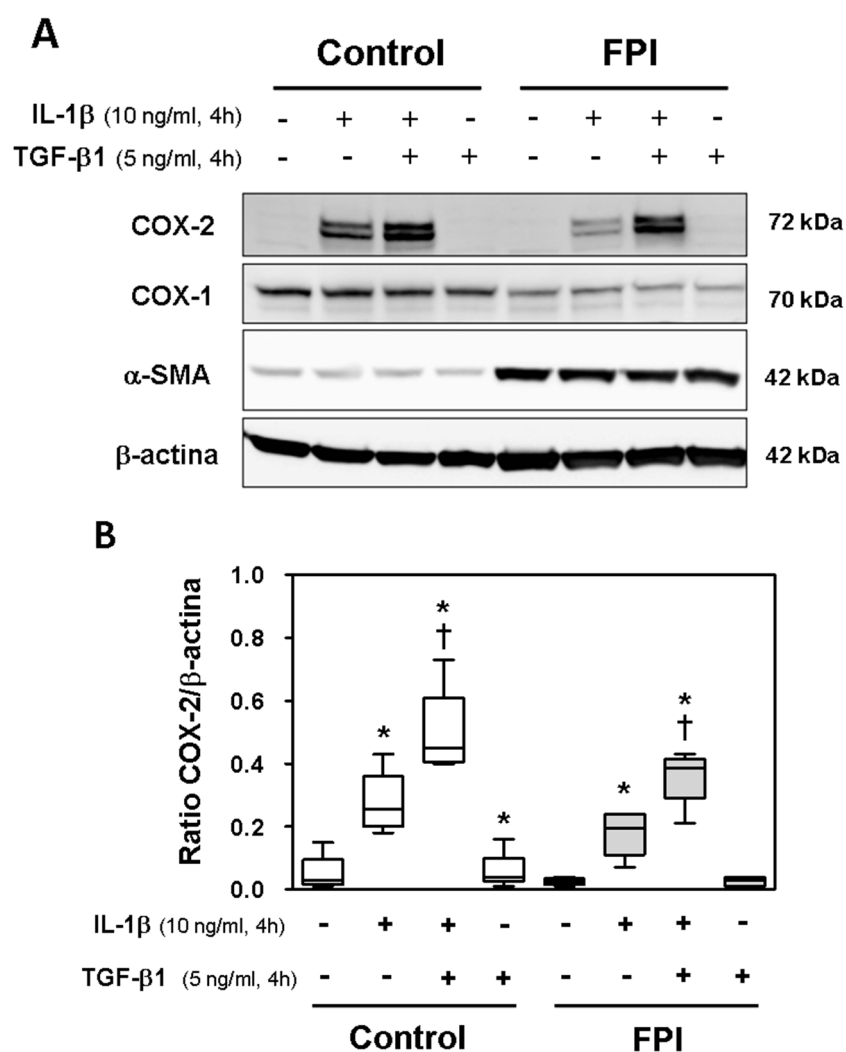


Figura 41.- Nivells proteics de COX-2, COX-1 i α -SMA en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) estimulats durant 4h amb IL-1 β i/o TGF- β 1. Les cèl·lules van ser incubades en presència o absència d'IL-1 β (10 ng/ml) i/o TGF- β 1 (5 ng/ml) durant 4h. (A) Imatge representativa d'un *Western blot* i (B) anàlisi densitomètric de l'expressió proteica de COX-2, mostrat com a ràtio respecte l'expressió de β -actina. N = 5. * P<0.05 comparat a les respectives cèl·lules no tractades. † P<0.05 comparat amb les cèl·lules tractades amb IL-1 β dins del mateix grup.

4.6 Expressió de COX-2, COX-1 i α -SMA en fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica estimulats amb interleuquina-1 β

A continuació vam estudiar l'expressió de COX-2 i α -SMA en els cultius enriquits en miofibroblastes obtinguts com s'ha descrit anteriorment.

Com s'observa a la figura 42, tant els cultius control com els FPI van presentar un marcat increment de l'expressió d' α -SMA després del tractament amb TGF- β 1. Alhora, les cèl·lules tractades amb TGF- β 1 van mostrar un descens molt marcat en l'expressió de COX-2 en resposta a IL-1 β .

En conseqüència, un increment en el nombre de cèl·lules α -SMA positives va anar associat amb una disminució de les cèl·lules COX-2 positives induïdes per IL-1 β .

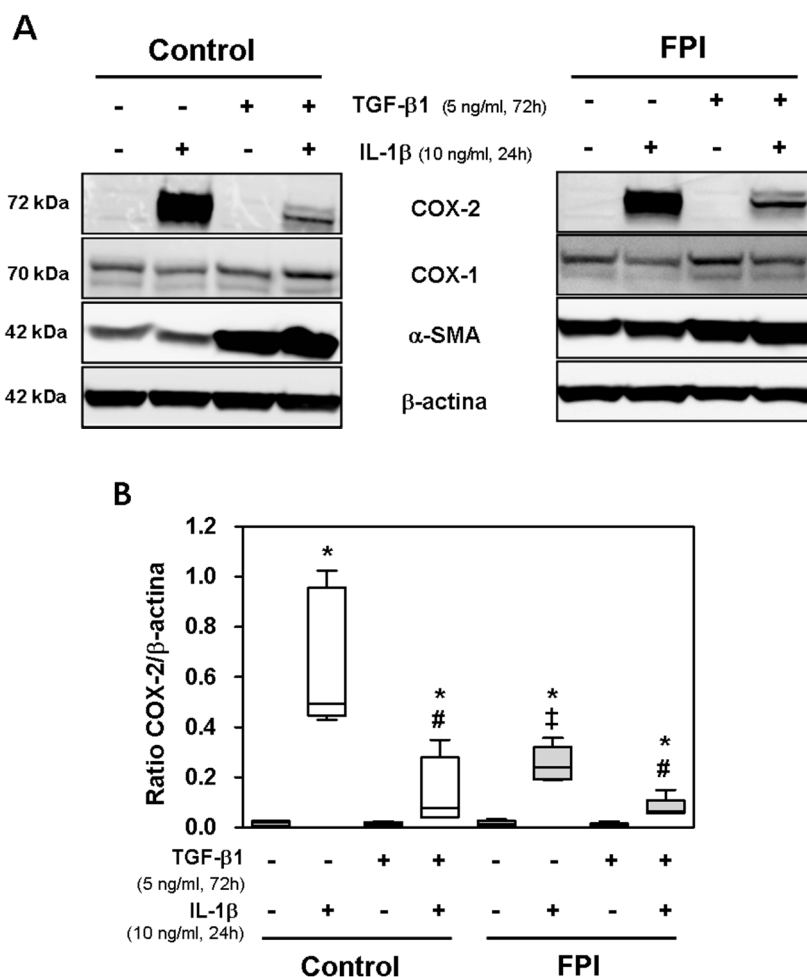


Figura 42.- Efecte de l'estimulació amb interleuquina-1 β (IL-1 β) sobre l'expressió de COX-2, COX-1 i α -SMA en una població enriquida de miofibroblastes. (A) Nivells proteics de COX-2, COX-1, α -SMA i β -actina en cultius de fibroblastes control i FPI a 72 h amb o sense tractament de TGF- β 1 (5 ng/ml), i a les següents 24 h en presència o absència d'IL-1 β (10 ng/ml), mesurat per *Western blot*. (B) Anàlisi densitomètrica de COX-2 expressat com a ràtio respecte β -actina. N = 6. * P<0.05 comparat amb les cèl·lules no tractades, # P<0.05 comparat amb les cèl·lules tractades amb IL-1 β , ‡ P<0.01 comparat al grup control en les mateixes condicions.

4.7 Expressió de COX-1 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica estimulats per TGF- β 1 durant 72h

Vam avaluar l'expressió de COX-1 en fibroblastes control i FPI en presència o absència de TGF- β 1 (5 ng/ml, 72h).

L'expressió de COX-1 va incrementar després del tractament amb TGF- β 1 només en cultius FPI (Figura 43). En canvi, no es va modificar pel tractament amb IL-1 β en cap dels dos grups (resultats no mostrats).

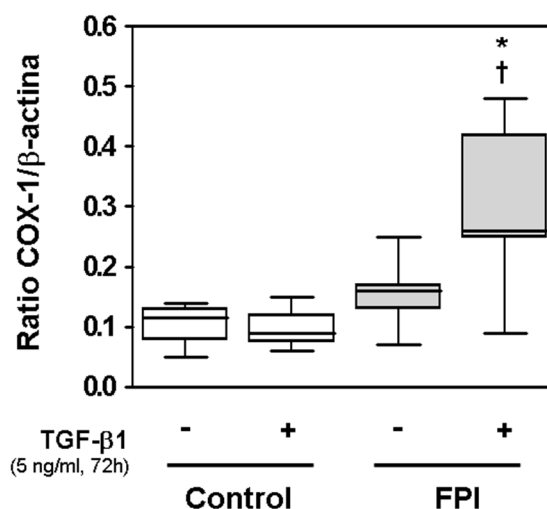


Figura 43.- Expressió de COX-1 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) tractats amb TGF- β 1. Densitometria de l'expressió de COX-1 com a ràtio respecte β -actina en fibroblastes control i FPI en presència o absència de TGF- β 1 (5ng/ml, 72h). N = 6.* P<0.05 comparat amb les respectives cèl·lules no tractades, † P<0.05 comparat al grup control en les mateixes condicions.

4.8 Expressió de COX-2 en fibroblastes control estimulats durant 72h amb TGF- β 1 i re-incubats durant 4 o 24h amb TGF- β 1 nou

Els miofibroblastes es van re-estimular amb TGF- β 1 durant 4 i 24h per comprovar si el tractament amb TGF- β 1 era capaç d'incrementar l'expressió de COX-2 en aquest fenotip cel·lular. Com era esperat, no hi va haver estimulació de COX-2 en miofibroblastes control o FPI ni a 4 ni a 24h d'estimulació amb TGF- β 1 (Figura 43).

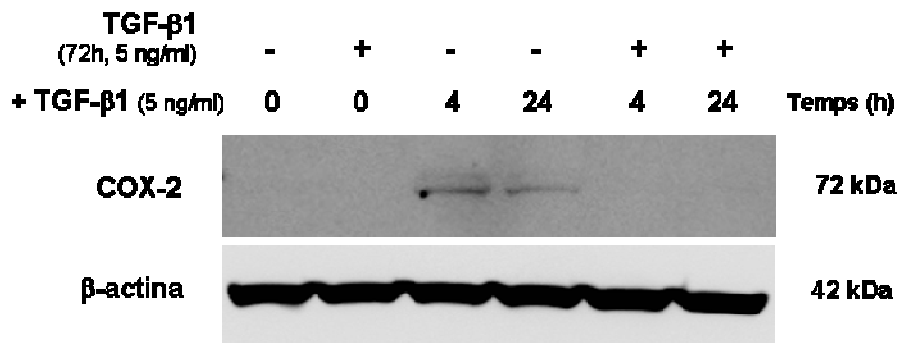


Figura 44.- Absència d'expressió de COX-2 en un cultiu control enriquit en miofibroblastes tractat durant 4 o 24h amb TGF- β 1. Les cèl·lules van ser incubades en presència o absència TGF- β 1 (5 ng/ml) durant 72h i 4 o 24h addicionals de TGF- β 1 (5 ng/ml) nou. Imatge representativa d'un *Western blot* d'un cultiu de fibroblastes control. N = 6.

4.9 Efecte de l'estimulació amb interleuquina-1 β sobre l'expressió de COX-2 en una població enriquida de miofibroblastes

Es van realitzar comptatges d'immunofluorescència de cèl·lules positives per COX-2 en cultius control i FPI pre-tractats o no amb TGF- β 1 (5 ng/ml) durant 72h seguits de 24 amb IL-1 β (10 ng/ml)(Figura 45).

L'efecte de l'estimulació d'IL-1 β sobre l'expressió de COX-2 va disminuir en els cultius pre-tractats amb TGF- β 1 i que per tant, tenien un nombre més elevat de miofibroblastes. Aquest efecte es va observar tant en cèl·lules control com FPI.

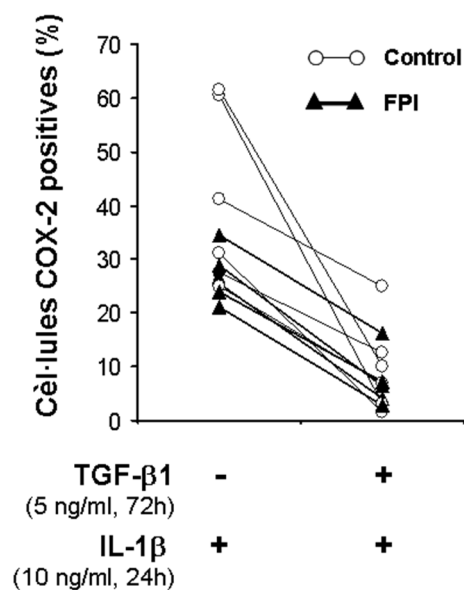


Figura 45.- Efecte de l'estimulació amb interleuquina-1 β (IL-1 β) sobre l'expressió de COX-2 en una població enriquida de miofibroblastes. Les cèl·lules control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) van ser incubades en presència o absència de TGF- β 1 (5 ng/ml) durant 72h i a continuació amb IL-1 β (10 ng/ml)

durant 24h. Quantificació de les cèl·lules COX-2 positives per immunofluorescència. Els resultats es presenten com a percentatge respecte a les cèl·lules totals.

Es van realitzar comptatges de immunofluorescència de COX-2 i α -SMA on es van quantificar aquelles cèl·lules que expressaven COX-2, α -SMA i tots dos conjuntament.

Com resumeix la taula 7, les cèl·lules positives per COX-2 van ser pràcticament absents en els cultius control i FPI tractats amb TGF- β 1. Com era esperat, un nombre extremadament baix de cèl·lules α -SMA positives van ser també positives per COX-2 després de tractament amb IL-1 β .

Tractament		Determinacions	Grups	
			Control	FPI
Cap (72h)	Cap (24h)	COX-2	ND	ND
		α -SMA	2.9 \pm 9 %	9.2 \pm 2.9 % **
	IL-1 β (10 ng/ml, 24h)	COX-2	41.2 \pm 16.3% †	26.7 \pm 5.2% *†
		α -SMA	1.7 \pm 2.5 % †	6.05 \pm 4.1 % *†
		COX-2 & α -SMA	0.02 \pm 0.07 %	0.14 \pm 0.09 %
	TGF- β 1 (5 ng/ml, 72h)	Cap (24h)	COX-2	ND
α -SMA			82.3 \pm 5.3 % ‡	79.9 \pm 8.9 % ‡
IL-1 β (10 ng/ml, 24h)		COX-2	9.9 \pm 8.5 % ‡	7.4 \pm 5.3 % ‡
		α -SMA	70.7 \pm 11.9 % ‡§	72.4 \pm 11.04 % ‡§
		COX-2 & α -SMA	0.4 \pm 0.5 %	0.3 \pm 0.07 %

Taula 7.- Quantificació de la immunofluorescència de COX-2, α -SMA i de manera conjunta COX-2 i α -SMA en fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). Els fibroblastes control i FPI van ser incubats durant 72h en presència o absència de TGF- β 1 (5 ng/ml), seguit per una incubació en presència o absència d'IL-1 β (10 ng/ml) durant 24 h. Els resultats es presenten com a mitjana \pm SD del percentatge de les cèl·lules totals. ND, no detectat, N = 6. * P<0.05 i ** P<0.01 comparat al grup control en les mateixes condicions, † P<0.05 comparat a les respectives cèl·lules no tractades, ‡ P<0.05 comparat a les cèl·lules no tractades amb TGF- β 1, § P<0.05 comparat al percentatge d' α -SMA en les cèl·lules tractades amb TGF- β 1 en absència d'IL-1 β .

Per co-immunofluorescència vam observar que no hi havia coincidència de marcatge per COX-2 i α -SMA, per tant, que els miofibroblastes van ser negatius per COX-2 (Figura 46). Les

cèl·lules COX-2 positives presentaven una forma més prima i allargada. No vam observar diferències en la morfologia dels fibroblastes positius i negatius per COX-2

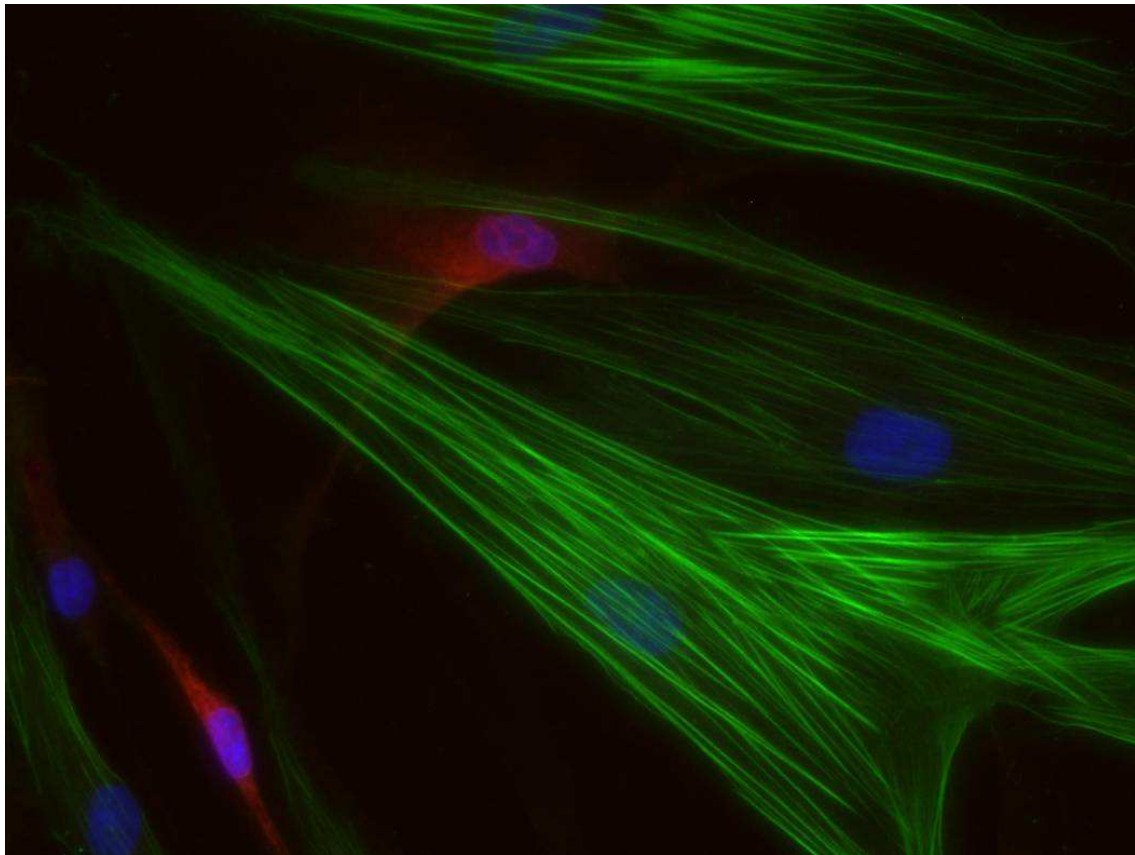


Figura 46.- Imatge representativa de co-immunofluorescència de COX-2 i α -SMA d'un cultiu control enriquit en miofibroblastes estimulat amb interleuquina-1 β (IL-1 β). Els fibroblastes van ser incubats amb TGF- β 1 (5ng/ml) durant 72h seguit d'IL-1 β (10 ng/ml) durant 24h. S'observa l'expressió de COX-2 en vermell, α -SMA en verd i els nuclis marcats amb DAPI (blau)(Augment original 400x).

4.10 Secreció de prostaglandina E2 en fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica

Vam examinar els nivells de PGE₂ en els sobrenedants de fibroblastes control i FPI (figura 47) tractats amb TGF- β 1 (5 ng/ml, 72h) i posteriorment amb IL-1 β (10 ng/ml, 24h).

La incubació amb IL-1 β va incrementar la secreció de PGE₂ tant en fibroblastes control com FPI. Aquest efecte es va veure anul·lat pràcticament per complet en les cèl·lules pre-tractades amb TGF- β 1.

Aquests resultats van correlacionar de manera positiva amb l'anàlisi d'expressió de COX-2 per western blot i per immunofluorescència, indicant que el fenotip miofibroblast estaria associat a un notable descens en la secreció de PGE₂.

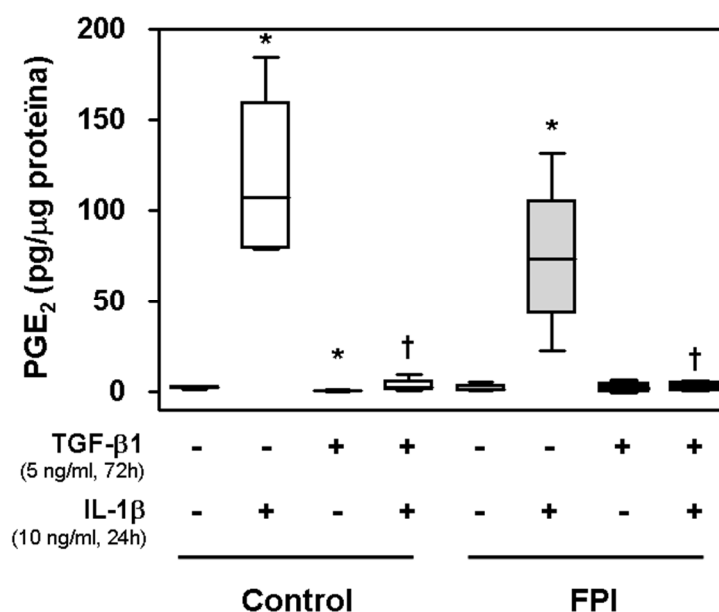


Figura 47.- Mesura de la secreció de PGE₂ després de la inducció de la transició fibroblast-miofibroblast induïda per TGF-β1 en cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). Fibroblastes control i FPI van ser incubats durant 72 h en presència o absència de TGF-β1 (5 ng/ml), seguit pel tractament amb o sense IL-1β (10 ng/ml) durant 24 h. El sobrenedant va ser recollit i es va mesurar la PGE₂ secretada total utilitzant el kit Prostaglandin E₂ EIA (Cayman). Els resultats estan expressats com a pg de PGE₂ secretats/μg contingut de proteïna total. N = 6. * P<0.05 comparat amb les cèl·lules no tractades, † P<0.05 comparat a les cèl·lules tractades amb IL-1β

4.11 Efecte del tractament amb interleuquina-1β i prostaglandina E2 sobre la proliferació de fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica

A continuació vam estudiar el paper de COX-2 i PGE₂ en la proliferació dels cultius amb un alt percentatge de miofibroblastes utilitzant la tècnica Click-iT®. Els fibroblastes van ser incubats amb IL-1β (10 ng/ml), PGE₂ (5 ng/ml) i l'inhibidor selectiu de la COX-2 Celecoxib (10 μM) durant 24h.

En els fibroblastes control, el tractament amb IL-1β va provocar un descens significatiu de la proliferació cel·lular (Figura 48). Aquesta disminució podria estar mediada per COX-2, ja que el tractament amb PGE₂ va inhibir completament la proliferació cel·lular i l'addició de Celecoxib va revertir l'efecte de la IL-1β. Els fibroblastes FPI van presentar una proliferació menor als fibroblastes control, però es van observar efectes similars després de la incubació amb IL-1β, PGE₂ i Celecoxib.

A més a més, el tractament amb TGF-β1 va induir un descens en la proliferació dels fibroblastes control, però no es van observar diferències en els cultius de fibroblastes FPI.

L'efecte inhibitori sobre la proliferació associat amb el tractament amb IL-1 β es va anul·lar en les cèl·lules pre-tractades amb TGF- β 1.

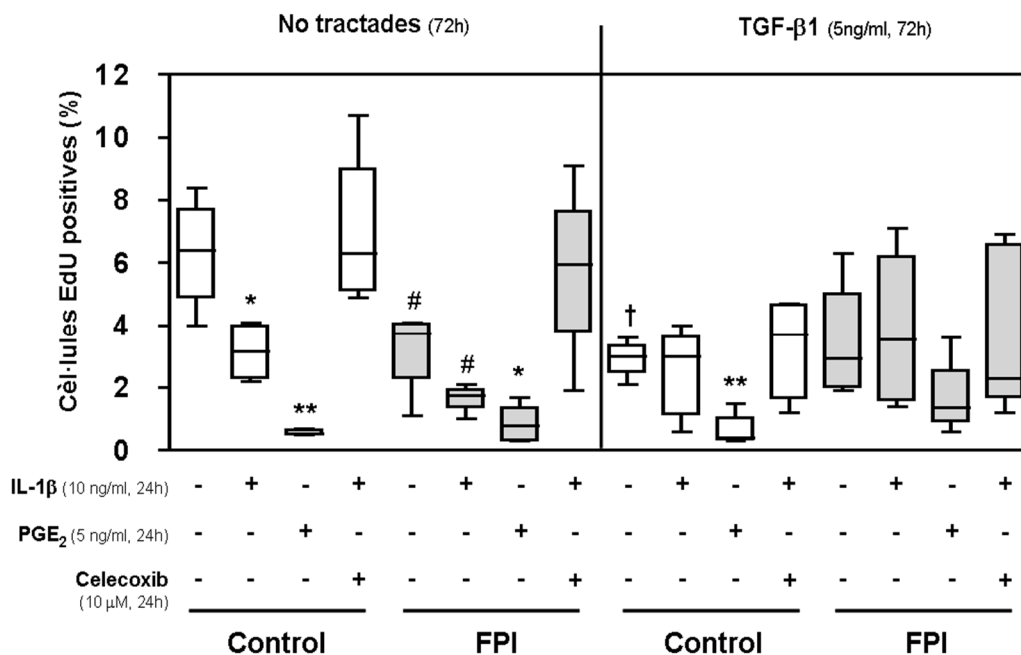


Figura 48.- Proliferació cel·lular mesurada mitjançant l'anàlisi de la replicació del DNA en cultius de fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). Amb aquest objectiu, fibroblastes control i FPI van ser incubats durant 72h en presència o absència de TGF- β 1 (5 ng/ml), seguit pel tractament en presència o absència d'IL-1 β (10 ng/ml), PGE₂ (5 ng/ml) i l'inhibidor selectiu de la COX-2 Celecoxib (10 μ M). La proliferació cel·lular va ser analitzada mesurant la incorporació del nucleòsid modificat EdU al DNA utilitzant el kit comercial Click-iT[®]. Les cèl·lules van ser incubades amb EdU (10 μ M) durant 2h abans de ser recollides per realitzar mesures de citometria de fluxe. Els resultats es presenten com a percentatge de cèl·lules EdU positives respecte al total de cèl·lules. N = 6. * P<0.05 i ** P<0.01 comparat a les respectives cèl·lules no tractades, # P<0.05 comparat al grup control en les mateixes condicions, † P<0.05 comparat a les cèl·lules no tractades amb TGF- β 1 en les mateixes condicions.

4.12 Efecte de la prostaglandina E2 sobre el tancament d'una ferida in vitro en cultius de fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica

La menor expressió de COX-2 dels miofibroblastes també va tenir un efecte sobre l'àrea tancada d'una ferida in vitro. A la figura 49, podem observar que el tancament del tall després de 24h va ser inferior a fibroblastes control tractats amb IL-1 β i amb PGE₂ en comparació amb els no tractats. En cultius FPI, només el tractament amb PGE₂ va disminuir de forma significativa l'àrea tancada del tall. En el cultiu enriquit en miofibroblastes, l'efecte de la IL-1 β sobre el tancament de la ferida es va anul·lar en les cèl·lules control pre-tractades amb TGF- β 1.

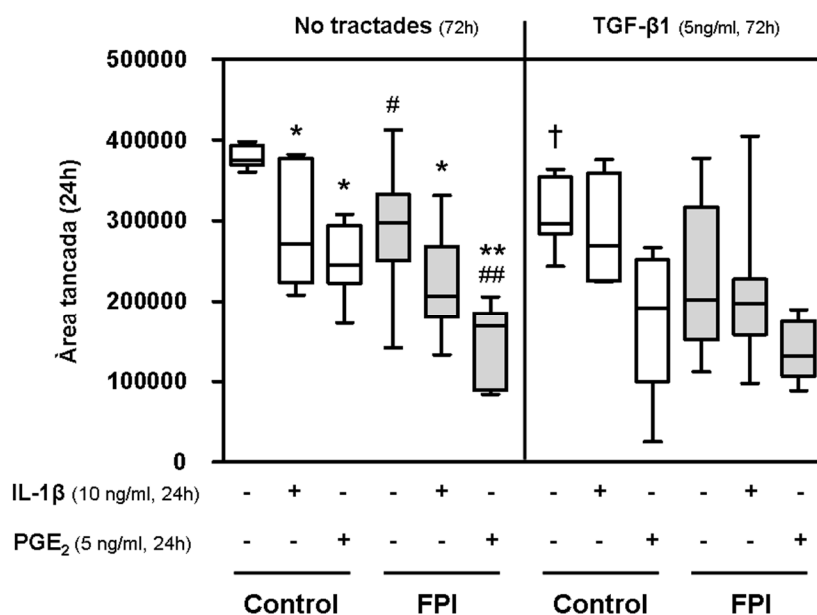


Figura 49.- Efecte del tractament durant 24h amb IL-1 β o PGE₂ sobre el tancament d'una ferida *in vitro* en cultius de fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). Es van pre-tractar les cèl·lules control i FPI en confluència amb 5 ng/ml TGF- β 1 en medi 1% FBS durant 72h i es va realitzar un tall a la monocapa cel·lular. Posteriorment es van tractar les cèl·lules amb presència o absència d'IL-1 β o PGE₂ durant 24h i es va mesurar el tancament de la ferida en aquest temps. N = 8. * P<0.05, ** P<0.01 comparat amb les respectives cèl·lules no tractades, # P<0.05 comparat al grup control en les mateixes condicions, † P<0.05 comparat a les cèl·lules no tractades amb TGF- β 1 en les mateixes condicions.

Després de 48h (Figura 50), l'efecte de la inhibidor sobre el tancament de la ferida de la incubació amb IL-1 β i la PGE₂ es van mantenir als cultius control i FPI no pre-tractats amb TGF- β 1. En el cultiu amb alt percentatge de miofibroblastes, la IL-1 β no va tenir cap efecte en el tancament de la ferida *in vitro*. La PGE₂ en canvi, va disminuir de manera significativa l'àrea tancada tant en miofibroblastes control com FPI en comparació amb els cultius no tractats, fet que no es va observar a 24h però sí a 48h.

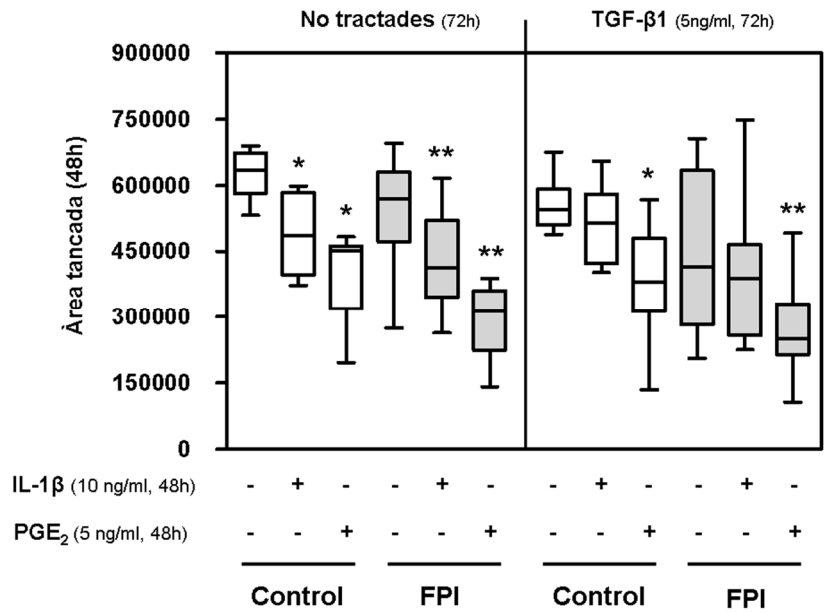


Figura 50.- Efecte del tractament durant 48h amb IL-1β o PGE₂ sobre el tancament d'una ferida *in vitro* en cultius de fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). Es van pre-tractar les cèl·lules control i FPI en confluència amb 5 ng/ml TGF-β1 en medi 1% FBS durant 72h per induir la transició fibroblast-miofibroblast i es va realitzar un tall a la monocapa cel·lular. Posteriorment es van tractar les cèl·lules amb presència o absència d'IL-1β o PGE₂ durant 48h i es va mesurar el tancament de la ferida en aquest temps. N = 8. * P<0.05, ** P<0.01 comparat amb les respectives cèl·lules no tractades

4.13 Expressió de COX-2 i α -SMA en teixit de pulmó control i amb fibrosi pulmonar idiopàtica

Vam examinar la localització d' α -SMA i COX-2 en talls histològics de teixit pulmonar FPI i control per immunohistoquímica (Figura 51). Les cèl·lules epitelials hiperplàstiques van presentar un intens marcatge per COX-2. En teixit FPI, el marcatge per α -SMA es va localitzar als focus de fibroblastes/miofibroblastes, on no es va observar expressió de COX-2.

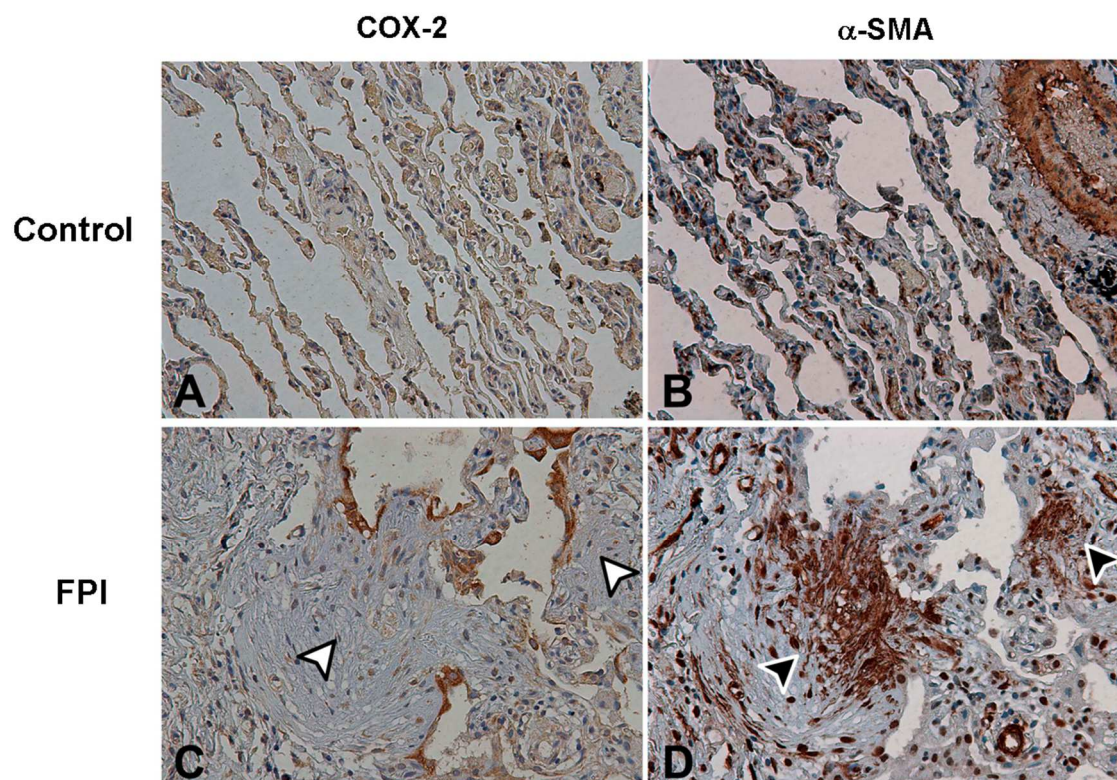


Figura 51.- Detecció immunohistoquímica de COX-2 i α -SMA en teixit pulmonar control i en teixit de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). Es mostren les immuno-localitzacions de COX-2 (A-C) i α -SMA (B-D). La imatge mostra una lleugera expressió basal de COX-2 i marcatge aïllat per α -SMA relacionat a les cèl·lules α -SMA-positives en el teixit control. En contrast, un increment del marcatge d' α -SMA (fletxes negres) i absència d'expressió de COX-2 (fletxes blanques) s'observen en els focus fibroblàstics. L'epiteli metaplàstic presenta una àmplia expressió de COX-2 (augment original X200).

5. EXPRESSIÓ DE COX-2 EN CÈL·LULES EPITELIALS ALVEOLARS A549

5.1 Inducció de la transició epiteli-mesenquimal en cèl·lules epitelials alveolars A549 per mitjà de la incubació amb TGF- β 1

La línia cel·lular d'adenocarcinoma epitelial alveolar A549 va ser utilitzada per estudiar la transició epiteli-mesenquimal (EMT). Per induir la EMT, es van tractar les cèl·lules A549 amb TGF- β 1 (5 ng/ml, 72h), com s'ha descrit anteriorment i es va caracteritzar el procés mitjançant la mesura de marcadors epitelials, mesenquimals i l'expressió de col·lagen 1 α 1.

5.1.1 Disminució de l'expressió d'E-cadherina en cèl·lules epitelials alveolars A549 tractades amb TGF- β 1

En primer lloc, vam avaluar l'expressió del marcador específic epitelial E-cadherina en la línia cel·lular A549 tractades i no tractades amb TGF- β 1. Vam observar que la E-cadherina va disminuir en les cèl·lules tractades amb TGF- β 1 en comparació amb les no-tractades, fet característic del procés d'EMT (Figura 52).

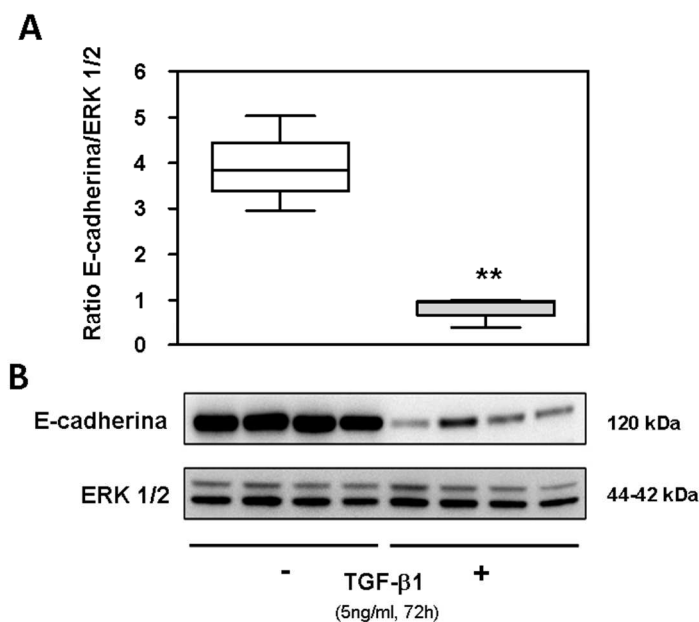


Figura 52.- Expressió d'E-cadherina en cèl·lules epitelials alveolars A549 tractades amb TGF- β 1. Es va induir el procés de transició epiteli-mesenquimal incubant les cèl·lules A549 en presència de TGF- β 1 (5ng/ml, 72h) i es va mesurar l'expressió de la proteïna epitelial E-cadherina. (A) Densitometria de l'expressió d'E-cadherina com a ràtio de l'expressió d'ERK 1/2. (B) Imatge representativa d'un Western blot amb quatre replicats d'E-cadherina i ERK 1/2. ** P<0.01 comparat amb les cèl·lules no tractades

5.1.2 Increment de la síntesi de col·lagen I α 1 i de l'expressió de F-actina en cèl·lules epitelials alveolars tractades amb TGF- β 1.

Després del tractament amb TGF- β 1 durant 72h, les cèl·lules epitelials alveolars A549 van presentar un marcat augment de la síntesi de mRNA de col·lagen 1 α 1 mesurat per RT-PCR, com s'observa a la figura 53.

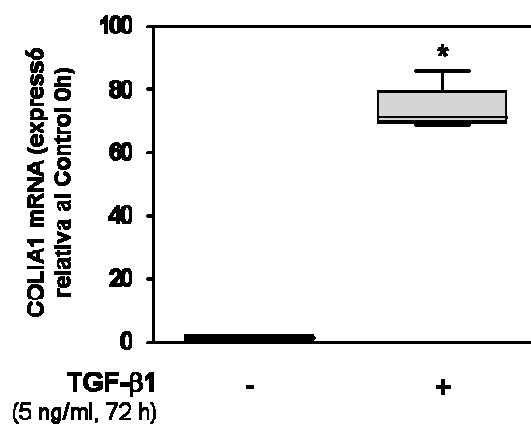


Figura 53.- Increment de l'expressió gènica de col·lagen I α 1 en cèl·lules epitelials alveolars A549 tractades amb TGF- β 1. Les cèl·lules A549 van ser incubades en presència o absència de TGF- β 1 (5 ng/ml, 72h) i es va mesurar l'increment en la síntesi de mRNA de col·lagen I α 1 per RT-PCR, normalitzada pel gen constitutiu RNA polimerasa II. Els resultats es mostren com a expressió relativa respecte al control 0h. * P<0.05 comparat amb les cèl·lules no tractades.

Ahora, vam marcar els canvis en el citoesquelet cel·lular induïts per la EMT tenyint la F-actina amb fal·loïdina. La immunofluorescència va mostrar que el marcatge de F-actina va augmentar en les cèl·lules tractades amb TGF- β 1. Aquest augment va associat al remodelat del citoesquelet cel·lular i a un canvi morfològic cap a un fenotip tipus mesenquimal (figura 54).

Cal indicar que es va trobar un marcatge molt lleu d' α -SMA i absència de marcatge per COX-1 en aquestes cèl·lules, tant de forma basal com després d'estimulació amb TGF- β 1.

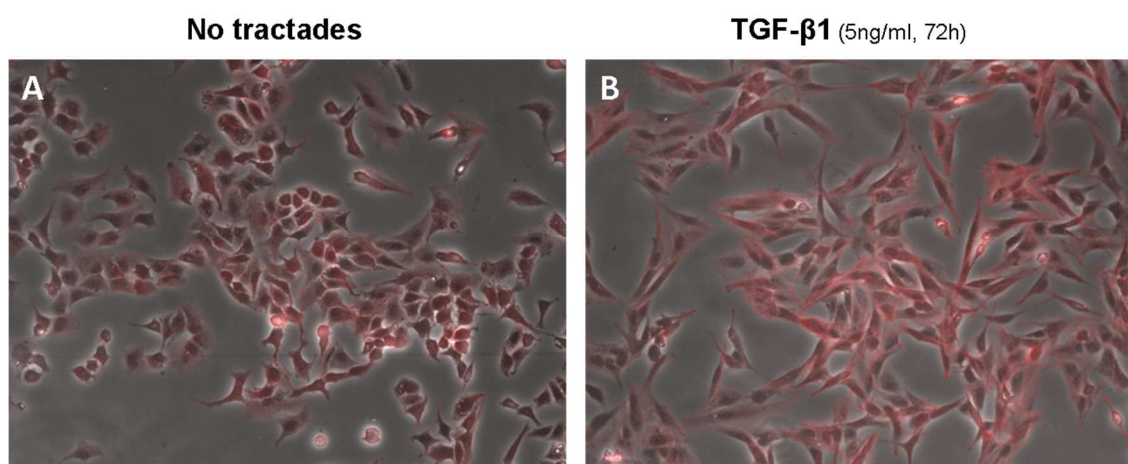


Figura 54.- Imatge representativa d'immunocitoquímica de F-actina de les cèl·lules epitelials alveolars A549 en presència o absència de TGF- β 1. Les cèl·lules A549 es van incubar durant 72h (A) en absència o

(B) en presència de TGF- β 1 (5 ng/ml) per induir el procés d'EMT i es va realitzar el marcatge de les fibres de F-actina (tenyida amb fal·loïdina, vermell). (Augment original X400).

5.2 Expressió de COX-2 en cèl·lules epitelials alveolars A549

5.2.1 Efecte de la interleuquina-1 β sobre l'expressió de COX-2 en cèl·lules epitelials alveolars A549 després de realitzar la transició epitelio-mesenquimal induïda per TGF- β 1

Al contrari que els fibroblasts, les cèl·lules A549 van expressar COX-2 de manera basal, en absència d'estimulació per IL-1 β (Figura 55). El tractament amb TGF- β 1 durant 72h i per tant, la inducció de la EMT, va disminuir aquesta expressió basal. A més a més, vam observar que la inducció de l'expressió de COX-2 per part d'IL-1 β (1 ng/ml), es va veure reduïda en les cèl·lules A549 pre-tractades amb TGF- β 1 de forma molt marcada. Aquesta inhibició es va observar també mitjançant marcatge de COX-2 per immunofluorescència (Figura 56).

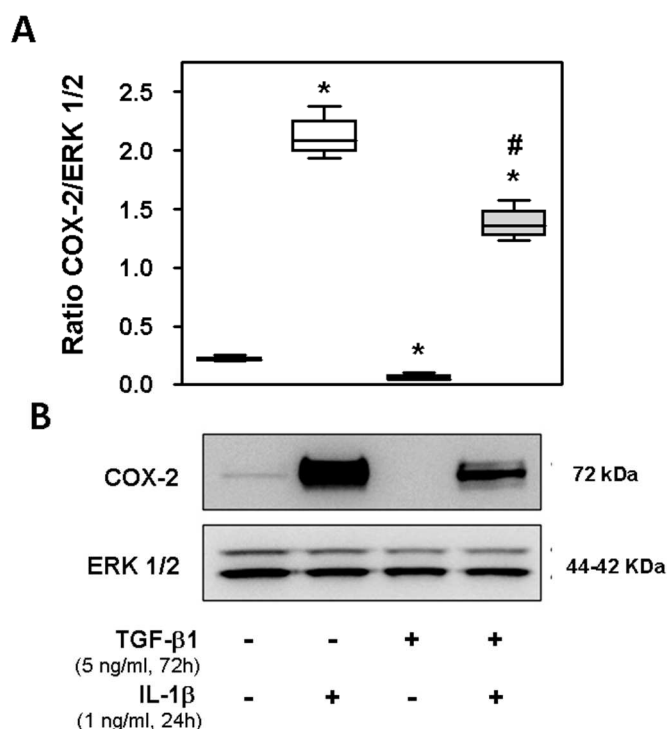


Figura 55.- Efecte del tractament amb interleuquina-1 β (IL-1 β) sobre l'expressió de COX-2 en cèl·lules epitelials alveolars A549 després de ser induïda la transició epitelio-mesenquimal (EMT) per TGF- β 1. Les cèl·lules A549 es van incubar en presència o absència de TGF- β 1 durant 72h amb 5 ng/ml seguit d'una incubació amb o sense IL-1 β durant 24h (1 ng/ml). (A) Anàlisi densitomètric de l'expressió de COX-2 com a ràtio respecte ERK 1/2 i (B) imatge representativa d'un Western blot de COX-2 i ERK 1/2. * P<0.05 comparat amb les respectives cèl·lules no tractades; # P<0.01 comparat amb les cèl·lules tractades amb IL-1 β .

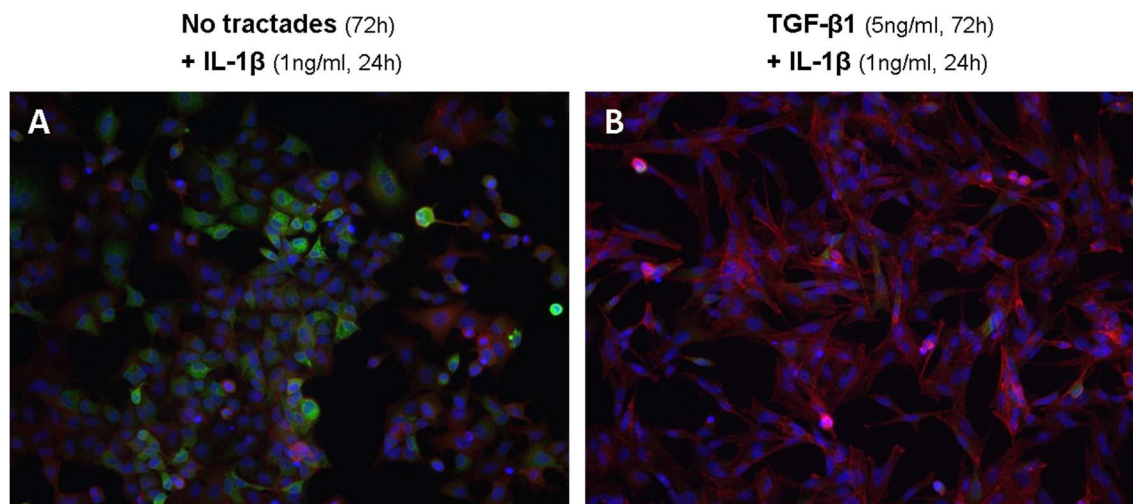


Figura 56.- Immunofluorescència de COX-2 i F-actina en cèl·lules epitelials alveolars A549 en presència o absència de TGF- β 1 i en presència d'interleuquina-1 β (IL-1 β). Es van incubar les cèl·lules A549 durant 72h (A) en absència o (B) en presència de TGF- β 1 (5 ng/ml) i a continuació durant 24h amb IL-1 β (1 ng/ml). Es va realitzar una immunofluorescència per marcar l'expressió de COX-2 (verd) i de la proteïna del citoesquelet F-actina (tenyida de fal·loïdina, vermell). Els nuclis van ser tenyits amb DAPI (blau)(augment original x400)

5.3 Secreció de prostaglandina E2 en cèl·lules epitelials alveolars A549 després de la inducció de la transició epitelio-mesenquimal

A continuació vam examinar els nivells de PGE₂ secretats en els sobrenedants de cultius de cèl·lules A549 tractats amb TGF-β1 durant 72h i posteriorment, tractats amb IL-1β durant 24h.

La incubació amb IL-1β va incrementar la secreció de PGE₂ en cèl·lules A549 (Figura 57). Aquest efecte es va veure disminuït en les cèl·lules pre-tractades amb TGF-β1. Els resultats van correlacionar positivament amb els anàlisis de COX-2 per western blot i per immunofluorescència, suggerint que el fenotip tipus miofibroblast adquirit per les A549 que van realitzar EMT estaria associat a un notable descens en la secreció de PGE₂.

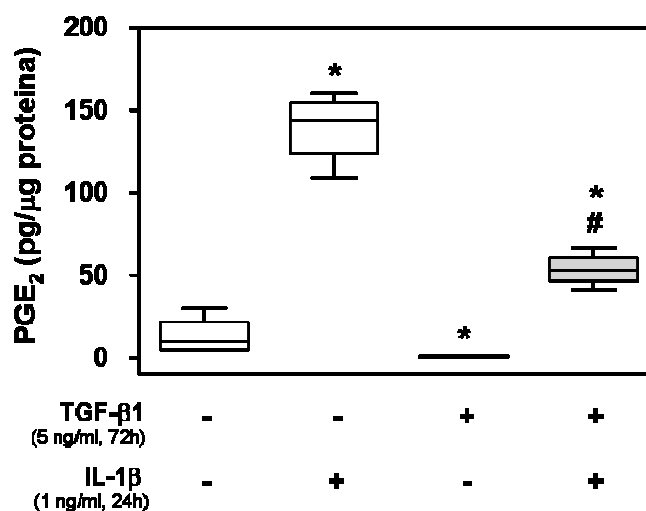


Figura 57.- Mesura de la secreció de PGE₂ després de la inducció de la transició epitelio-mesenquimal en cèl·lules epitelials alveolars A549. Les cèl·lules A549 van ser incubades durant 72 h en presència o absència de TGF-β1 (5 ng/ml), seguit pel tractament amb o sense IL-1β (1 ng/ml) durant 24 h. El sobrenedant va ser recollit i es va mesurar la PGE₂ secretada total utilitzant el kit comercial Prostaglandin E₂ EIA (Cayman). Els resultats estan expressats com a PGE₂ secretada (pg)/contingut de proteïna total (μg). * P<0.05 comparat amb les cèl·lules no tractades, # P<0.01 comparat a les cèl·lules tractades amb IL-1β

5.4 Efecte de la transició epitelio-mesenquimal sobre la proliferació de les cèl·lules epitelials alveolars A549

Vam estudiar el paper de la COX-2 i la PGE₂ en la proliferació del cultiu enriquit amb miofibroblastes utilitzant la tècnica de Click-iT®.

Les cèl·lules A549 cells van ser incubades amb IL-1 β (1 ng/ml), PGE₂ (5 ng/ml) i l'inhibidor selectiu de la COX-2 Celecoxib (10 μ M) durant 24h. La incubació amb IL-1 β va reduir la proliferació de manera significativa tant en les cèl·lules tractades amb TGF- β 1 com en les no tractades (Figura 58). Aquest efecte va semblar ser independent de COX-2 i PGE₂, ja que l'inhibidor de COX-2 Celecoxib no va ser capaç de retornar els nivells de proliferació control i la PGE₂ per sí mateixa no va tenir efecte en la proliferació cel·lular. A més a més, vam observar que el tractament amb TGF- β 1 va augmentar la proliferació cel·lular de manera significativa.

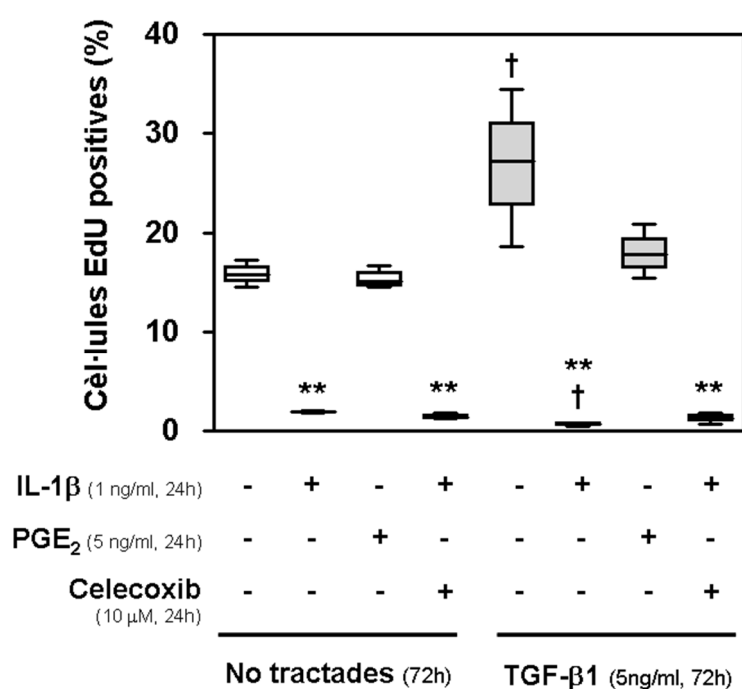


Figura 58.- Proliferació de la línia cel·lular alveolar epitel·lial A549 mesurada mitjançant l'anàlisi de la replicació del DNA. Les cèl·lules A549 van ser incubades durant 72h en presència o absència de TGF- β 1 (5 ng/ml), seguit pel tractament en presència o absència d'IL-1 β (1 ng/ml), PGE₂ (5 ng/ml) i l'inhibidor selectiu de la COX-2 Celecoxib (10 μ M). La proliferació cel·lular va ser analitzada mesurant la incorporació del nucleòsid modificat EdU al DNA utilitzant el kit comercial Click-iT®. Les cèl·lules van ser incubades amb EdU (10 μ M) durant 2h abans de ser recollides per realitzar mesures de citometria de fluxe. Els resultats es presenten com a percentatge de cèl·lules EdU positives respecte al total de cèl·lules. ** P<0.01 comparat a les respectives cèl·lules no tractades, † P<0.05 comparat a les cèl·lules no tractades amb TGF- β 1 en les mateixes condicions.

6. EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR 1 D'INTERLEUQUINA-1 EN FIBROBLASTES CONTROL I DE FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA

6.1 Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica

A continuació, vam avaluar l'expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en extractes proteics i RNA obtinguts de fibroblastes control i FPI com a possible mecanisme de la disminució de l'expressió de COX-2 en fibroblastes procedents de pacients amb FPI i del fenotip miofibroblast.

L'expressió de IL-1RI va ser significativament inferior en fibroblastes FPI respecte els control, observat tant per *western blot* com per RT-PCR (Figura 59).

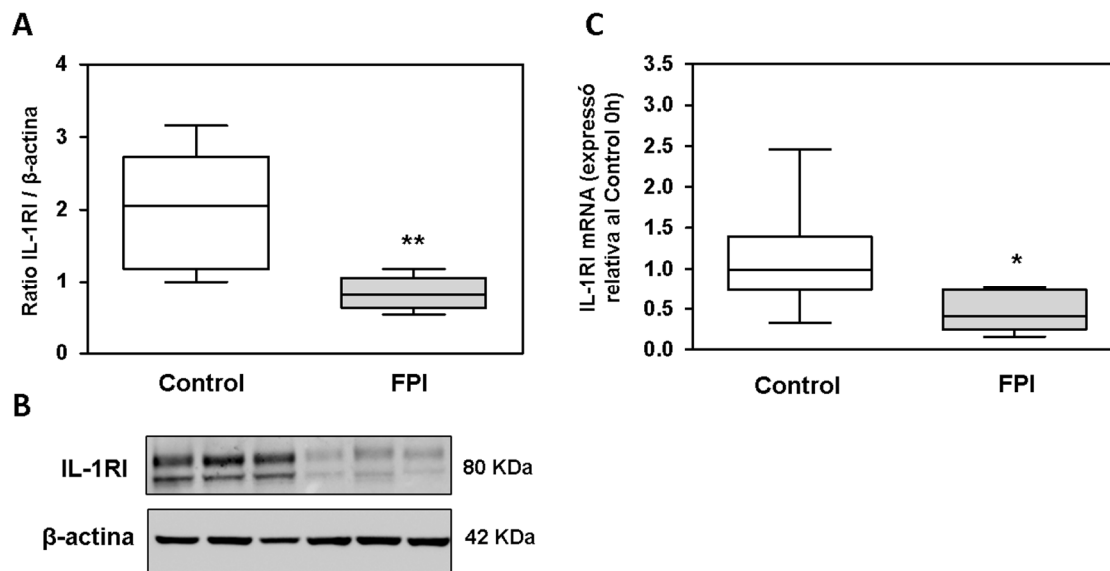


Figura 59.- Expressió basal del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). (A) Anàlisi densitomètric de l'expressió de IL-1R1 com a ràtio respecte β -actina i (B) imatge representativa d'un *Western blot* de IL-1RI i β -actina. (C) mRNA de IL-1R1 mesurat per RT-PCR normalitzat per l'expressió del gen constitutiu RNA polimerasa II. Els resultats es mostren com a expressió relativa al control 0h. N = 7 Controls, N = 6 FPI. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparat al grup control

6.2 Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica tractats amb interleuquina-1 β

Per tal de mesurar l'efecte de la IL-1 β sobre l'expressió de IL-1RI, es van incubar els fibroblastes control i FPI amb 10 ng/ml IL-1 β durant 24h.

El tractament amb IL-1 β durant 24h va induir de manera significativa l'expressió de IL-1RI en fibroblastes control observat per *western blot* (Figura 60). En fibroblastes FPI, aquest increment va ser inferior en comparació amb els cultius control. L'expressió de mRNA de IL-1RI va ser induïda de manera significativa per IL-1 β , tant en cultius control com FPI.

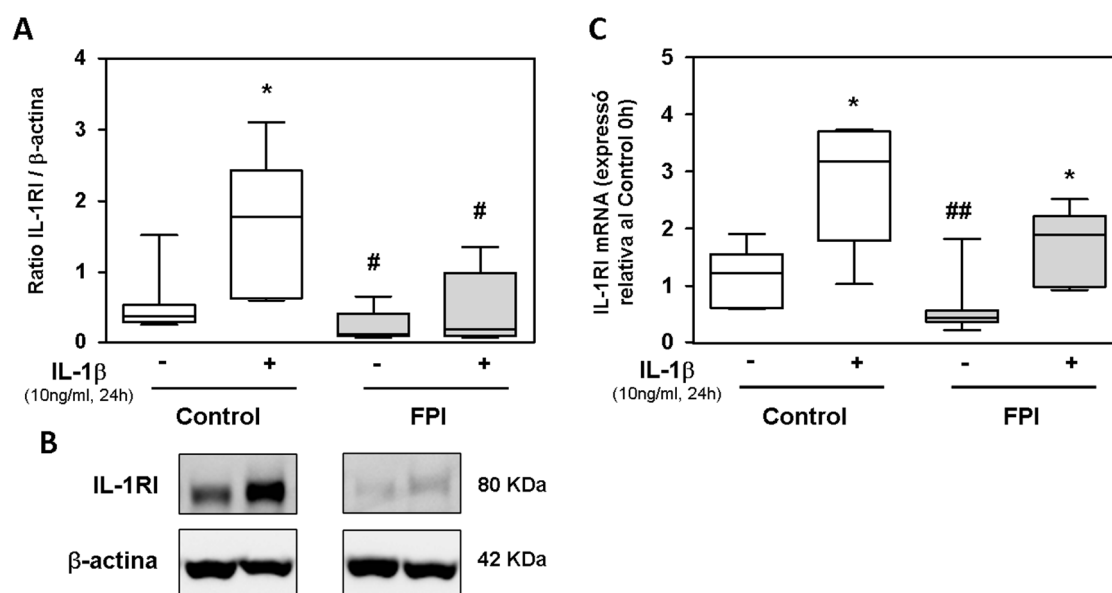


Figura 60.- Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) estimulats amb IL-1 β . Els fibroblastes control i FPI van ser incubats amb o sense IL-1 β (10ng/ml, 24h) i es va mesurar l'expressió de IL-1RI per *western blot* i per RT-PCR. (A) Anàlisi densitomètrica de l'expressió de IL-1RI com a ràtio respecte β -actina, (B) Imatge representativa d'un *Western blot* de IL-1RI i β -actina. (C) mRNA de IL-1RI mesurat per RT-PCR normalitzat per l'expressió del gen constitutiu RNA polimerasa II. Els resultats es mostren com a expressió relativa al control 0h. N = 7 Controls, N = 6 FPI. * p<0.05 comparat a les respectives cèl·lules no tractades; # p<0.05 and ## p<0.01 comparat al grup control en les mateixes condicions.

6.3 Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 en miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica

A continuació, vam analitzar l'expressió de IL-1RI en miofibroblastes procedents de cultius de fibroblastes control i FPI. Per fer-ho, vam induir la FMT incubant les cèl·lules amb TGF- β 1 (5 ng/ml, 72h) i vam mesurar l'expressió de IL-1RI en els cultius enriquits en miofibroblastes tant per western blot com per RT-PCR.

Com s'observa a la figura 61, l'expressió de IL-1RI va disminuir de manera molt pronunciada en els cultius control i FPI tractats amb TGF- β 1, arribant a ser pràcticament nul·la en el cas dels miofibroblastes FPI. Aquest mateix resultat es va observar analitzant l'expressió de mRNA de IL-1RI per RT-PCR.

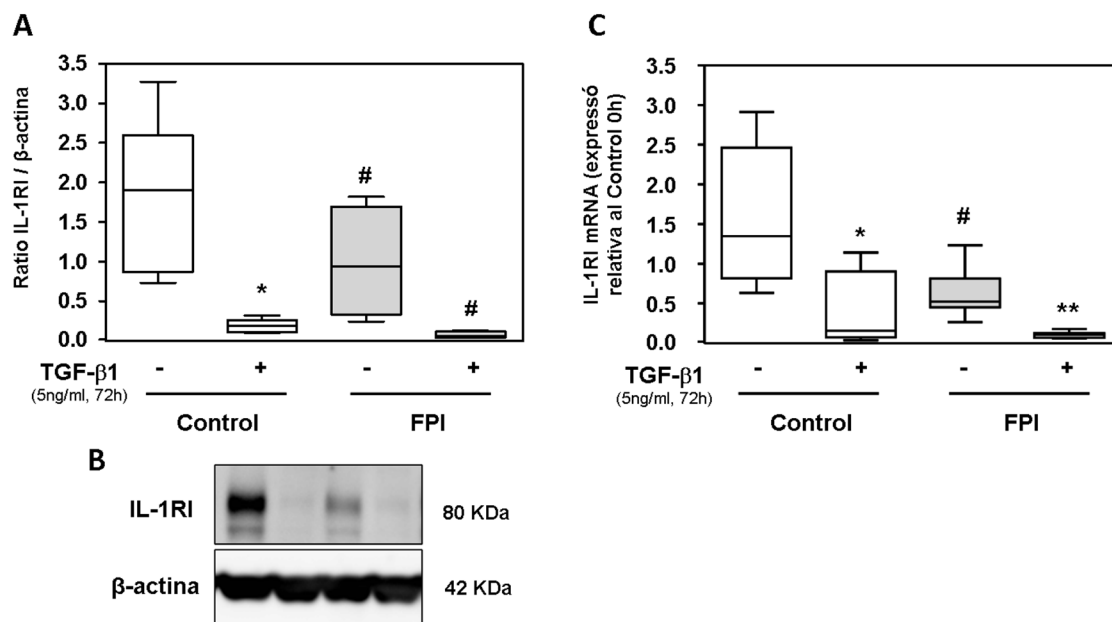


Figura 61.- Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). Els fibroblastes control i FPI van ser incubats amb o sense TGF- β 1 (5ng/ml, 72h) i es va mesurar l'expressió de IL-1RI per *western blot* i per RT-PCR. (A) Anàlisi densitomètric de l'expressió de IL-1RI com a ràtio respecte β -actina i (B) imatge representativa d'un *western blot* de IL-1RI i β -actina. (C) mRNA de IL-1RI mesurat per RT-PCR normalitzat per l'expressió del gen constitutiu RNA polimerasa II. Els resultats es mostren com a expressió relativa al control 0h. N = 7 Controls, N = 8 FPI. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparat a les respectives cèl·lules no tractades, # $p < 0.05$ comparat al grup control en les mateixes condicions

6.4 Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 en miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica tractats amb interleuquina-1 β

A continuació, vam analitzar la capacitat d'inducció de IL-1RI en miofibroblastes control i FPI per part d'IL-1 β . Els fibroblastes control i FPI van ser incubats amb TGF- β 1 (5 ng/ml, 72h) i posteriorment amb IL-1 β (10 ng/ml, 24h) i es va analitzar l'expressió d'IL-1RI per *western blot* i per immunofluorescència.

Com s'observa a la figura 62, la capacitat d'IL-1 β d'induir l'expressió de IL-1RI es va anul·lar completament en miofibroblastes control i FPI. Aquest resultat va indicar una alteració en l'expressió de IL-1R associada al fenotip miofibroblast.

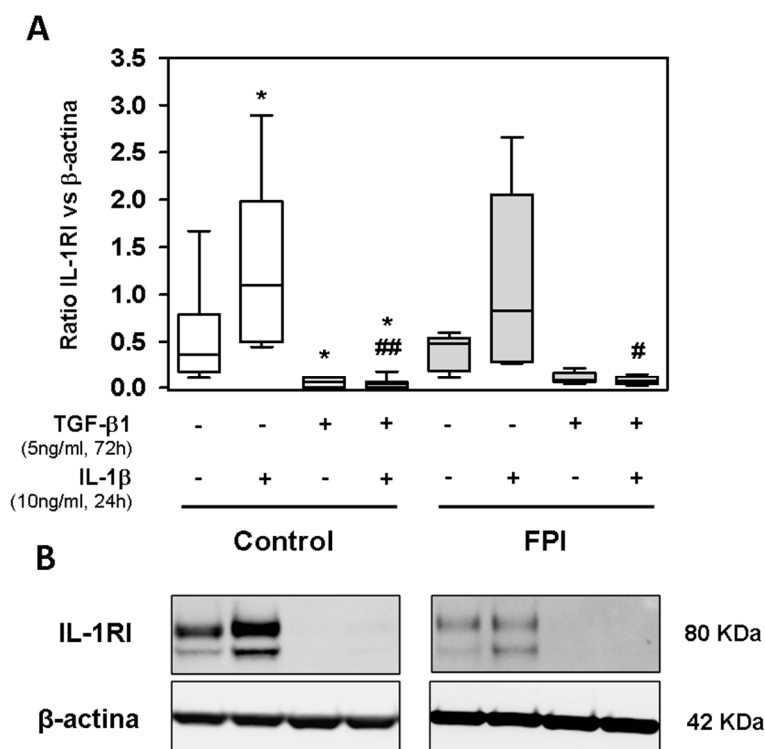


Figura 62.- Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en fibroblastes i miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) estimulats amb IL-1 β . Els fibroblastes control i FPI van ser incubats amb o sense TGF- β 1 (5ng/ml, 72h) i a continuació amb o sense IL-1 β (10ng/ml, 24h) i es va mesurar l'expressió de IL-1RI per *western blot*. (A) Anàlisi densitomètric de l'expressió de IL-1RI com a ràtio respecte β -actina i (B) Imatge representativa d'un *western blot* de IL-1RI i de β -actina. N = 6 Controls, N = 8 FPI. * p<0.05 comparat a les respectives cèl·lules no tractades, # p<0.05, ## p<0.01 comparat a les cèl·lules no tractades amb TGF- β 1 en les mateixes condicions.

Es va realitzar una immunofluorescència pel receptor IL-1RI en fibroblastes control i FPI, en presència i absència d'IL-1 β (10 ng/ml, 24h) i TGF- β 1 (5 ng/ml, 72h), amb l'objectiu de confirmar els resultats obtinguts per *western blot*.

La immunofluorescència va confirmar que l'expressió d'IL-1RI va ser superior en fibroblastes control respecte als FPI, així com la inducció per IL-1 β (Figura 63). El tractament amb TGF- β 1, va disminuir el marcatge per IL-1RI tant en cultius control com FPI, fet associat a l'increment del nombre de miofibroblastes.

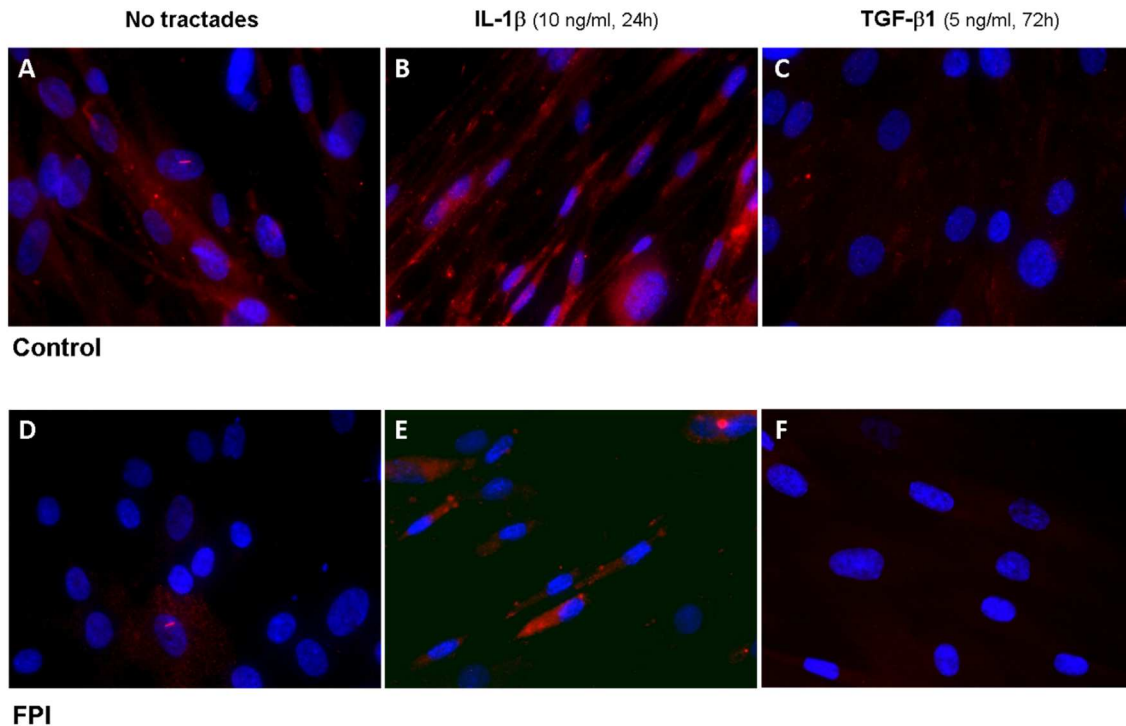


Figura 63.- Immunofluorescència de l'expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) basalment i en presència o absència d'IL-1 β o TGF- β 1. Els fibroblastes de cultius control i FPI van ser fixats en absència de tractament (A,D), tractats durant 24h amb IL-1 β (10ng/ml)(B,E) o durant 72h amb TGF- β 1 (5ng/ml)(C,F) i es va realitzar un marcatge immunofluorescent de IL-1RI (vermell). Els nuclis van ser tenyits amb DAPI (blau)(augment original 630x).

Finalment, es va realitzar un marcatge conjunt per immunofluorescència de IL-1RI i α -SMA per observar si hi havia coincidència de positivitat pels dos marcadors.

Com s'observa a la figura 64, les cèl·lules IL-1RI positives no van presentar marcatge per α -SMA. En alguns casos, els miofibroblastes van presentar un lleuger marcatge pel receptor. Aquests resultats van en la mateixa línia que els observats per *western blot*, on els cultius tractats amb TGF- β 1 van presentar una expressió molt baixa de IL-1RI.

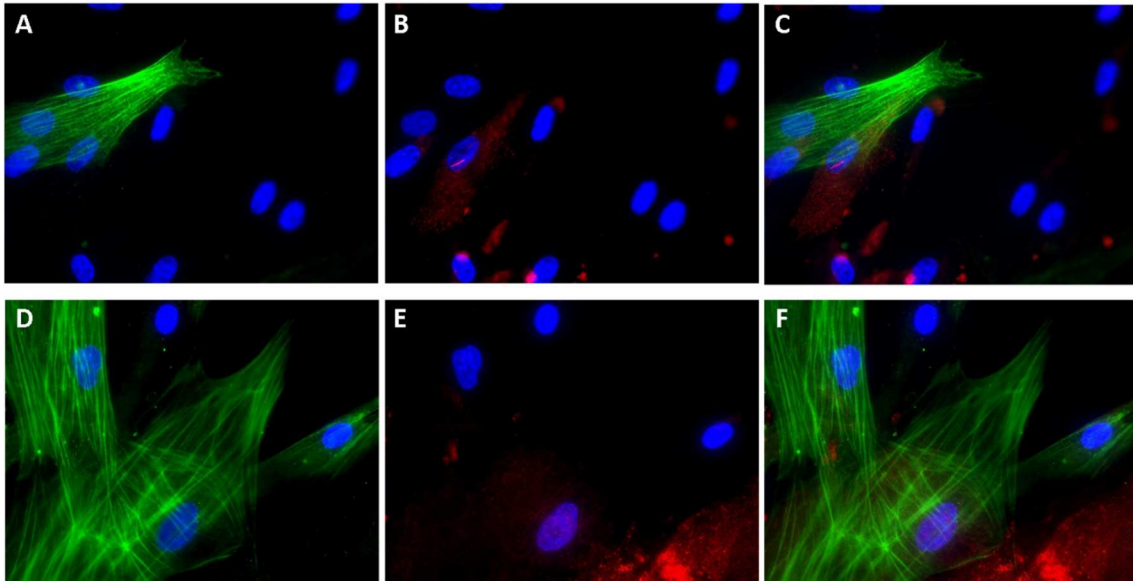


Figura 64.- Imatges representatives de co-immunofluorescència de l'expressió de del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) i α -SMA en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). Es van incubar els fibroblastes amb TGF- β 1 durant 72h a 5ng/ml i es va realitzar una co-immunofluorescència per marcar α -SMA en verd i IL-1RI en vermell. En el canal verd s'observen les cèl·lules α -SMA positives (A,D), en el vermell les IL-1RI positives (B,E) i en els dos canals alhora es mostra el marcatge conjunt (C,F). Es va observar una coincidència molt baixa entre ambdós marcatges. Els nuclis van ser tenyits amb DAPI (blau)(augment original 630x).

6.5 Correlació entre l'expressió de COX-2 i del receptor d'interleuquina-1 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica

Degut a que havíem observat una alteració de l'expressió de COX-2 induïda per IL-1 β en miofibroblastes i també de expressió de IL-1RI vam estudiar si existia una correlació entre l'expressió de les dues proteïnes. Ja que l'estimulació de COX-2 per part d'IL-1 β es dona a través de la seva unió amb IL-1RI, una alteració en el receptor podria ser causant de la menor inducció de l'expressió de COX-2 en aquestes cèl·lules.

A la figura 65 s'observa una imatge de *western blot* representativa de la correlació aparent entre l'expressió de COX-2 i la de IL-1RI. Els valors de correlació entre l'expressió de COX-2 i de IL-1RI mesurada per *western blot* va ser de $R^2 = 0,7071$ i per RT-PCR de $R^2 = 0,6974$.

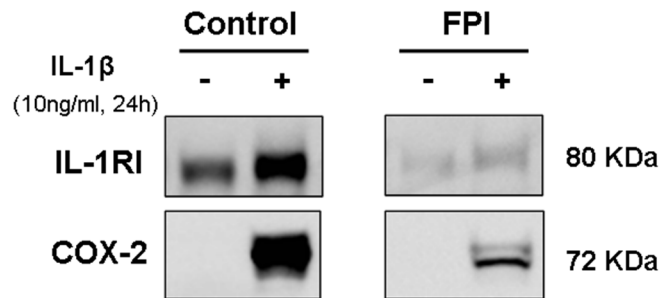


Figura 65.- Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) i de COX-2 en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) tractats amb IL-1 β . Imatge representativa d'un *western blot* de IL-1RI i COX-2 en llisats proteics de fibroblastes control i FPI en presència o absència d'IL-1 β (10ng/ml, 24h).

6.6 Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 en teixit de pulmó control i amb fibrosi pulmonar idiopàtica

Per tal d'establir si la deficiència en l'expressió de IL-1R1 observada en fibroblastes FPI es donava en teixit FPI, vam analitzar l'expressió del receptor IL-1R1 en llisats proteics de teixit total, tant control com FPI.

No es van observar diferències en l'expressió de IL-1R1 entre teixit control i FPI (Figura 66). Aquest fet podria ser degut a diferències d'expressió del receptor entre la variable composició cel·lular dels fragments de teixit analitzats.

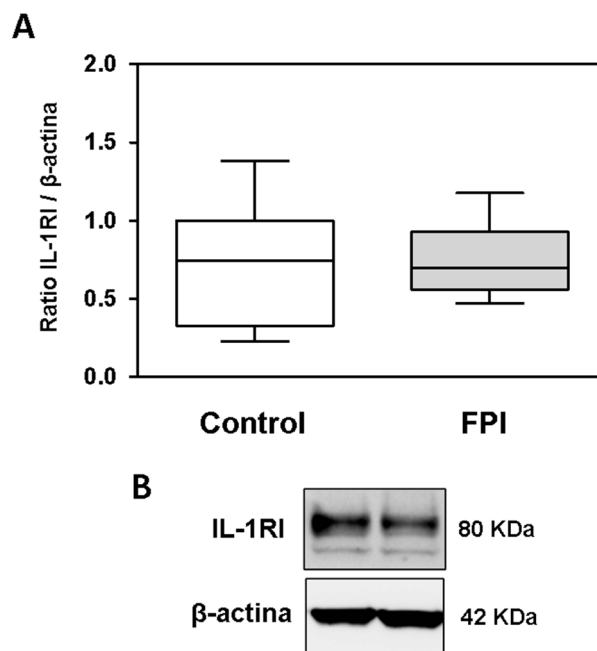


Figura 66.- Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en llisats proteics de teixit control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). (A) Anàlisi densitomètric de l'expressió de IL-1RI com a ràtio respecte β -actina i (B) imatge representativa d'un *western blot* de IL-1RI i de β -actina. N = 7 Controls, N = 9 FPI.

Per tal d'analitzar el paper en l'expressió del receptor IL-1RI dels diversos tipus cel·lulars presents en el teixit pulmonar, vam realitzar la detecció immunohistoquímica de IL-1RI, α -SMA i vimentina en teixit pulmonar sa i en teixit de fibrosi pulmonar idiopàtica.

A la figura 67 es mostren les immuno-localitzacions de IL-1RI, α -SMA i vimentina. Vam observar marcatge de IL-1RI en zones epitelials tant de teixit control com FPI, destacant l'epiteli que rodeja els focus fibroblàstics. En canvi, l'expressió de IL-1RI va ser molt baixa a dins del focus, on destaquen les cèl·lules α -SMA positives i vimentina positives, corresponent a fibroblastes i miofibroblastes. Aquest resultat coincidiria amb les diferències observades en l'expressió de IL-1RI en fibroblastes a nivell de *western blot* i RT-PCR i a que en canvi, no es van trobar diferències a nivell de teixit, degut a la variabilitat de cèl·lules que el formen.

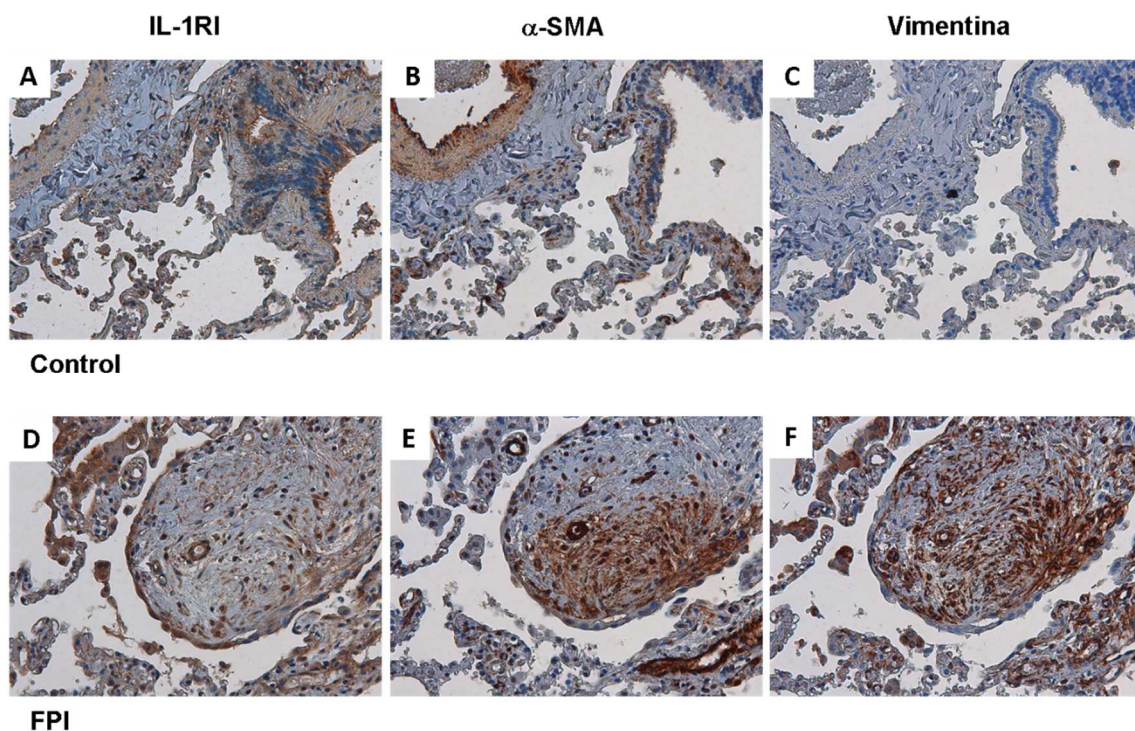


Figura 67.- Detecció immunohistoquímica de IL-1RI, α -SMA i vimentina en teixit pulmonar control i en teixit de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). Es mostren les immuno-localitzacions de IL-1RI (A,D), α -SMA (B,E) i vimentina (C,F). La imatge mostra marcatge de IL-1RI en zones epitelials tant de teixit control com FPI, destacant l'epiteli que rodeja els focus fibroblàstics presents en FPI. En canvi, l'expressió de IL-1RI és molt baixa a dins del focus, on destaquen les cèl·lules α -SMA positives i vimentina positives (augment original X200).

6.7 Expressió del receptor 2 d'interleuquina-1 i de la proteïna accessòria en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica

A continuació, vam avaluar l'expressió del receptor 2 d'interleuquina-1 (IL-1RII) en extractes proteics i RNA obtinguts de fibroblastes control i FPI. IL-1RII actua com a inhibidor de la resposta a IL-1 β , ja que no permet la transducció de senyal degut a que no té el domini citoplasmàtic TIR. L'expressió de IL-1RII no va presentar canvis en fibroblastes FPI respecte els control, observat tant per *western blot* com per RT-PCR (Figura 68). Així doncs, no hi van haver diferències en la regulació de l'efecte d'L-1 β deguda a l'expressió de IL-1RII.

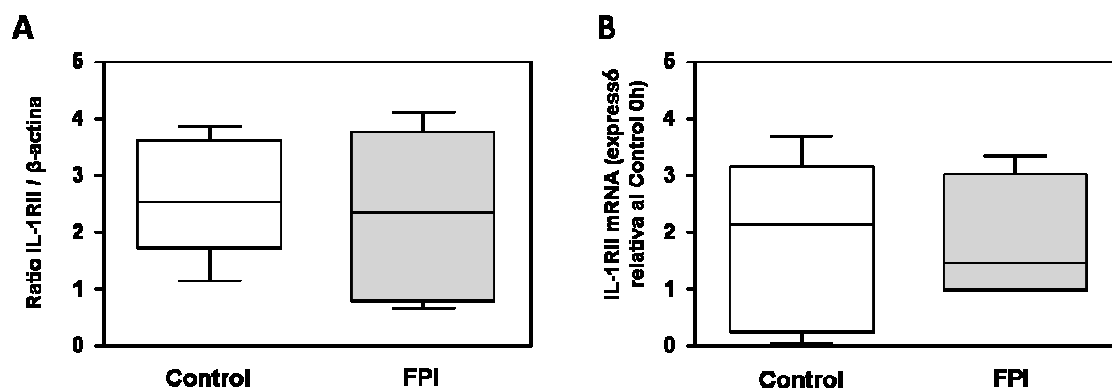


Figura 68.- Expressió basal del receptor 2 d'interleuquina-1 (IL-1RII) en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). (A) Anàlisi densitomètric de l'expressió de IL-1RII com a ràtio respecte β -actina i (B) mRNA de IL-1RII mesurat per RT-PCR normalitzat per l'expressió del gen constitutiu RNA polimerasa II. Els resultats es mostren com a expressió relativa al control 0h. N = 7.

Per tal de mesurar l'efecte de la IL-1 β sobre l'expressió de IL-1RII, es van incubar els fibroblastes control i FPI amb 10 ng/ml IL-1 β durant 24h.

El tractament amb IL-1 β durant 24h va induir de manera significativa l'expressió de mRNA de IL-1RII en fibroblastes control i FPI observat per RT-PCR (Figura 69). Aquesta inducció podria correspondre a un mecanisme de regulació negativa de IL-1 β per tal de controlar el seu efecte.

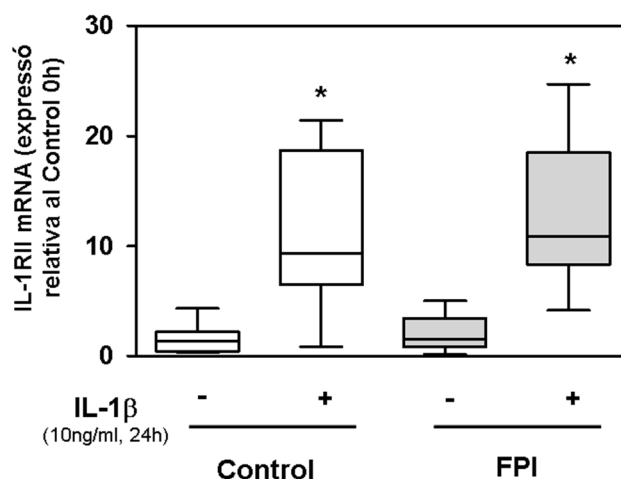


Figura 69.- Expressió del receptor 2 d'interleuquina-1 (IL-1RII) en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) estimulats amb IL-1β. Els fibroblastes control i FPI van ser incubats amb o sense IL-1β (10ng/ml, 24h) i es va mesurar l'expressió de IL-1RII per RT-PCR. L'expressió de IL-1RII va ser normalitzada per l'expressió del gen constitutiu RNA polimerasa II. Els resultats es mostren com a expressió relativa al control 0h. N = 6 Controls, N = 8 FPI. * p<0.05 comparat a les respectives cèl·lules no tractades

A continuació, vam analitzar l'expressió de IL-1RII en miofibroblastes procedents de cultius de fibroblastes control i FPI. Per fer-ho, vam induir la FMT incubant les cèl·lules amb TGF-β1 (5 ng/ml, 72h) i vam mesurar l'expressió de IL-1RII en els cultius enriquits en miofibroblastes per RT-PCR.

Com s'observa a la figura 70, l'expressió de mRNA de IL-1RII va disminuir de manera significativa en els cultius FPI tractats amb TGF-β1.

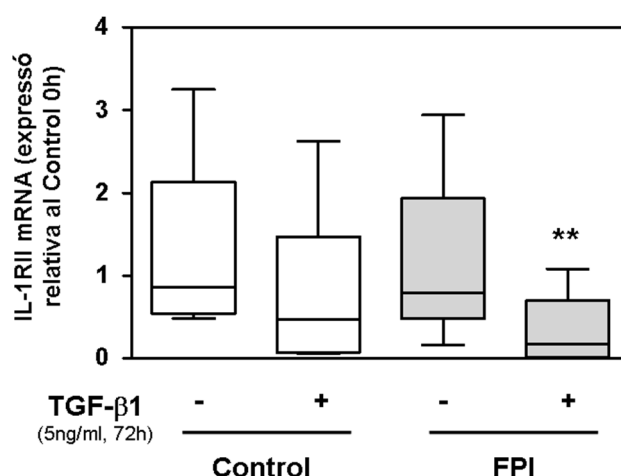


Figura 70.- Expressió del receptor 2 d'interleuquina-1 (IL-1RII) en miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). Els fibroblastes control i FPI van ser incubats amb o sense TGF-β1 (5ng/ml, 72h) i es va mesurar l'expressió de IL-1RII per RT-PCR. L'expressió de IL-1RII va ser normalitzada per l'expressió del gen constitutiu RNA polimerasa II. Els resultats es mostren com a expressió relativa al control 0h. N = 7 Controls, N = 8 FPI. **p<0.01 comparat a les respectives cèl·lules no tractades.

A continuació, vam avaluar l'expressió de la proteïna accessòria del receptor d'interleuquina-1 (IL-1RAcP) en extractes proteics i RNA obtinguts de fibroblastes control i FPI. La disponibilitat de IL-1RAcP és un mecanisme de control de l'efecte d'IL-1 β , ja que la seva presència a la membrana és necessària perquè es dugui a terme la transducció de senyal.

L'expressió de IL-1RAcP va ser significativament inferior en cultius FPI respecte els control. En canvi, no es van observar diferències en l'expressió de mRNA de IL-1RAcP entre fibroblastes FPI respecte a fibroblastes control per RT-PCR (Figura 71).

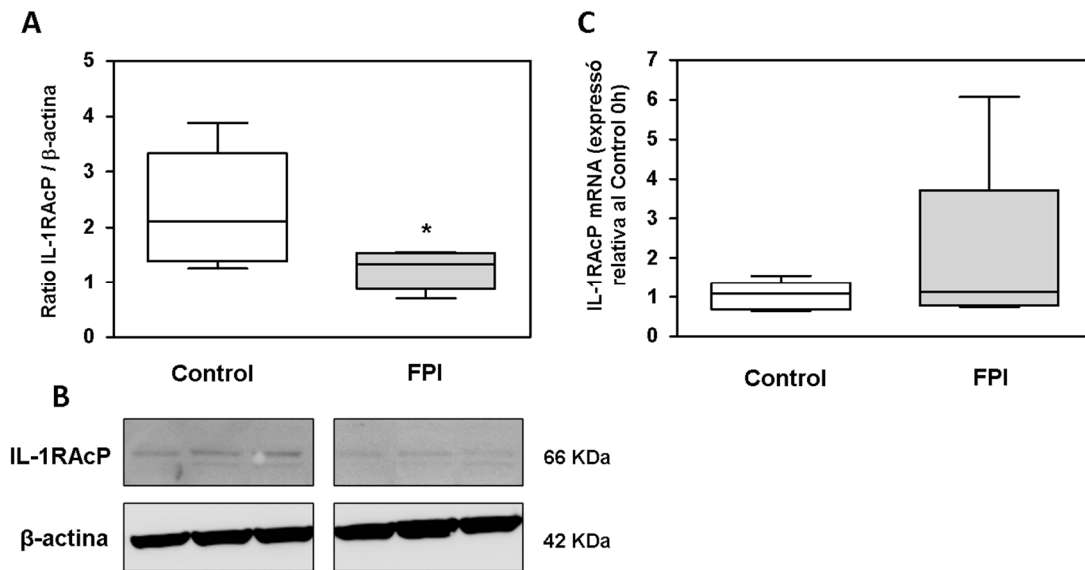


Figura 71.- Expressió basal de la proteïna accessòria del receptor d'interleuquina-1 (IL-1RAcP) en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). (A) Anàlisi densitomètric de l'expressió de IL-1RAcP com a ràtio respecte β -actina i (B) imatge representativa d'un *western blot* de IL-1RAcP i β -actina. (C) mRNA de IL-1RAcP mesurat per RT-PCR normalitzat per l'expressió del gen constitutiu RNA polimerasa II. Els resultats es mostren com a expressió relativa al control 0h. N = 7 Controls, N = 6 FPI. * p<0.05 comparat al grup control.

Es van incubar els fibroblastes control i FPI amb 10 ng/ml IL-1 β durant 24h i es va mesurar l'efecte de la IL-1 β sobre l'expressió de IL-1RAcP per RT-PCR.

El tractament amb IL-1 β durant 24h va induir de manera significativa l'expressió de mRNA de IL-1RAcP en fibroblastes control i FPI (Figura 72). Així doncs, el tractament amb IL-1 β va incrementar la síntesi de mRNA tant de IL-1RAcP com de IL-1RII.

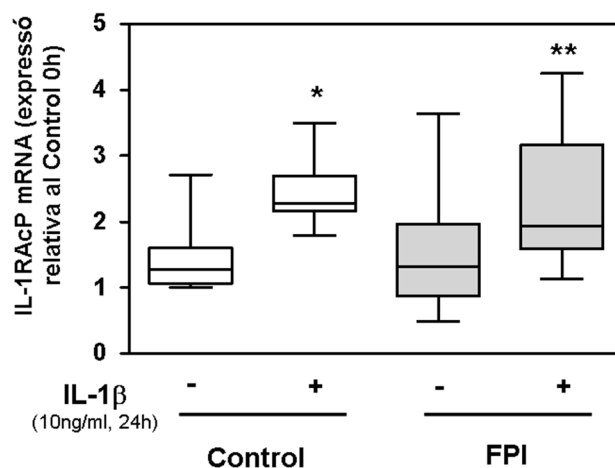


Figura 72.- Expressió de la proteïna accessòria del receptor d'interleuquina-1 (IL-1RAcP) en fibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) estimulats amb IL-1 β . Els fibroblastes control i FPI van ser incubats amb o sense IL-1 β (10 ng/ml, 24h) i es va mesurar l'expressió de IL-1RAcP per RT-PCR. L'expressió de IL-1RAcP va ser normalitzada per l'expressió del gen constitutiu RNA polimerasa II. Els resultats es mostren com a expressió relativa al control 0h. N = 6 Controls, N = 8 FPI. * p<0.05 i **p<0.01 comparat a les respectives cèl·lules no tractades.

A continuació, vam analitzar l'expressió de IL-1RAcP en miofibroblastes procedents de cultius de fibroblastes control i FPI. Per fer-ho, vam induir la FMT incubant les cèl·lules amb TGF- β 1 (5 ng/ml, 72h) i vam mesurar l'expressió de IL-1RAcP en els cultius enriquits en miofibroblastes per RT-PCR. Com s'observa a la figura 73, l'expressió de mRNA de IL-1RAcP es va incrementar de manera significativa tant en miofibroblastes control com FPI en comparació amb els no tractats amb TGF- β 1.

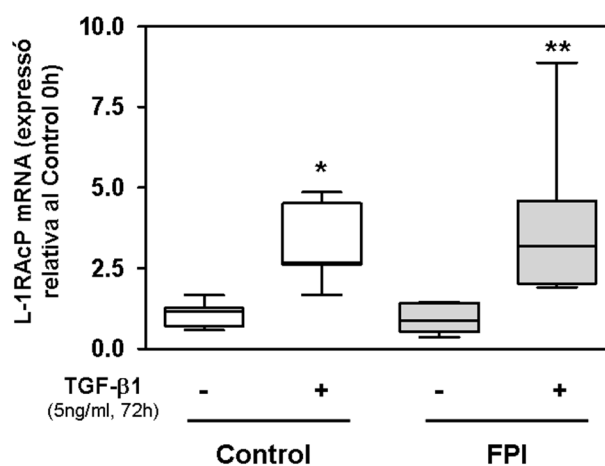


Figura 73.- Expressió de la proteïna accessòria del receptor d'interleuquina-1 (IL-1RAcP) en miofibroblastes control i de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI). Els fibroblastes control i FPI van ser incubats amb o sense TGF- β 1 (5ng/ml, 72h) i es va mesurar l'expressió de IL-1RAcP per RT-PCR. L'expressió de IL-1RAcP va ser normalitzada per l'expressió del gen constitutiu RNA polimerasa II. Els resultats es mostren com a expressió relativa al control 0h. N = 7 Controls, N = 8 FPI. * p<0.05 i **p<0.01 comparat a les respectives cèl·lules no tractades.

7. EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR 1 D'INTERLEUQUINA-1 EN CÈL·LULES EPITELIALS ALVEOLARS A549

A continuació, vam analitzar l'expressió del receptor IL-1RI en presència d'IL-1 β i després de la inducció de EMT per TGF- β 1 en la línia cel·lular epitelial alveolar A549 (Figura 74). Per *western blot*, vam observar que la incubació amb IL-1 β durant 24h va disminuir l'expressió de IL-1RI respecte a les cèl·lules no tractades. La inducció d'EMT per TGF- β 1 també va tenir aquest efecte.

Però la major disminució en l'expressió de IL-1RI es va observar en cèl·lules tractades amb TGF- β 1 durant 72h seguides de 24h amb IL-1 β . En aquestes cèl·lules es va reduir l'expressió de IL-1RI fins a assolir nivells pràcticament nuls. Aquesta absència d'expressió de IL-1RI en cèl·lules epitelials alveolars tractades amb IL-1 β després de inducció de EMT va correlacionar de manera positiva amb la disminució de l'expressió de COX-2 en aquestes condicions.

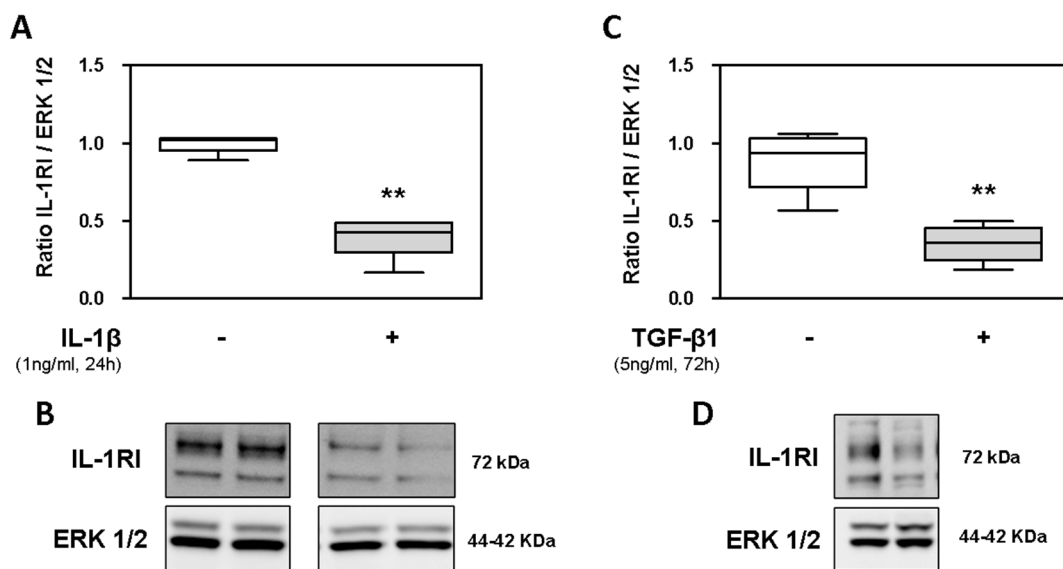


Figura 74.- Efecte de la IL-1 β i del TGF- β 1 sobre l'expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en cèl·lules epitelials alveolars A549. Les cèl·lules A549 es van incubar en presència o absència de IL-1 β durant 24h (1 ng/ml)(A,B) i en presència o absència de TGF- β 1 durant 72h (5 ng/ml)(C,D). (A,C) Anàlisi densitomètric de l'expressió de IL-1RI com a ràtio respecte ERK 1/2 i (B,D) imatge representativa d'un *Western blot* de IL-1RI i ERK 1/2. ** P<0.01 comparat amb les respectives cèl·lules no tractades

A continuació, vam analitzar l'expressió del receptor IL-1RI estimulada per IL-1 β en la línia cel·lular epitelial alveolar A549 després de la inducció de EMT per TGF- β 1. Per *western blot*, vam observar que en cèl·lules tractades amb TGF- β 1 durant 72h seguides de 24h amb IL-1 β es va reduir l'expressió de IL-1RI fins a assolir nivells pràcticament nuls (Figura 75). L'absència d'expressió de IL-1RI en cèl·lules epitelials alveolars tractades amb IL-1 β després de inducció de EMT va correlacionar de manera positiva amb la disminució de l'expressió de COX-2 induïda per IL-1 β en aquestes condicions.

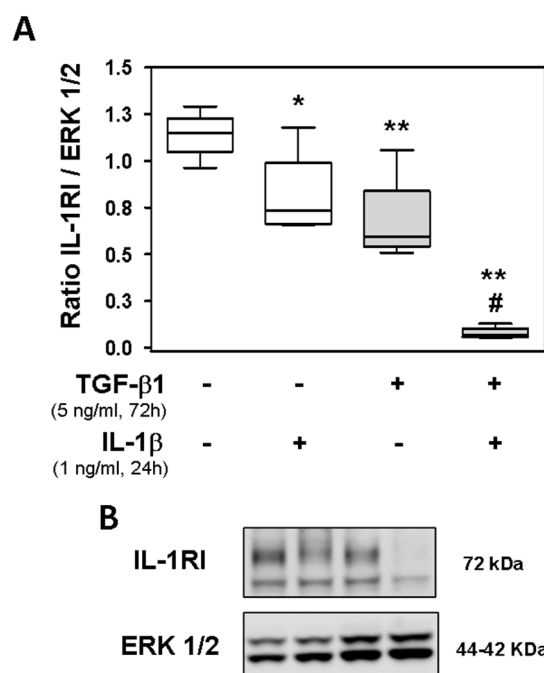


Figura 75.- Efecte de la IL-1 β sobre l'expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) en cèl·lules epitelials alveolars A549 després de ser induïda la transició epiteli-mesenquimal (EMT) per TGF- β 1. Les cèl·lules A549 es van incubar en presència o absència de TGF- β 1 durant 72h amb 5 ng/ml seguit d'una incubació amb o sense IL-1 β durant 24h (1 ng/ml). (A) Anàlisi densitomètric de l'expressió de IL-1RI com a ràtio respecte ERK 1/2 i (B) imatge representativa d'un *Western blot* de IL-1RI i ERK 1/2. * P<0.05 comparat amb les respectives cèl·lules no tractades; # P<0.01 comparat amb les cèl·lules tractades amb IL-1 β .

V - DISCUSSIÓ

1. Estudi de la població de miofibroblastes en cultius de fibroblastes primaris control i de fibrosi pulmonar idiopàtica

La fibrosi pulmonar idiopàtica es caracteritza per una acumulació progressiva de miofibroblastes i matriu extracel·lular que formen part d'un procés de cicatrització permanent. El fenotip miofibroblast és clau en el manteniment d'aquest estat reparatiu i en l'evolució de la patologia. Tot i així, la dinàmica i el patró d'activació dels fibroblastes durant la fibrogènesi no es coneixen en profunditat (Tsukui *et al.*, 2013). Es desconeix el procés pel qual els fibroblastes i/o els miofibroblastes generen les lesions fibròtiques i contribueixen a la fibrosi de l'òrgan *in vivo*. Per tal de desenvolupar noves estratègies terapèutiques per la fibrosi pulmonar idiopàtica es requereix un millor coneixement de l'activació dels fibroblastes en el context de la patologia.

Per avaluar el comportament dels miofibroblastes normals i patològics *in vitro*, vam analitzar els miofibroblastes presents en cultius de fibroblastes procedents de teixit pulmonar sa i amb fibrosi pulmonar idiopàtica. Els estudis presentats en aquesta tesi s'han dut a terme utilitzant fibroblastes primaris obtinguts a partir de teixit pulmonar d'individus amb pneumotòrax amb característiques histològiques normals i de teixit d'individus amb fibrosi pulmonar idiopàtica. El cultiu de fibroblastes de pulmó és una bona eina per l'estudi de la patologia fibròtica ja que són les principals cèl·lules efectores presents a la lesió activa dels focus fibroblàstics. Cal indicar que l'ús de fibroblastes procedents de pacients amb pneumotòrax espontani com a controls "normals" té les seves limitacions. Tot i que el teixit obtingut va ser histològicament normal, estudis previs han descrit que els fibroblastes obtinguts de reseccions quirúrgiques durant una pleurodesi per pneumotòrax espontani poden procedir d'àrees amb anormalitats patològiques, incloent reaccions inflamatòries i fibròtiques (Fang *et al.*, 2010). Tot i així, aquest teixit és la millor opció per obtenir pulmó sa amb característiques normals i afectació patològica mínima, ja que no és possible obtenir mostra d'un pulmó completament normal. Tots els experiments han estat realitzats entre els passatges 4 i 6, ja que a passatges més elevats es pot alterar el patró de resposta cel·lular a estímuls *in vitro*. Així doncs, l'ús de passatges equivalents entre línies cel·lulars procedents de diferents individus contribueix a disminuir la variabilitat en els resultats.

Per dur a terme estudis sobre fibrosi pulmonar existeixen diversos models, entre ells destaquen el cultiu de cèl·lules primàries procedents de teixit fibròtic i els models animals de fibrosi pulmonar, el més utilitzat dels quals es basa en la instil·lació de bleomicina en ratolins. Aquest tractament condueix a una fibrosi però que no reflecteix completament les característiques pròpies de la patologia en humans (Scotton *et al.* 2010). En aquest model es produeix una resposta inflamatòria inicial que després de dues setmanes aproximadament evoluciona cap a una fase fibròtica amb característiques similars a la FPI (Chaudhary *et al.*, 2006). El grau de fibrosi en resposta a la bleomicina és directament depenent de la quantitat de resposta inflamatòria inicial. Aquest factor el diferencia de la patologia en humans, de la qual es desconeix si la inflamació té un paper principal. Un altre aspecte controvertit és la resolució de la fibrosi en el model de bleomicina. Alguns autors han descrit que la fibrosi induïda per bleomicina és reversible (Degryse *et al.*, 2010) i altres que es manté al llarg del temps (Hodges *et al.*, 2004), però hi ha consens en que no és una patologia progressiva, fet que la diferencia de la FPI en humans. En conjunt, els cultius de fibroblastes procedents de teixit fibròtic ens permeten avaluar

les característiques pròpies de la patologia en humans, tot i que cal tenir en compte que és un cultiu en un entorn artificial i de cèl·lules aïlles, fet que pot modificar el comportament cel·lular.

Utilitzant aquest model *in vitro*, vam confirmar les troballes d'estudis previs que indicaven que els cultius de fibroblastes procedents de pulmons de pacients amb FPI estan caracteritzats per una expressió d' α -SMA incrementada (Kuhn *et al.*, 1991; Ramos *et al.*, 2001). Aquest fet aïllat no necessàriament estaria relacionat amb un increment de miofibroblastes en aquests cultius, ja que podria ser degut a una expressió incrementada basal d' α -SMA en totes les cèl·lules. Conseqüentment, cal comprovar amb immunofluorescència la polimerització d' α -SMA en les cèl·lules *in situ*. Per mitjà d'aquesta tècnica vam observar un increment significatiu del nombre de miofibroblasts als pacients amb FPI comparat als controls, que es va mantenir al llarg dels passatges del cultiu. Es desconeix el motiu pel qual el nombre de miofibroblastes presents a un cultiu primari de fibroblastes de pulmó procedents de FPI és superior a un cultiu control. La major presència inicial de miofibroblastes al teixit fibròtic podria ser una explicació, ja que aquestes diferències es mantenen al llarg dels passatges al cultiu.

Podem deduir un altre problema inherent al model que estudiem és la herterogeneïtat present als cultius cel·lulars: no totes les cèl·lules que hi han presents als cultius són iguals. Aquesta heterogeneïtat no es limita a l'expressió d' α -SMA sinó també a altres marcadors, entre ells el col·lagen, la COX-2 o les MMPs (Phan, 2008), a més de presentar variabilitat en la seva taxa de creixement i apoptosi (Ramos *et al.*, 2001).

Per tal d'estudiar específicament el fenotip miofibroblast, vam incrementar el nombre de miofibroblastes presents al cultiu induint la transició fibroblast-miofibroblast (FMT) amb TGF- β 1. Tot i que s'han descrit diversos factors amb capacitat d'inducció de la FMT, com per exemple la endotelina-1, vam escollir el TGF- β 1 degut a la seva potent capacitat d'inducció de la transició a miofibroblastes i a que és un factor amb un paper àmpliament identificat a la patologia (Willis *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2012;).

Com s'ha descrit anteriorment, la inducció de FMT per TGF- β 1 va ser temps i dosi-depenent (Kolodsick *et al.*, 2003) i va anar acompanyada d'un increment significatiu en l'expressió de col·lagen 1 α 1 i de col·lagen 3 α 1. Per RT-PCR es va observar que aquest increment va ser superior en cultius FPI en comparació amb els cultius control. Pel mètode de Sircol, en canvi, no es van observar diferències en la quantitat de col·lagen secretat pels dos grups, probablement degut a una menor sensibilitat de la tècnica. El percentatge de miofibroblastes es va incrementar de manera significativa en els cultius tractats amb TGF- β 1, igualant-se entre cultius de fibroblastes control i FPI i perdent per tant les diferències que hi havia inicialment en quant a la proporció de miofibroblastes presents al cultiu. Així doncs, tot i presentar nombres molt similars de miofibroblastes, les diferències funcionals entre cultius control i FPI no es van perdre per complet, ja que els miofibroblastes FPI van presentar característiques més fibròtiques, com una capacitat de síntesi incrementada de col·lagen 1 α 1. La causa de les diferències entre poblacions de miofibroblastes segons el seu origen és desconeguda.

2. Estudi de la migració i proliferació dels miofibroblastes procedents de cultius control i de fibrosi pulmonar idiopàtica

Tot i que es considera el miofibroblast com a fenotip efector de la fibrosi pulmonar idiopàtica, es desconeixen els mecanismes concrets de la seva aparició a la lesió fibròtica. Per tal d'analitzar el seu comportament en el procés de tancament d'una ferida *in vitro*, vam comparar cultius de fibroblastes primaris obtinguts de pulmons de pacients amb FPI o controls amb cultius amb un elevat percentatge de miofibroblastes. Es va induir la transició fibroblast-miofibroblast incubant les cèl·lules confluents amb TGF- β 1 durant 72h en medi amb un 1% de sèrum boví fetal (FBS). Està descrit que la diferenciació de fibroblastes a miofibroblastes és menor quan són cultivats en densitats elevades (Masur *et al.*, 1996). En els nostres cultius també vam observar un percentatge de miofibroblastes lleugerament inferior en els cultius al 100% de confluència tractats amb TGF- β 1 en comparació amb els cultius a un 70-80% de confluència, probablement degut a la inhibició per contacte i a la presència de sèrum al medi de cultiu. Tal com havíem observat en subconfluència, en absència de TGF- β 1, el percentatge de cèl·lules α -SMA va ser superior en cultius FPI respecte els cultius control. Aquesta diferència es va perdre després del tractament amb TGF- β 1.

Un cop obtingut el cultiu amb alt percentatge de miofibroblastes, vam realitzar un tall o ferida a la monocapa cel·lular i es va substituir el medi amb TGF- β 1 per medi nou a l'1% de FBS. Les següents 24h van resultar temps suficient per observar un tancament considerable de la ferida per part de les cèl·lules al cultiu. En aquest moment es van fixar els cultius i es va realitzar la immunofluorescència per marcar els miofibroblastes tant a la zona de tall com els que estaven presents lluny de la zona de tall. En la literatura s'ha descrit una migració superior de fibroblastes FPI en presència de diversos estímuls (Suganuma *et al.*, 1995). Generalment, aquests estudis utilitzen mètodes d'anàlisi de migració basats en la quimiotaxi, com la càmera de Boyden, on s'utilitza un medi amb alguna substància amb propietats quimiotàctiques per induir la migració cel·lular. En aquest mètode, les cèl·lules es preparen en suspensió abans de l'assaig, de tal forma que s'eliminen factors com la interacció cèl·lula-cèl·lula, que poden influir sobre la resposta migratòria. En canvi, amb el mètode de tall de la monocapa cel·lular *in vitro*, s'imita la reacció de cèl·lules com els fibroblastes en cas d'una ferida de manera més similar a com ho farien *in vivo*. Els estímuls quimiotàctics, si existeixen, seran sintetitzats únicament per les pròpies cèl·lules del cultiu. A més a més, hi ha un component important de proliferació al nostre model que contribueix al tancament de la ferida. Per tant, els resultats obtinguts en el present estudi es diferencien dels anteriors en l'aproximació realitzada a l'avaluació de la migració *in vitro*, fet que pot explicar les diferències observades amb publicacions prèvies.

Tot i que a la zona confluent el percentatge de miofibroblastes va ser similar en cultius control i FPI, vam observar diferències en el comportament dels miofibroblastes control i FPI presents a la zona del tall. Encara que en aquestes circumstàncies no hem mesurat la producció de col·lagen, es raonable inferir que els miofibroblastes procedents de pacients amb FPI serien funcionalment més actius com es va demostrar en subconfluència. Conseqüentment, el comportament dels mateixos no serà necessàriament el mateix respecte a la seva proliferació i migració. Proporcionalment, el nombre de miofibroblastes control al tall va incrementar-se amb el pre-tractament amb TGF- β 1, però va continuar sent molt inferior en comparació amb el

percentatge present a la zona confluent. Aquest fet podria ser una conseqüència indirecta d'un nombre superior de miofibroblastes, tant en la zona confluent com en la zona del tall. En canvi, la presència de miofibroblastes a la zona del tall de cultius FPI va ser significativament superior a la dels cultius control, tant de forma basal com en aquells cultius pre-tractats amb TGF- β 1. A més a més, el percentatge de miofibroblastes FPI pre-tractats amb TGF- β 1 va ser el mateix en la zona confluent i en la zona del tall. Aquesta observació indica una capacitat invasiva superior dels miofibroblastes procedents de FPI.

Així doncs, sembla que en condicions normals, la majoria de miofibroblastes presents al cultiu no migren cap a la zona de la ferida *in vitro*. En canvi, els miofibroblastes FPI sí són presents a la zona del tall en un percentatge igual que el que es troba a la zona confluent. Aquest resultat indica que tot i que no s'observen diferències en el nombre de miofibroblastes control i FPI presents al cultiu després del tractament amb TGF- β 1, sí que existeixen alteracions a nivell de la migració i/o proliferació dels miofibroblastes FPI.

A continuació vam analitzar la proliferació de les cèl·lules presents a la zona del tall *in vitro* per avaluar si les diferències observades eren degudes a canvis en la migració o en la proliferació cel·lular. A les 24h del moment de realització del tall, la majoria de les cèl·lules presents a la zona de la ferida no estaven en fase proliferativa. El percentatge de cèl·lules en proliferació va ser inferior en cultius FPI respecte als cultius control. Aquesta diferència es va perdre en cultius control i FPI amb un alt percentatge de miofibroblastes, tot i que en conjunt, els percentatges de cèl·lules en proliferació es van mantenir amb i sense TGF- β 1. Aquest resultat indica que la proliferació de les cèl·lules presents al tall a les 24h és independent del percentatge de miofibroblastes presents al cultiu.

Un cop determinat el percentatge de cèl·lules que estaven proliferant a la zona del tall, vam voler analitzar quina proporció d'aquestes eren miofibroblastes. Per fer-ho, vam quantificar les cèl·lules Click-iT® positives i dins d'aquestes, les que també presentaven marcatge per α -SMA. Del total de cèl·lules que estaven proliferant 24h després de realitzar la ferida, un percentatge molt baix van ser miofibroblastes, tant en cultius control com FPI, indicant que el fenotip miofibroblast està associat a una menor proliferació que el fibroblast. Aquest percentatge es va incrementar en cultius pre-tractats amb TGF- β 1, probablement degut a que hi havia un nombre molt més elevat de miofibroblastes, i no perquè els miofibroblastes presents proliferessin més. Així doncs, no vam observar diferències significatives en la capacitat proliferativa entre miofibroblastes FPI respecte els control, fet que indica que els miofibroblastes FPI podrien tenir una capacitat migratòria incrementada respecte als miofibroblastes control quan són estimulats amb TGF- β 1. Recordem que l'estímul amb TGF- β 1 produïa en subconfluència els mateixos miofibroblastes però una expressió major de col·lagen. Continuem amb la idea que els miofibroblastes de cultius FPI responen funcionalment més al TGF- β 1 que els miofibroblastes control.

Per tal de distingir el paper global de la migració i de la proliferació en el tancament de la ferida, vam incubar les cèl·lules amb Mitomicina C, un antibiòtic que actua com a inhibidor de la proliferació, unint-se al DNA i impedit la seva replicació. Per tant, en els cultius tractats amb Mitomicina C, el tancament de la ferida va ser degut exclusivament a la migració cel·lular. En primer lloc vam comprovar mitjançant una dosi resposta que a 5 μ g/ml la Mitomicina C inhibia per complet la proliferació. A més a més, vam descartar que produís citotoxicitat en els nostres cultius

mitjançant la tècnica de LDH. Quan vam realitzar els comptatges de les cèl·lules positives per α -SMA a la zona del tall, vam observar que no hi havia diferències en el percentatge de miofibroblastes en presència o absència de Mitomicina C. Per tant, la inhibició de la proliferació no va modificar el nombre de cèl·lules α -SMA positives a la zona del tall. La capacitat proliferativa dels miofibroblastes no va afectar a la seva presència al tall, que per tant sembla independent d'aquesta variable i confirma els resultats observats amb anterioritat. Com ja s'ha esmentat, no hi va haver diferències marcades en la proliferació de les cèl·lules presents a la zona del tall (analitzada per immunofluorescència). Si inhibint la proliferació veiem diferències en el tancament de la ferida, podria ser degut a la proliferació de les cèl·lules presents a la zona confluent i no tant a la proliferació a la zona de tall.

És per aquest motiu que vam avaluar el tancament de l'àrea de la ferida *in vitro* després de 24 i 48h en cultius control i FPI pre-tractats o no amb TGF- β 1. A 24h d'inhibició de la proliferació ja veiem diferències en l'àrea tancada respecte als cultius sense mitomicina C, tot i que aquestes diferències s'incrementen a 48h en cultius FPI. La proliferació té un paper més destacat en el tancament de la ferida que en la presència de miofibroblastes. Analitzant l'àrea tancada pels fibroblastes FPI, vam observar que va ser significativament inferior a la tancada pels fibroblastes control 24h després de realitzar el tall al cultiu, però aquesta diferència es va perdre a les 48h. Així, sembla que la capacitat inicial de tancament de cultius FPI és inferior a la de cultius control, però s'acaben igualant al llarg del temps. Alhora, el pre-tractament amb TGF- β 1 va disminuir l'àrea tancada tant en cultius control com FPI en comparació amb les no pre-tractades. Degut a que el percentatge de miofibroblastes és superior de manera basal als cultius FPI, aquests podrien causar la diferència en la velocitat de tancament de la ferida, ja que els cultius rics en miofibroblastes van presentar una capacitat de tancament d'un tall *in vitro* reduïda. En aquesta línia, observem que els cultius FPI tractats amb TGF- β 1 corresponen a la condició amb un nombre més miofibroblastes que alhora estan més actius, però en canvi, és la condició que menys tancament d'una la ferida *in vitro* presenta, assignant un paper secundari dels miofibroblastes en aquest procés.

Així doncs, tant la proliferació com un major nombre de miofibroblastes poden modificar la capacitat de tancament de la ferida en aquestes condicions. La proliferació va resultar un component important en el tancament de la ferida *in vitro*, ja que la incubació amb Mitomicina C va disminuir l'àrea tancada en totes les condicions.

S'ha descrit que els fibroblastes activats es transformen en miofibroblastes α -SMA positius a mesura que migren a través de la matriu de fibrina provisional present a la ferida (Wynn 2008). El fibroblast que migra necessita un contacte més relaxat amb la matriu extracel·lular. Quan assoleix el destí en el teixit en nova formació, apareixerien les fibres d'estrès i el fenotip miofibroblast (Oberringer *et al.*, 2008). Segons els nostres resultats, els fibroblastes patirien un procés de proliferació i migració activa cap als focus de dany, on es transformarien en miofibroblastes, assolint el fenotip efector de la síntesi de matriu extracel·lular i de la contractilitat del teixit fibròtic.

Existeixen publicacions controvertides sobre la capacitat de migració i proliferació tant de fibroblastes com de miofibroblastes durant un procés de tancament d'una ferida. Alguns autors (Suganuma *et al.*, 1995, White *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2010) han descrit que els fibroblastes procedents d'individus amb malalties fibròtiques tenen una capacitat incrementada de migració

mediada per quimiotaxi. Utilitzant altres mètodes, Thampatty *et al.*, (2007) han descrit que els miofibroblastes tenen menys mobilitat que els fibroblastes. Els fibroblastes presents en altres patologies, com els fibroblastes de làmina pròpia de pacients amb malaltia de Crohn, han mostrat una capacitat migratòria significativament inferior a la dels fibroblastes control (Meier *et al.* 2011). Al nostre model de tancament d'una ferida *in vitro*, observem que els fibroblastes fibròtics no presenten un tancament normal del tall. El motiu d'aquest comportament podria ser la major presència de miofibroblastes actius, que no semblen tenir una capacitat de tancament d'una ferida correcta, en comparació amb els fibroblastes.

Una estratègia terapèutica possible per prevenir la progressió de la fibrosi estaria relacionada amb la inhibició del reclutament de fibroblastes cap a les zones de focus actius o bé en un estat més avançat, atacar els miofibroblastes ja formats a la zona de fibrosi, sempre que es puguin localitzar específicament. El marcador universal dels miofibroblastes, les fibres d' α -SMA, no resulta adequat per la identificació d'aquest tipus cel·lular *in vivo*, ja que és intracel·lular. Per tal d'identificar i eliminar específicament els miofibroblastes fibròtics, seria de gran utilitat trobar marcadors de membrana específics d'aquest fenotip cel·lular.

3. Expressió deficient de COX-2 i PGE₂ en fibroblastes i miofibroblastes de fibrosi pulmonar Idiopàtica i de cèl·lules epitelials alveolars A549 en resposta a interleuquina-1 β

La fibrosi pulmonar idiopàtica es caracteritza per un increment en l'expressió de TGF- β 1, un elevat nombre de miofibroblastes i una producció reduïda de PGE₂, que resulta d'una inducció limitada de COX-2. Vam postular que existeix una relació entre aquests tres factors i per tant, que els miofibroblastes es caracteritzaven per tenir una expressió alterada de la COX-2 i una secreció reduïda de la PGE₂.

En primer lloc, vam confirmar les troballes d'estudis previs que indicaven que els cultius de fibroblastes de FPI estan caracteritzats per una expressió de COX-2 reduïda (Wilborn *et al.* 1995) i en canvi, una expressió d' α -SMA incrementada (Kuhn *et al.*, 1991; Ramos *et al.*, 2001). Degut a que l'expressió de COX-2 és indetectable de manera basal, es va estimular els cultius amb IL-1 β . Els resultats obtinguts, tant per *western blot* com per RT-PCR van estar en la mateixa línia que aquells publicats per altres grups, suggerint que les nostres línies de fibroblastes es comportaven d'una manera similar a les ja descrites.

A continuació, vam analitzar la relació entre l'expressió de COX-2 i el fenotip miofibroblast. Per immunofluorescència, vam observar que els miofibroblastes (cèl·lules amb marcatge per α -SMA) no van presentar marcatge per COX-2 després d'estimulació amb IL-1 β , fet indicatiu de que el fenotip miofibroblast es caracteritza per una expressió disminuïda de COX-2. Les cèl·lules positives per COX-2 eren morfològicament més petites i primes que els miofibroblastes. Es va observar que el tractament amb IL-1 β va disminuir el nombre de cèl·lules α -SMA positives, confirmant aquesta citoquina com un potent inhibidor de la transició fibroblast-miofibroblast, com ha estat descrit amb anterioritat (Kolodzik *et al.*, 2003). No vam observar diferències en la morfologia d'aquells fibroblastes positius per COX-2 i aquells que no presentaven expressió de COX-2. Cal destacar que les tècniques de *western blot* i de immunofluorescència permeten avaluar expressió proteica, però obtenint resultats diferents. En el cas del *western blot*, ens permet mesurar l'expressió d'una proteïna de manera global al cultiu i de forma semi-quantitativa. En canvi, la immunofluorescència ens permet visualitzar la proteïna a la cèl·lula concreta que l'expressa i polimeritza i quantificar de manera absoluta el nombre de cèl·lules positives del total del cultiu. Així doncs, ambdues tècniques ens donen informació complementària entre sí.

En conjunt, aquestes troballes suggereixen que la transformació en miofibroblast resulta en una disminució de l'expressió de COX-2 estimulada per IL-1 β . La presència d'un nombre més elevat de miofibroblastes en els cultius de fibroblastes i en pulmons amb FPI podria ser la causa de la menor inducció de COX-2 descrita en teixit FPI. Tot i això, la petita diferència en el percentatge de miofibroblastes presents en cultius de fibroblastes control i FPI, conjuntament amb l'observació de que els fibroblastes positius per COX-2 són aparentment indistingibles dels fibroblastes negatius per COX-2, suggereix que els mecanismes involucrats en l'expressió reduïda de COX-2 podria estar present també en els fibroblastes FPI α -SMA negatius.

Per tal d'aprofundir en la relació entre el fenotip miofibroblast i la regulació de COX-2, vam incrementar el nombre de miofibroblastes presents al cultiu induint la transició fibroblast-

miofibroblast amb TGF- β 1. Estudis previs, havien demostrat que el tractament amb TGF- β 1 incrementa l'expressió de COX-2 i la síntesi de PGE₂ durant períodes curts (2-24h) (McAnulty *et al.*, 1995; Keerthisingam *et al.*, 2001; Matsumura *et al.*, 2009). Un increment de la expressió d'aquest enzim per part del TGF- β 1 aniria en contra de la nostra hipòtesi, ja que aquesta citoquina indueix un increment dels miofibroblastes. La clau podria ser el temps estudiat. De fet, aquestes publicacions estan en concordança amb els nostres resultats a temps curts, degut a que vam observar un increment en l'expressió de COX-2 induïda per TGF- β 1 a 4 i 24h en fibroblastes control. El nombre de miofibroblastes es va mantenir baix en aquestes condicions experimentals. En canvi, a temps més llargs d'incubació amb TGF- β 1 (72h), l'elevat nombre de miofibroblastes va produir una reducció completa de l'expressió de COX-2. A més a més, quan vam incubar les cèl·lules de cultius control pre-tractades 72h amb TGF- β 1, durant 24h addicionals amb IL-1 β , l'expressió de COX-2 va disminuir de manera dramàtica. En canvi, en cèl·lules FPI no vam observar cap inducció de COX-2 després de tractament amb TGF- β 1, ni tan sols a períodes de temps curts.

Vam dur a terme experiments a 4h en presència de TGF- β 1 i IL-1 β i vam observar que, de manera conjunta, ambdós tractaments potencien l'expressió de COX-2, fet que ja estava descrit a la literatura (Diaz *et al.*, 1998). Per tant, no podem excloure, que la FMT es caracteritzi per una fase inicial amb una lleugera regulació a l'alça de COX-2. Una altra possibilitat és que la incubació amb TGF- β 1 produeixi un increment en l'expressió de COX-2 de forma independent de la FMT. Nous experiments serien necessaris per clarificar aquest punt i determinar de forma acurada el moment al qual els miofibroblastes finalment tenen una regulació de l'expressió de COX-2 a la baixa.

Així doncs, el nombre de cèl·lules que expressen COX-2 després de l'estimulació amb IL-1 β en cèl·lules pre-tractades durant 72h amb TGF- β 1 disminueix de forma paral·lela a l'increment de fibroblastes transformats a miofibroblastes. A més a més, la re-incubació amb TGF- β 1 durant 4 i 24h addicionals no va ser capaç d'induir l'expressió de COX-2 en aquells cultius enriquits en miofibroblastes, descartant un artefacte produït per una ràpida expressió i degradació de l'enzim. Tot i això, en aquests estudis a temps llargs, els nivells d'inducció de COX-2 en resposta a IL-1 β no van ser tan homogenis com els trobats a temps curts, i la variabilitat, especialment en cèl·lules control, va ser independent de la tècnica emprada. Cal destacar que aquells pacients amb els nivells més alts de COX-2 després d'estimulació amb IL-1 β en estudis a temps llargs, van ser els que tenien menys cèl·lules α -SMA positives abans del tractament amb IL-1 β i viceversa. L'origen de la variabilitat en termes d'expressió de COX-2 i d' α -SMA es desconeixen però tots dos paràmetres estan clarament relacionats com ja s'ha descrit. Degut a que el TGF- β 1 incrementa notablement el nombre de cèl·lules α -SMA positives de forma homogènia en totes les línies cel·lulars estudiades, l'expressió reduïda de COX-2 després del tractament amb TGF- β 1 és consistent a tots els pacients estudiats.

Amb els estudis a temps llargs, vam confirmar les observacions prèvies que relacionaven una disminució en la inducció de COX-2 amb el fenotip miofibroblast. Alhora, vam avaluar la secreció de PGE₂ en els cultius enriquits en miofibroblastes. La secreció de PGE₂ induïda per IL-1 β en cultius pre-tractats amb TGF- β 1 es va reduir gairebé per complet en cultius control i FPI com a resultat de la inhibició de COX-2 causada per l'exposició a llarg termini a TGF- β 1.

La incubació de les cèl·lules pre-tractades amb TGF- β 1 amb IL-1 β va provocar una *petita però significativa* reducció en el nombre de cèl·lules α -SMA positives, suggerint que la IL-1 β no només inhibeix la FMT sinó que promou la desaparició dels miofibroblastes al cultiu (Taula 7: Control: de 82.3 \pm 5.3% a 70.7 \pm 11.9%; FPI: de 79.9 \pm 8.9% a 72.4 \pm 11.04%). Zhang *et al.* van descriure al 1997 que la IL-1 β va causar un descens dosi-depenent de la proteïna α -SMA en fibroblastes de pulmó de rata, fet que van atribuir a un increment de l'apoptosi dels miofibroblastes induïda per IL-1 β . Més recentment, Garrison *et al.*, (2013) van descriure que el fenotip miofibroblast era revertit per acció de la PGE₂, causant un descens en l'expressió d' α -SMA dosi depenent. Van descartar l'apoptosi com a causa de desaparició dels miofibroblastes del cultiu, tot i que la PGE₂ s'ha descrit com apoptòtica pels fibroblastes (Maher *et al.*, 2010), degut a que en absència de PGE₂ exògena i presència de TGF- β 1 es tornava a induir la FMT revertida prèviament, incrementant-se el nombre de miofibroblastes del cultiu i indicant que les cèl·lules havien sobreviscut al procés. Aquest resultat concorda amb el fet que el tractament amb IL-1 β disminueixi l'expressió d' α -SMA en els nostres teixits, ja que podria ser un efecte mediat per la pròpia PGE₂.

Cal tenir en compte el fet de que en l'estudi de Garrison *et al.*, la inducció de la FMT es va dur a terme incubant fibroblastes fetals de pulmó amb TGF- β 1 (2 ng/ml) durant 24h, temps al qual en els nostres cultius el percentatge de cèl·lules α -SMA positives no va superar un 25%. Per tant, l'efecte del posterior tractament amb PGE₂ vindria donat per una acció sobre una majoria cel·lular de fibroblastes i no de miofibroblastes. En un cultiu amb un nombre elevat de miofibroblastes, la inducció de PGE₂ per IL-1 β està molt disminuïda, fet que podria explicar que la disminució d'expressió d' α -SMA en els nostres cultius sigui menor que la reversibilitat total observada per Garrison *et al.* amb addició de PGE₂ exògena. Una altra opció podria ser que la disminució de l'expressió d' α -SMA produïda per IL-1 β podria no ser totalment deguda a la PGE₂.

Alhora, en aquest estudi, els fibroblastes procedents de cultius de pacients amb FPI van presentar una resistència variable a la reversió dels miofibroblastes per l'acció de la PGE₂ per mecanismes que podrien estar relacionats amb una deficient expressió del receptor EP2, el que s'ha descrit com a principal responsable de les accions antifibròtiques de la PGE₂ (Huang *et al.*, 2008b; Huang *et al.*, 2010).

D'altra banda, l'expressió de COX-1 va incrementar de manera significativa només després del tractament durant 72h amb TGF- β 1 en fibroblastes obtinguts de pacients amb FPI. Degut a que en fibroblasts d'aquests cultius, la reducció de COX-2 és notable, podríem especular que aquestes cèl·lules podrien respondre al tractament de TGF- β 1 incrementant l'expressió de COX-1 per tal de mantenir el metabolisme de COX basal.

Una vegada estudiada l'expressió de COX als miofibroblasts procedents de fibroblastes pulmonars, vam estudiar el fenotip miofibroblast procedent de cèl·lules epitelials. Com a model de cèl·lules epitelials alveolars, vam utilitzar la línia cel·lular A549, àmpliament utilitzada en estudis d'EMT (Kasai *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2010). Tot i això, l'origen tumoral de la línia cel·lular limita l'extrapolació dels resultats a cèl·lules epitelials pulmonars primàries. Les línies cel·lulars epitelials són un substitut freqüentment utilitzat per realitzar estudis *in vitro* degut a les dificultats i complicacions que presenta l'obtenció de cèl·lules epitelials alveolars primàries, tant d'individus control com FPI. En primer lloc, la quantitat de teixit necessària per obtenir un mínim de cèl·lules epitelials pel seu estudi *in vitro* és considerable. Aquest fet és especialment

problemàtic a l'hora d'obtenir teixit pulmonar fibròtic, limitant les opcions al pulmó amb FPI extret després d'un transplant de pulmó. En segon lloc, la manipulació d'aquestes cèl·lules és complexa i cal tenir en compte factors com una capacitat replicativa *in vitro* limitada, la contaminació del cultiu amb la presència de cèl·lules mesenquimals o la tendència a la diferenciació de les cèl·lules epitelials alveolars tipus II cap a tipus I quan es troben en cultiu (Jenkins *et al.*, 2012).

La línia cel·lular epitelial A549 és útil per estudiar l'expressió de COX-2 ja que no expressa COX-1 i té una expressió basal de COX-2 elevada (Mitchell *et al.*, 1994). En cèl·lules A549, el tractament amb TGF- β 1 va disminuir l'expressió basal de COX-2 i va provocar una menor inducció de COX-2 després d'estimulació amb IL-1 β . Els nivells de secreció de PGE₂ van anar en paral·lel amb els d'expressió de COX-2. Per tant, el procés d'EMT amb la formació d'un fenotip tipus miofibroblast també pot contribuir a la disminució de COX-2 i PGE₂ observada en FPI.

En concordança amb els nostres resultats, Takai *et al.*, (2013) van descriure, posteriorment als nostres resultats, una inducció de la EMT per part de TGF- β 1 en cèl·lules epitelials alveolars A549, associada a una disminució de COX-2 i PGE₂ basals. En aquest cas, els autors esperaven trobar un increment de l'expressió de COX-2 associada a EMT com s'ha descrit en alguns processos tumorals, però van observar un efecte oposat per un mecanisme desconegut. En els seus experiments, el tractament de les cèl·lules epitelials amb PGE₂ exògena disminueix la síntesi de col·lagen i de fibronectina induïda per TGF- β 1. En conseqüència, la seva hipòtesi és que la inhibició de la COX-2 mitjançant fàrmacs utilitzats pel tractament del càncer, causa una regulació a la baixa de la secreció de PGE₂ que tindria efectes contraproductius, incrementant les propietats profibròtiques del TGF- β 1 a través de la inducció de la EMT.

El fenotip miofibroblast que vam aconseguir amb A549 no és exactament igual al obtingut amb fibroblastes. De fet, no vam observar expressió d' α -SMA en les cèl·lules epitelials alveolars després de la incubació amb TGF- β 1. Una possible explicació d'aquesta diferència amb els miofibroblastes procedents de fibroblastes és que en cèl·lules primàries de pulmó de rata s'ha descrit un patró diferencial de metilació del DNA que modifica l'expressió del gen d' α -SMA. Així, les cèl·lules epitelials alveolars tipus II negatives per α -SMA presenten una hipermetilació del gen d' α -SMA que inhibeix la seva expressió, al contrari del que s'observa als fibroblastes i miofibroblastes espontanis observats al cultiu i induïts per TGF- β 1 (Hu *et al.*, 2010). Tot i això, el TGF- β 1 sí induïx altres canvis en aquestes cèl·lules, entre ells un increment de la síntesi de col·lagen, un patró d'expressió diferencial de proteïnes del citoesquelet i a més a més, induïx el canvi morfològic cap a una forma allargada, típica del miofibroblast.

També vam examinar la interrelació entre TGF- β 1, IL-1 β , COX-2 i PGE₂ en la proliferació dels nostres cultius un cop les cèl·lules van ser transformades a miofibroblastes. Vam observar que el tractament amb IL-1 β va disminuir la proliferació dels fibroblastes control. Aquest efecte sembla estar mediat per l'activació de COX-2, ja que l'inhibidor selectiu de COX-2 Celecoxib va restaurar completament els nivells de proliferació. En canvi, l'efecte anti-proliferatiu d'IL-1 β es va perdre en miofibroblastes obtinguts tant de cultius control com FPI. L'absència d'efecte d'IL-1 β en els miofibroblastes sembla ser un resultat de la deficient inducció de COX-2. En conseqüència, l'addició exògena del metabòlit de COX-2, PGE₂, va disminuir la proliferació cel·lular no només en fibroblastes sinó que també en miofibroblastes. Els nostres resultats estan en concordança amb altres publicacions que descriuen els efectes anti-proliferatius de la PGE₂ en diversos tipus cel·lulars (Elias *et al.*, 1985).

En diversos estudis s'ha descrit un paper aparentment contradictori de la IL-1 β sobre la proliferació i quimiotaxi dels fibroblastes. Postlethwaite *et al.* van descriure al 1984 que una IL-1 parcialment purificada procedent de monoblasts d'un individu amb leucèmia monocítica aguda tenia capacitat d'estimular la proliferació de fibroblastes humans *in vitro*. Posteriorment, Raines *et al.*, (1989) van associar aquesta estimulació a un efecte indirecte de la IL-1 a través de la inducció de PDGF en el cultiu, que seria el responsable de l'increment de proliferació cel·lular. Sasaki *et al.* 2000 va observar que la IL-1 β per sí mateixa no tenia efecte sobre la proliferació de fibroblastes de pulmó en cultiu. Al contrari, va reduir la proliferació de fibroblastes prèviament estimulats amb PDGF. Aquest article va en línia amb els nostres resultats, que indiquen que el tractament amb IL-1 β té un efecte anti-proliferatiu i disminueix la migració dels fibroblastes primaris de pulmó humà en cultiu, probablement a través de la inducció de PGE₂.

La incubació de la línia cel·lular A549 amb TGF- β 1 podria inhibir la proliferació de les cèl·lules epitelials (Anscher, 2010). Vam estudiar la proliferació de les cèl·lules epitelials A549 després de realitzar EMT i transformar-se a un fenotip miofibroblàstic pel tractament amb TGF- β 1. En aquestes condicions, vam observar un increment en la proliferació de les cèl·lules pre-tractades amb TGF- β 1 en comparació amb les no pre-tractades. El tractament de les cèl·lules A549 amb IL-1 β va provocar un marcat descens en la proliferació en comparació amb les cèl·lules no tractades. Aquest efecte no sembla mediat per COX-2 i PGE₂, ja que l'inhibidor de COX-2 Celecoxib no va restaurar la proliferació i el tractament amb PGE₂ no va tenir efecte inhibitori sobre la proliferació cel·lular. Els nostres resultats suggereixen que la PGE₂ podria modular la proliferació específicament a la FMT però no a la EMT. Alhora, senyalen a la PGE₂ com un tractament terapèutic possible per la FPI, degut al seu efecte sobre els miofibroblastes. Un article recent ha demostrat que la deficiència de PGE₂ en FPI resulta en un increment de l'apoptosi de cèl·lules epitelials alveolars i a més a més, en una sensibilitat reduïda dels fibroblastes a l'apoptosi (Maher *et al.*, 2010). En conseqüència, la PGE₂ podria regular l'apoptosi de manera diferencial en fibroblastes i en cèl·lules epitelials.

La menor expressió de COX-2 dels miofibroblastes també va tenir un efecte sobre l'àrea tancada d'una ferida *in vitro*. Tant la IL-1 β com la PGE₂ van presentar un efecte inhibitori sobre el tancament d'una ferida *in vitro* de fibroblastes control i FPI. En canvi, en miofibroblastes, l'efecte inhibitori de la IL-1 β sobre el tancament de la ferida es va perdre i es va igualar l'àrea tancada a la dels cultius no tractats. Aquest fet sembla ser degut a la deficiència d'inducció de COX-2 per part del fenotip miofibroblàstic, ja que el tractament amb PGE₂ exògena sí va mantenir la seva inhibició sobre el tancament de la ferida després de 48h. Probablement, el menor tancament de la ferida realitzada al cultiu *in vitro* sigui degut a les propietats d'inhibició de la migració i de la proliferació de fibroblastes que s'han descrit associades a la PGE₂. Per tant, la menor expressió de COX-2 en miofibroblastes també incrementa la seva capacitat de migració i proliferació.

També vam estudiar seccions histològiques de teixit pulmonar humà control i amb FPI. En línia amb publicacions anteriors (Singh *et al.*, 2008), vam observar una lleugera expressió basal de COX-2 en cèl·lules epitelials i positivitat per α -SMA en les cèl·lules musculars llises de les vies aèries dels controls. En canvi, no vam observar expressió de COX-2 en els focus de fibroblastes i miofibroblastes dels pacients amb FPI. A més a més, en concordança amb Lappi-Blanco (2006), vam observar un increment en el marcatge de COX-2 en zones epitelials metaplàsiques del teixit FPI. Així doncs, sembla que les cèl·lules que mantenen un fenotip

epitelial tenen una expressió de COX-2 elevada, mentre que els focus de fibroblastes i miofibroblastes no expressen l'enzim. Clarament, el nostre model utilitzant cèl·lules A549 no reflecteix les cèl·lules epitelials metaplàsiques, ja que presenten una menor expressió de COX-2 després de tractar-les amb TGF- β 1. Aquest model seria més proper a les cèl·lules en procés d'EMT, tant als focus fibroblàstics com a altres zones de l'espai intersticial.

En conjunt, en un pulmó fibròtic amb un entorn predominantment pro-fibròtic, s'estaria induint de forma permanent la transformació de fibroblastes en miofibroblastes. Alhora, la disminució de PGE₂ descrita en aquests pacients, conjuntament amb la incapacitat de incrementar la síntesis de PGE₂ endògena per part dels fibroblastes i miofibroblastes fibròtics contribuiria a la cronificació del procés reparatiu. L'addició de PGE₂ exògena podria ser una estratègia terapèutica eficaç degut a les seves múltiples propietats antifibròtiques ja esmentades.

4. L'Expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 en fibroblastes de fibrosi pulmonar idiopàtica i miofibroblastes està disminuïda

A continuació vam estudiar l'expressió del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RI) com a possible mecanisme de la disminució de l'expressió de COX-2 observada en fibroblastes i miofibroblastes FPI. La IL-1 β és una citoquina pro-inflamatòria que regula una gran varietat de processos immunològics i inflamatoris. Per tant, el grau de resposta cel·lular a aquesta citoquina ha d'estar fermament regulat. Com la IL-1 β només pot senyalitzar a través de l'activació de IL-1RI, un mecanisme important de regulació dels efectes intracel·lulars induïts per IL-1 β és el control dels nivells de receptor en la superfície cel·lular.

Els cultius de fibroblastes FPI van presentar una expressió basal inferior de IL-1RI, fet que podria explicar la deficient inducció de COX-2 en resposta a IL-1 β . Tot i que el tractament amb IL-1 β va induir un increment en la síntesi de IL-1RI, aquest efecte va ser menor en cultius FPI. Això pot ser degut a que la deficiència de IL-1RI basal disminueix el *feedback* positiu d'expressió del seu receptor per part de la IL-1 β . Així doncs, la IL-1 β , té un efecte menor en l'increment de l'expressió de COX-2 a FPI probablement a causa de la reducció en el seu receptor IL-1RI, fet que es traduiria en una menor secreció de PGE₂. Tot i que s'han descrit nivells més elevats d'IL-1 β en FPI respecte al control (Zhang *et al.*, 1993) el seu efecte està disminuït com a conseqüència de la deficiència en IL-1RI.

A l'any 1992, Takii *et al.*, van descriure en una línia de fibroblastes que l'expressió de mRNA del receptor IL-1RI era induïda per IL-1 β a les 2h de tractament. Aquesta inducció semblava produïda per PGE₂, ja que l'estimulació amb PGE₂ exògena va tenir el mateix efecte. En canvi, el bloqueig de COX-2 per indometacina va inhibir la inducció del receptor IL-1RI. Els seus resultats van indicar que la inducció per part de IL-1 del receptor no era una efecte directe, sinó a través de l'estimulació de la síntesi de PGE₂ endògena, probablement a través del receptor EP2 (Akanoshi *et al.*, 1988).

Quan vam analitzar l'expressió de IL-1RI en el fenotip miofibroblast, vam observar absència d'expressió basal. En conseqüència, l'efecte de la IL-1 β és molt limitat en aquest fenotip si no pot unir-se al seu receptor efector. Això es tradueix en una inhibició pràcticament completa de la inducció de receptor per part de la citoquina, com hem observat tant per *western blot* com per immunofluorescència. Els nivells de IL-1RI correlacionen de forma paral·lela amb els nivells de COX-2. Per aquest motiu, una deficiència en l'expressió de IL-1RI podria ser una explicació de la baixa inducció de COX-2 i PGE₂ en miofibroblastes. Alhora, la deficiència en l'expressió de IL-1RI que presenta el fenotip miofibroblast podria estar mediada, almenys en part, per la seva incapacitat de incrementar la secreció de PGE₂ en resposta a IL-1 β . Experiments utilitzant altres estímuls amb capacitat d'inducció de l'expressió de COX-2 serien necessaris per aclarir si la baixa producció de PGE₂ en FPI està mediada a més de per la deficiència en el receptor IL-1RI, per una deficiència intrínseca en l'expressió de COX-2, com alguns autors han postulat (Coward *et al.*, 2009).

Experiments utilitzant altres estímuls amb capacitat per induir l'expressió de COX-2 serien necessaris per avaluar el paper de la deficiència en el receptor IL-1RI en la disminució en

l'expressió de COX-2 en el fenotip miofibroblast o si existeix una deficiència del propi enzim, mecanisme que ha estat suggerit en fibroblastes FPI. Altres autors han descrit que l'expressió de COX-2 està disminuïda a cultius de fibroblastes procedents de FPI utilitzant estímuls diferents a la IL-1 β , com LPS (Wilborn *et al.*, 1995), TGF- β 1 (Keerthisingam *et al.*, 2001) o TNF- α (Vancheri *et al.*, 2000), sense distingir entre tipus cel·lulars en el cultiu heterogeni de fibroblastes. En el darrer cas, la disminució de COX-2 es va associar a una deficiència de l'expressió dels receptors de TNF- α en fibroblastes FPI. En els nostres estudis hem provat que el TGF- β 1 no és capaç d'induir COX-2 a temps curts en miofibroblastes, però sí en fibroblastes control, indicant un mecanisme de regulació de COX-2 deficient independent de la via de la IL-1 β . A més a més, hem observat en talls histològics de teixit fibròtic una expressió de COX-2 nul·la als focus de fibroblastes i miofibroblastes, en absència d'estímuls exògens. Així doncs, els nostres resultats indiquen en concordància amb altres publicacions, que altres mecanismes a més del receptor de IL-1 β estan alterats en fibroblastes i miofibroblastes FPI, causant la disminució de l'expressió de COX-2 en la patologia. El grup de Coward va suggerir que el motiu de la disminució en la transcripció gènica de COX-2 en fibroblastes FPI podria ser una deficiència d'acetilació d'histones del promotor de COX-2. En aquests estudis no es va avaluar possibles diferències en el paper dels miofibroblastes respecte als fibroblastes als cultius i per tant es desconex si la inhibició de COX-2 amb modificacions epigenètiques és un procés exclusiu dels fibroblastes o dels miofibroblastes o dels dos fenotips.

També vam analitzar l'expressió del receptor IL-1RI a nivell global en teixit de pulmó amb FPI. Els resultats van seguir en la línia dels observats per COX-2, amb absència o molt baixa expressió de IL-1RI en focus fibroblàstics α -SMA i vimentina positius i presència de marcatge en cèl·lules epitelials metaplàsiques. Degut a la variabilitat d'expressió entre tipus cel·lulars, el balanç d'expressió global de IL-1RI en teixit fibròtic per *western blot* no va mostrar alteracions en relació al teixit normal.

A més de diferències en l'expressió de IL-1RI vam estudiar si existien alteracions en altres membres de la família de receptors TIR en cultius de fibroblastes FPI en comparació amb fibroblastes control. No vam observar diferències entre fibroblastes control i FPI en l'expressió basal del receptor tipus 2 d'interleuquina-1 (IL-1RII) que actua com a esfer inhibint la senyalització i segregant la IL-1 β , evitant que s'uneixi a IL-1RI i formi un complex de senyalització actiu. El tractament amb IL-1 β durant 24h va induir de manera significativa l'expressió de mRNA de IL-1RII en fibroblastes control i FPI. Aquesta inducció podria correspondre a un mecanisme de regulació negativa de IL-1 β per tal de controlar el seu efecte. En canvi, el tractament amb TGF- β 1 va disminuir l'expressió de IL-1RII de forma significativa en cultius FPI i es va observar una tendència en cultius control. Aquest descens probablement aniria en concordància amb l'expressió pràcticament nul·la de IL-1RI que presenta el fenotip miofibroblast. Per tant, probablement no hi hauria regulació negativa de la via sinó que ja estaria disminuïda per sí mateixa.

El cas contrari es va observar amb la regulació de l'expressió de la proteïna accessòria del receptor 1 d'interleuquina-1 (IL-1RAcP), necessària per la transducció de senyal de la via de la IL-1 β . L'expressió de IL-1RAcP basal en fibroblastes FPI va ser inferior a la dels cultius control, fet que va en concordància amb els resultats obtinguts d'expressió basal de IL-1RI. El tractament amb IL-1 β va incrementar l'expressió de IL-1RAcP en cultius control i FPI, en el que podria ser un mecanisme de *feedback* positiu, conjuntament amb l'increment de l'expressió de IL-1RI

induïda per IL-1 β a 24h. En miofibroblastes control i FPI, el tractament amb TGF- β 1 també va induir un increment en la síntesi de IL-1RAcP. Una possible hipòtesi d'aquest increment és que degut als nivells mínims de IL-1RI, l'augment de IL-1RAcP podria ser un mecanisme per evitar que aquesta sigui la proteïna limitant de la via d'IL-1 β i que la citoquina tingui la possibilitat d'unir-se a tot el receptor que hi hagi disponible, i que com s'ha comentat, està molt regulat a la baixa. Les diferències en regulació de IL-1RII i IL-1RAcP probablement no són degudes a deficiències pròpies del fenotip miofibroblast o la FPI, podrien ser un mecanisme de manteniment de l'homeostasi de la via d'IL-1 β .

En cèl·lules epitelials alveolars A549, la regulació de IL-1RI va variar respecte als fibroblastes ja que el tractament amb IL-1 β durant 24h va disminuir l'expressió de IL-1RI. S'ha descrit que les cèl·lules A549 són molt sensibles a IL-1 β i expressen de manera constitutiva IL-1RI (Coulter *et al.*, 1999). La disminució de l'expressió del receptor IL-1RI actiu podria ser un mecanisme per inhibir l'efecte de la IL-1 β . En conseqüència, aquest factor podria contribuir a un potent feedback negatiu per tal de regular l'expressió del receptor en presència d'IL-1 β en les cèl·lules epitelials A549. Aquest efecte inhibitori de l'expressió de IL-1RI per part de IL-1 β ha estat descrit en cèl·lules epitelials de mucosa intestinal (McGee *et al.*, 1996) i en cèl·lules endotelials retinals (Aveleira *et al.* 2010). Aveleira *et al.* van observar que la inhibició de IL-1RI per part de IL-1 β es dona almenys en part, per un increment de la degradació lisosomal del receptor. Una característica conservada de la via de senyalització de IL-1 és la seva naturalesa transitòria. Així doncs, per posar fi a la senyalització, el receptor IL-1RI s'uneix a la proteïna toll-interacting protein (TOLLIP), que s'encarrega d'internalitzar IL-1RI cap als endosomes i que per tant, és necessària per la eficient degradació de IL-1RI (Burns *et al.*, 2000; Didierlaurent *et al.*, 2006). D'altra banda, Coulter *et al.*, no van trobar expressió detectable de IL-1RII en cèl·lules A549, suggerint que les cèl·lules epitelials alveolars no posseeixen la capacitat de regular a la baixa l'activitat de IL-1 β de forma extracel·lular. Per tant, dependrien de l'alliberació per part d'altres cèl·lules de factors solubles inhibidors de l'acció de la IL-1 β com l'antagonista IL-1Ra o bé les formes solubles dels receptors IL-1RI, IL-1RII o IL-RAcP, capaces de segrestar la citoquina i impedir la seva unió al receptor IL-1RI de membrana.

Com s'ha esmentat abans, s'ha descrit que en absència de síntesi de PGE₂ per inhibició de l'expressió de la COX, el tractament amb IL-1 inhibeix l'expressió de IL-1RI (Takii *et al.*, 1994). En conjunt, diversos estudis indiquen que la pròpia IL-1 té capacitat de regular l'expressió del seu receptor IL-1RI tant de manera positiva com negativa. La regulació diferencial de l'expressió de IL-1RI per part de d'IL-1 β entre fibroblastes i cèl·lules epitelials A549 podria ser deguda a que aquestes cèl·lules tenen una regulació diferent de la via d'IL-1 β , ja que presenten expressió basal de COX-2. En canvi, l'efecte del tractament amb TGF- β 1 respecte a la inducció del receptor IL-1RI es va mantenir similar als cultius de fibroblastes. Així doncs, la EMT va induir un descens de l'expressió de IL-1RI, que va ser encara més pronunciat en presència d'IL-1 β . Tot sembla indicar, que el fenotip miofibroblast, tant procedent de FMT com d'EMT té una deficiència en l'expressió de IL-1RI, que podria estar mediada, almenys en part, per la seva incapacitat de incrementar la secreció de PGE₂.

En diversos estudis s'ha descrit que la IL-1 β podria tenir propietats pro-fibròtiques a través del seu receptor IL-1RI (Gasse *et al.*, 2007). Aquesta afirmació es basa especialment en el model de bleomicina, on s'han observat nivells elevats d'aquesta citoquina en la fase inflamàtoria prèvia a la fase fibròtica. Les seves propietats pro-inflamatòries podrien en aquesta fase de la patologia

contribuir al desequilibri de factors solubles i a la resposta cel·lular de reparació descontrolada. Tot i així, un cop establerta la fase fibròtica, el paper de la IL-1 β com a element pro-inflamatori tindria una importància menor i en canvi, destacaria el seu efecte com a potent inductor de la via de les prostaglandines anti-fibròtiques. Tenint en compte que a la FPI en humans desconeixem els factors inicials que desencadenen la patologia, resulta més interessant l'anàlisi dels mediadors solubles presents quan la malaltia ja està establerta i és diagnosticada. En aquest sentit, la via de la IL-1 β , com a inhibidor de la formació de miofibroblastes, reductora de la síntesi de matriu extracel·lular i inductora de la secreció de PGE₂ presenta interessants possibilitats terapèutiques.

Un descens tant de forma basal com de la capacitat d'inducció de l'expressió del receptor 1 d'IL-1 β podria tenir una repercussió negativa en el paper anti-fibròtic de la IL-1 β . Degut a l'absència de IL-1RI en fibroblastes FPI, es donaria una menor inducció de COX-2 i en conseqüència de PGE₂, contribuint al descens de PGE₂ global al pulmó fibròtic i perdent les propietats anti-fibròtiques que aquesta prostaglandina presenta (Elias *et al.*, 1985; Saltzman *et al.* 1982; Kohyama *et al.*, 2001; Kolodsick *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2009). Cal tenir en compte que aquesta disminució en l'expressió de IL-1RI és especialment pronunciada en el fenotip miofibroblast, amb una absència pràcticament total d'inducció de COX-2 per estimulació amb IL-1 β . Aquest fet pot ser clau en la patologia, degut a la gran importància que té la presència dels miofibroblastes en FPI, sent la cèl·lula efectora principal del procés fibròtic.

VI - CONCLUSIONS

En l'estudi del fenotip miofibroblast i en la seva implicació en l'expressió de ciclooxigenasa-2 i la secreció de prostaglandina E2 en la fibrosi pulmonar idiopàtica s'han obtingut les següents conclusions:

- Els cultius de fibroblastes procedents de fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) presenten un nombre més elevat de miofibroblastes que els cultius control.
- El tractament d'un cultiu de fibroblastes control o de pacients amb FPI amb factor de creixement transformant beta 1 (TGF- β 1) durant 72h a 5 ng/ml indueix una diferenciació a miofibroblastes temps i dosi depenent, permetent obtenir un cultiu amb un alt percentatge de miofibroblastes. Aquesta inducció produeix el mateix nombre de miofibroblastes als dos grups de pacients però els procedents de pacients amb FPI expressen més col·lagen.
- Els miofibroblastes control i de FPI tanquen menys una ferida *in vitro* que els fibroblastes, per tant, el primer fenotip encarregat de la curació de ferides en condicions normals és el fibroblast.
- El tancament d'una ferida *in vitro* es menor en els cultius procedents d'individus amb FPI en comparació amb els controls, mostrant un procés de cicatrització anormal a la FPI. Alhora, els miofibroblastes fibròtics tenen una major participació en aquest procés. Els cultius enriquits en miofibroblastes procedents de cultius amb FPI presenten una capacitat de migració superior als miofibroblastes control.
- La proliferació és un component important en el tancament de la ferida *in vitro*, ja que la seva inhibició a través de la incubació amb Mitomicina C va disminuir l'àrea tancada per fibroblastes i miofibroblastes.
- El fenotip miofibroblast està associat a una regulació a la baixa de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) i en conseqüència, una producció reduïda del seu metabòlit principal, la prostaglandina E2 (PGE₂). Aquest fet té repercussió a la proliferació i migració d'aquest fenotip.
- L'expressió del receptor d'interleuquina 1 tipus I (IL-1RI) està disminuïda en fibroblastes de fibrosi pulmonar idiopàtica i en miofibroblastes en comparació amb fibroblastes control. Existeix una correlació positiva entre l'expressió del receptor IL-1RI i l'expressió de COX-2 en resposta a la interleuquina-1 β . Per tant, en els pacients amb FPI amb un elevat nombre de miofibroblastes, la seva deficient expressió del receptor IL-1RI afectaria a l'expressió de PGE₂.
- La interleuquina-1 β (IL-1 β) incrementa l'expressió del receptor IL-1RI en fibroblastes control i fibrosi pulmonar idiopàtica i la disminueix en cèl·lules epitelials alveolars A549. El pretractament amb TGF- β 1 inhibeix l'expressió del receptor a tots els casos, associant el fenotip miofibroblast amb una inducció disminuïda de IL-1RI.

VII - BIBLIOGRAFIA

A

Akahoshi T, Oppenheim JJ, Matsushima K., Interleukin 1 stimulates its own receptor expression on human fibroblasts through the endogenous production of prostaglandin(s) J Clin Invest. 1988;82(4):1219-24.

Albera C, Ferrero C, Rindone E, Zanotto S, Rizza E. Where do we stand with IPF treatment? Respir Res. 2013;14 Suppl 1:S7.

Amadeu TP, Coulomb B, Desmouliere A, Costa AM. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. Int J Low Extrem Wounds. 2003;2(2):60-8

American Thoracic Society; European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. Am J Respir Crit Care Med. 2002;165(2):277-304.

Anscher MS. Targeting the TGF-beta1 pathway to prevent normal tissue injury after cancer therapy. Oncologist 2010;15:350-359.

Aveleira C, Castilho A, Baptista F, Simões N, Fernandes C, Leal E, Ambrósio AF. High glucose and interleukin-1 β downregulate interleukin-1 type I receptor (IL-1RI) in retinal endothelial cells by enhancing its degradation by a lysosome-dependent mechanism. Cytokine. 2010;49:279-286.

B

Babiak A, Hetzel J, Krishna G, Fritz P, Moeller P, Balli T, Hetzel M. Transbronchial cryobiopsy: a new tool for lung biopsies. Respiration 2009;78:203-8. Baigent C, Patrono C. Selective cyclooxygenase 2 inhibitors, aspirin, and cardiovascular disease: a reappraisal. Arthritis Rheum. 2003;48(1):12-20.

Barlo NP, van Moorsel CH, Korthagen NM, Heron M, Rijkers GT, Ruven HJ, van den Bosch JM, Grutters JC. Genetic variability in the *IL1RN* gene and the balance between interleukin (IL)-1 receptor agonist and IL-1 β in idiopathic pulmonary fibrosis. Clin Exp Immunol. 2011;166(3):346-51.

Bhatnagar R, Penfornis H, Mauviel A, Loyau G, Saklatvala J, Pujol JP. Interleukin-1 inhibits the synthesis of collagen by fibroblasts Biochem Int. 1986;13(4):709-20.

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

Bonner JC, Rice AB, Ingram JL, Moomaw CR, Nyska A, Bradbury A, Sessoms AR, Chulada PC, Morgan DL, Zeldin DC, Langenbach R. Susceptibility of cyclooxygenase-2-deficient mice to pulmonary fibrogenesis. Am J Pathol. 2002;161(2):459-70.

Boraschi D, Tagliabue A. The interleukin-1 receptor family, Semin Immunol. 2013;25(6):394-407.

Borok Z, Gillissen A, Buhl R, Hoyt RF, Hubbard RC, Ozaki T, Rennard SI, Crystal RG. Augmentation of functional prostaglandin E levels on the respiratory epithelial surface by aerosol administration of prostaglandin E. Am Rev Respir Dis 1991;144:1080–1084.

Bossé Y, Thompson C, McMahon S, Dubois CM, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Leukotriene D4-induced, epithelial cell-derived transforming growth factor beta1 in human bronchial smooth muscle cell proliferation. *Clin Exp Allergy* 2008;38:113–121.

Brilla CG, Zhou G, Rupp H, Maisch B, Weber KT. Role of angiotensin II and prostaglandin E2 in regulating cardiac fibroblast collagen turnover. *Am J Cardiol*. 1995;76(13): 8D-13D.

Brock TG, McNish RW, Peters-Golden M. Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. *J Biol Chem*. 1999;274(17):11660-6.

Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(15):6642-6

Buckley ST, Medina C, Ehrhardt C. Differential susceptibility to epithelial-mesenchymal transition (EMT) of alveolar, bronchial and intestinal epithelial cells in vitro and the effect of angiotensin II receptor inhibition. *Cell Tissue Res*. 2010;342(1):39-51.

Bühling F, Wille A, Röcken C, Wiesner O, Baier A, Meinecke I, Welte T, Pap T. Altered expression of membrane-bound and soluble CD95/Fas contributes to the resistance of fibrotic lung fibroblasts to FasL induced apoptosis. *Respir Res*. 2005;6:37.

Burns K, Clatworthy J, Martin L, Martinon F, Plumpton C, Maschera B, Lewis A, Ray K, Tschopp J, Volpe F. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol*. 2000;2(6):346-51.

C

Cai GQ, Zheng A, Tang Q, White ES, Chou CF, Gladson CL, Olman MA, Ding Q. Downregulation of FAK-related non-kinase mediates the migratory phenotype of human fibrotic lung fibroblasts. *Exp Cell Res*. 2010;316(9):1600-9

Casoni GL, Tomassetti S, Cavazza A, Colby TV, Dubini A, Ryu JH, Carretta E, Tantalocco P, Piciocchi S, Ravaglia C, Gurioli C, Romagnoli M, Gurioli C, Chilosi M, Poletti V. Transbronchial lung cryobiopsy in the diagnosis of fibrotic interstitial lung diseases. *PLoS One*. 2014;9(2):e86716.

Nicholson AG, Fulford LG, Colby TV, du Bois RM, Hansell DM, Wells AU. The relationship between individual histologic features and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(2):173-7.

Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome Biol*. 2004;5(9):241.

Chaudhary NI, Schnapp A, Park JE. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(7):769-76

Clarke DL, Carruthers AM, Mustelin T, Murray LA. Matrix regulation of idiopathic pulmonary fibrosis: role of enzymes. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2013;6(1):20

Coulter KR, Wewers MD, Lowe MP, Knoell DL. Extracellular regulation of interleukin (IL)-1beta through lung epithelial cells and defective IL-1 type II receptor expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;20(5):964-75.

Coward WR, Watts K, Feghali-Bostwick CA, Knox A, Pang L. Defective histone acetylation is responsible for the diminished expression of cyclooxygenase 2 in idiopathic pulmonary fibrosis *Mol Cell Biol*. 2009;29(15):4325-39.

D

Datta A, Scotton CJ, Chambers RC. Novel therapeutic approaches for pulmonary fibrosis. *Br J Pharmacol*. 2011;163(1):141-72.

Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Jones BR, McMahon FB, Gleaves LA, Blackwell TS, Lawson WE. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;299(4):L442-52.

Desmoulière A, Rubbia-Brandt L, Abdiu A, Walz T, Macieira-Coelho A, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is expressed in a subpopulation of cultured and cloned fibroblasts and is modulated by gamma-interferon. *Exp Cell Res*. 1992a;201(1):64-73.

Desmoulière A, Rubbia-Brandt L, Grau G, Gabbiani G. Heparin induces alpha-smooth muscle actin expression in cultured fibroblasts and in granulation tissue myofibroblasts. *Lab Invest*. 1992b;67(6):716-26.

Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993;122:103-11.

Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*, 1995;146:56-66

Desmoulière A, Badid C, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:19–30.

Diaz A, Munoz E, Johnston R, Korn JH, Jimenez SA. Regulation of human lung fibroblast alpha 1(I) procollagen gene expression by tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and prostaglandin E2. *J Biol Chem*. 1993;268(14):10364-71.

Diaz A, Chepenik KP, Korn JH, Reginato AM, Jimenez SA. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta 1 in human lung fibroblasts. *Exp Cell Res*. 1998;241:222-229

Didierlaurent A, Brissoni B, Velin D, Aebi N, Tardivel A, Käslin E, Sirard JC, Angelov G, Tschopp J, Burns K. Tollip regulates proinflammatory responses to interleukin-1 and lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol*. 2006;26(3):735-42.

Dubois CM, Ruscetti FW, Palaszynski EW, Falk LA, Oppenheim JJ, Keller JR: Transforming growth factor is a potent inhibitor of interleukin-1 receptor expression. *J Exp Med* 1990; 172:737–742.

E

Elias JA, Rossman MD, Zurier RB, Daniele RP. Human alveolar macrophage inhibition of lung fibroblast growth. A prostaglandin-dependent process. *Am Rev Respir Dis.* 1985;131(1):94-9.

Espinosa K, Bossé Y, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. CysLT1 receptor upregulation by TGF-beta and IL-13 is associated with bronchial smooth muscle cell proliferation in response to LTD4. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:1032–1040.

F

Fang HY, Lin CY, Chow KC, Huang HC, Ko WJ. Microarray detection of gene overexpression in primary spontaneous pneumothorax. *Exp Lung Res.* 2010;36:323-330.

Fernandez IE, Eickelberg O. The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proc Am Thorac Soc.* 2012;9(3):111-6.

Fine A, Poliks CF, Donahue LP, Smith BD, Goldstein RH. The differential effect of prostaglandin E2 on transforming growth factor-beta and insulin-induced collagen formation in lung fibroblasts. *J Biol Chem* 1989;264:16988–16991.

Fingerlin TE. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis; *Nat Genet.* 2013;45(6): 613–620

G

Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases *J Pathol* 2003; 200: 500–503.

Garlanda C, Riva F, Bonavita E, Gentile S, Mantovani A. Decoys and regulatory “receptors” of the IL-1/Toll-like receptor superfamily. *Front Immunol.* 2013;4:180.

Garrison G, Huang SK, Okunishi K, Scott JP, Kumar Penke LR, Scruggs AM, Peters-Golden M. Reversal of myofibroblast differentiation by prostaglandin E(2). *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;48(5):550-8.

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

George TJ, Arnaoutakis GJ, Shah AS. Lung transplant in idiopathic pulmonary fibrosis. *Arch Surg.* 2011;146:1204-1209

Gharaee-Kermani M, Hu B, Phan SH, Gyetko MR. Recent advances in molecular targets and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: focus on TGFbeta signaling and the myofibroblast. *Curr Med Chem.* 2009;16(11):1400-17

Goldstein RH, Polgar P. The effect and interaction of bradykinin and prostaglandins on protein and collagen production by lung fibroblasts. *J Biol Chem.* 1982;257(15):8630-3.

Grünert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(8):657-65.

H

Hashimoto S, Gon Y, Takeshita I, Maruoka S, Horie T. IL-4 and IL-13 induce myofibroblastic phenotype of human lung fibroblasts through c-Jun NH2-terminal kinase-dependent pathway. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107(6):1001-8

Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, Pennathur S, Martinez FJ, Thannickal VJ. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med*. 2009;15(9):1077-81

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*. 2007;170(6):1807-16.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, De Wever O, Mareel M, Gabbiani G. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol*. 2012;180(4):1340-55.

Houchen CW, Sturmoski MA, Anant S, Breyer RM, Stenson WF. Prosurvival and antiapoptotic effects of PGE2 in radiation injury are mediated by EP2 receptor in intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G490–G498;

Hodges RJ, Jenkins RG, Wheeler-Jones CP, Copeman DM, Bottoms SE, Bellingan GJ, Nanthakumar CB, Laurent GJ, Hart SL, Foster ML, McAnulty RJ. Severity of lung injury in cyclooxygenase-2-deficient mice is dependent on reduced prostaglandin E(2) production. *Am J Pathol* 2004;165:1663–1676,.

Hoffman HM, Wanderer AA. Inflammasome and IL-1beta-mediated disorders. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2010;10(4):229-35.

Horowitz JC, Peters-Golden M. Prostaglandin E2's new trick: "decider" of differential alveolar cell life and death. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(1):2-3

Hoshino T, Okamoto M, Sakazaki Y, Kato S, Young HA, Aizawa H. Role of proinflammatory cytokines IL-18 and IL-1beta in bleomycin-induced lung injury in humans and mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41(6):661-70

Hu B, Gharaee-Kermani M, Wu Z, Phan SH. Epigenetic regulation of myofibroblast differentiation by DNA methylation. *Am J Pathol*. 2010;177(1):21-8.

Huang SK, Wettlaufer SH, Hogaboam C, Aronoff DM, Peters-Golden M. Prostaglandin E(2) inhibits collagen expression and proliferation in patient-derived normal lung fibroblasts via E prostanoid 2 receptor and cAMP signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(2):L405-13.

Huang SK, Peters-Golden M. Eicosanoid lipid mediators in fibrotic lung diseases: ready for prime time? *Chest*. 2008a;133(6):1442-50.

Huang SK, Wettlaufer SH, Chung J, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 inhibits specific lung fibroblast functions via selective actions of PKA and Epac-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008b;39:482-489.

Huang SK, Wettlaufer SH, Hogaboam CM, Flaherty KR, Martinez FJ, Myers JL, Colby TV, Travis WD, Toews GB, Peters-Golden M. Variable prostaglandin E2 resistance in fibroblasts from patients with usual interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2008c;177:66–74.

Huang SK, White ES, Wettlaufer SH, Grifka H, Hogaboam CM, Thannickal VJ, Horowitz JC, Peters-Golden M. Prostaglandin E(2) induces fibroblast apoptosis by modulating multiple survival pathways. *FASEB J.* 2009;23(12):4317-26.

Huang SK, Fisher AS, Scruggs AM, White ES, Hogaboam CM, Richardson BC, Peters-Golden M. *et al.* Hypermethylation of PTGER2 confers prostaglandin E2 resistance in fibrotic fibroblasts from humans and mice. *Am J Pathol.* 2010;177(5):2245-55.

Huang SK, Scruggs AM, Donaghy J, Horowitz JC, Zaslona Z, Przybranowski S, White ES, Peters-Golden M. Histone modifications are responsible for decreased Fas expression and apoptosis resistance in fibrotic lung fibroblasts. *Cell Death and Disease* 2013;4, e621

Hutyrová B, Pantelidis P, Drábek J, Zůrková M, Kolek V, Lenhart K, Welsh KI, Du Bois RM, Petrek M. Interleukin-1 Gene Cluster Polymorphisms in Sarcoidosis and Idiopathic Pulmonary Fibrosis *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(2):148-51.

I

Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002;110:341–350

J

Jabbour HN, Kelly RW, Boddy SC. Autocrine/paracrine regulation of apoptosis in epithelial cells by prostaglandin E2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;67:357–363.

Jenkins G, Blanchard A, Borok Z, Bradding P, Ehrhardt C, Fisher A, Hirani N, Johnson S, Königshoff M, Maher TM, Millar A, Parfrey H, Scotton C, Tetley T, Thickett D, Wolters P; ECIPF workshop. In search of the fibrotic epithelial cell: opportunities for a collaborative network, *Thorax.* 2012;67(2):179-82

Jones MG, Fletcher S, Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: Recent trials and current drug therapy. *Respiration.* 2013;86(5):353-63

Jovanovic DV, Mineau F, Notoya K, Reboul P, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Nitric oxide induced cell death in human osteoarthritic synoviocytes is mediated by tyrosine kinase activation and hydrogen peroxide and/or superoxide formation. *J Rheumatol* 2002;29:2165–2175

K

Kalluri R, Neilson EG. Epithelial–mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1776-84

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-8.

- Kanazawa S, Fujiwara T, Matsuzaki S, Shingaki K, Taniguchi M, Miyata S, Tohyama M, Sakai Y, Yano K, Hosokawa K, Kubo T. bFGF regulates PI3-kinase-Rac1-JNK pathway and promotes fibroblast migration in wound healing. *PLoS One*. 2010;5(8):e12228
- Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res*. 2005;6:56.
- Keerthisingam CB, Jenkins RG, Harrison NK, Hernandez-Rodriguez NA, Booth H, Laurent GJ, Hart SL, Foster ML, McAnulty RJ. Cyclooxygenase-2 deficiency results in a loss of the anti-proliferative response to transforming growth factor-beta in human fibrotic lung fibroblasts and promotes bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol* 2001;158:1411–1422.
- Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, Berezney OH, Greenberg AH. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991;5(2):155-62.
- Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, Unruh H. TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;14(2):131-8.
- Kim DS, Collard HR, King TE, Jr. Classification and natural history of the idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc*. 2006; 3:285-292
- Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(35):13180-5
- Kim KK, Wei Y, Szekeres C, Kugler MC, Wolters PJ, Hill ML, Frank JA, Brumwell AN, Wheeler SE, Kreidberg JA, Chapman HA. Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2009;119(1):213-24.
- King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2011;378:1949-61.
- Kis K, Liu X, Hagood JS. Myofibroblast differentiation and survival in fibrotic disease. *Expert Rev Mol Med*. 2011;13:e27
- Kohyama T, Ertl RF, Valenti V, Spurzem J, Kawamoto M, Nakamura Y, Veys T, Allegra L, Romberger D, Rennard SI. Prostaglandin E(2) inhibits fibroblast chemotaxis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;281(5):L1257-63.
- Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, Pitossi F, Gauldie J. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2001;107(12):1529-36.
- Kolodsick JE, Peters-Golden M, Larios J, Toews GB, Thannickal VJ, Moore BB. Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29(5):537-44.
- Korthagen NM, van Moorsel CH, Kazemier KM, Ruven HJ, Grutters JC. IL1RN genetic variations and risk of IPF: a meta-analysis and mRNA expression study. *Immunogenetics* 2012;64:371–377

Kotani I, Sato A, Hayakawa H, Urano T, Takada Y, Takada A. Increased procoagulant and antifibrinolytic activities in the lungs with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thromb Res* 1995, 77:493–504.

Kottmann RM, Hogan CM, Phipps RP, Sime PJ. Determinants of initiation and progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology*. 2009;14(7):917-33.

Kuhn C, McDonald JA. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol*. 1991;138(5):1257-65

L

Lappi-Blanco E, Soini Y, Paakko P. Apoptotic activity is increased in the newly formed fibromyxoid connective tissue in bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *Lung* 1999;177:367–376.

Lappi-Blanco E, Kaarteenaho-Wiik R, Maasilta PK, Anttila S, Pääkkö P, Wolff HJ. COX-2 is widely expressed in metaplastic epithelium in pulmonary fibrous disorders. *Am J Clin Pathol*. 2006;126(5):717-24.

Larsson O, Diebold D, Fan D, Peterson M, Nho RS, Bitterman PB, Henke CA. Fibrotic myofibroblasts manifest genome-wide derangements of translational control. *PLoS One*. 2008;3(9):e3220

Lee JS, Ryu JH, Elicker BM, Lydell CP, Jones KD, Wolters PJ *et al*. Gastroesophageal reflux therapy is associated with longer survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 184:1390-1394

Ling H, Jia X, Zhang Y, Gapter LA, Lim YS, Agarwal R, Ng KY. Pachymic acid inhibits cell growth and modulates arachidonic acid metabolism in nonsmall cell lung cancer A549 cells. *Mol Carcinog*. 2010;49(3):271-82.

Liu T, Ullenbruch M, Young Choi Y, Yu H, Ding L, Xaubet A, Pereda J, Feghali-Bostwick CA, Bitterman PB, Henke CA, Pardo A, Selman M, Phan SH. Telomerase and telomere length in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;49(2):260-8

Lovgren AK, Jania LA, Hartney JM, Parsons KK, et. Al. COX-2-derived prostacyclin protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Aug;291(2):L144-56.

M

Macneal K, Schwartz DA. The genetics and environmental causes of pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2012;9(3):120-5.

Maher TM, Wells AU, Laurent GJ. Idiopathic pulmonary fibrosis: multiple causes and multiple mechanisms? *Eur Respir J*. 2007;30(5):835-9.

- Maher TM, Evans IC, Bottoms SE, Mercer PF, Thorley AJ, Nicholson AG, Laurent GJ, Tetley TD, Chambers RC, McAnulty RJ. Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(1):73-82
- Marchand-Adam S, Marchal J, Cohen M, *et al*. Defect of hepatocyte growth factor secretion by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:1156–1161.
- Martin MU, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:265–80.
- Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(9):4219-23.
- Mata M, Ruíz A, Cerdá M, Martínez-Losa M, Cortijo J, Santangelo F, Serrano-Mollar A, Lombart-Bosch A, Morcillo EJ. Oral N-acetylcysteine reduces bleomycin-induced lung damage and mucin Muc5ac expression in rats. *Eur Respir J*. 2003;22(6):900-5.
- Matsumura T, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Munemasa Y, Ishida J, Nagai R. Regulation of transforming growth factor-beta-dependent cyclooxygenase-2 expression in fibroblasts. *J Biol Chem*. 2009;284(51):35861-71.
- McAnulty RJ, Chambers RC, Laurent GJ. Regulation of fibroblast procollagen production. Transforming growth factor-beta 1 induces prostaglandin E2 but not procollagen synthesis via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *Biochem J*. 1995;307:63-68.
- McAnulty RJ, Hernández-Rodríguez NA, Mutsaers SE, Coker RK, Laurent GJ. Indomethacin suppresses the anti-proliferative effects of transforming growth factor-beta isoforms on fibroblast cell cultures *Biochem J*. 1997;321:639-43.
- McGee DW, Vitkus SJ, Lee P. The effect of cytokine stimulation on IL-1 receptor mRNA expression by intestinal epithelial cells. *Cell Immunol*. 1996;168:276–80.
- McNulty K, Janes SM. Stem cells and pulmonary fibrosis: cause or cure? *Proc Am Thorac Soc*. 2012;9(3):164-71
- Mitchell JA, Belvisi MG, Akarasereenont P, Robbins RA, Kwon OJ, Croxtall J, Barnes PJ, Vane JR. Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br J Pharmacol*. 1994;113(3):1008-14.
- Molina-Molina M, Serrano-Mollar A, Bulbena O, Fernandez-Zabalegui L, Closa D, Marin-Arguedas A, Torrego A, Mullol J, Picado C, Xaubet A. Losartan attenuates bleomycin induced lung fibrosis by increasing prostaglandin E2 synthesis. *Thorax* 2006;61:604–610.
- Moodley YP, Misso NL, Scaffidi AK, Fogel-Petrovic M, McAnulty RJ, Laurent GJ, Thompson PJ, Knight DA. Inverse effects of interleukin-6 on apoptosis of fibroblasts from pulmonary fibrosis and normal lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:490–498.
- Moodley YP, Caterina P, Scaffidi AK, Misso NL, Papadimitriou JM, McAnulty RJ, Laurent GJ, Thompson PJ, Knight DA. Comparison of the morphological and biochemical changes in normal human lung fibroblasts and fibroblasts derived from lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis during FasL-induced apoptosis. *J Pathol*. 2004;202(4):486-95.

Moore BB, Coffey MJ, Christensen P, Sitterding S, Ngan R, Wilke CA, McDonald R, Phare SM, Peters-Golden M, Paine R 3rd, Toews GB. GM-CSF regulates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via a prostaglandin-dependent mechanism. *J Immunol* 2000;165:4032–4039.

Moore BB, Peters-Golden M, Christensen PJ, Lama V, Kuziel WA, Paine R 3rd, Toews GB. Alveolar epithelial cell inhibition of fibroblast proliferation is regulated by MCP-1/CCR2 and mediated by PGE2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:L342–349.

Murakami S, Nagaya N, Itoh T, Kataoka M, Iwase T, Horio T, Miyahara Y, Sakai Y, Kangawa K, Kimura H. Prostacyclin agonist with thromboxane synthase inhibitory activity (ONO-1301) attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L59–65.

N

O

Oberringer M, Meins C, Bubel M, Pohlemann T. In vitro wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor beta1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model. *J Mol Histol.* 2008;39(1):37-47

O'Neill LA. The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. *Biochem Soc Trans* 2000;28:557–63.

P

Peters-Golden M, Bailie M, Marshall T, Wilke C, Phan SH, Toews GB, Moore BB. Protection from pulmonary fibrosis in leukotriene deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:229–235

Phan SH, McGarry BM, Loeffler KM, Kunkel SL. Leukotriene C4 binds to rat lung fibroblasts and stimulates collagen synthesis. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1987;17B:997–999.

Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts, *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(3):334-7.

Pinheiro GA, Antao VC, Wood JM, Wassell TJ. Occupational risks for idiopathic pulmonary fibrosis mortality in the United States. *Int J Occup Environ Health.* 2008;14:117-23.

Postlethwaite AE, Lachman LB, Kang AH. Induction of fibroblast proliferation by interleukin-1 derived from human monocytic leukemia cells. *Arthritis Rheum.* 1984;27(9):995-1001.

Pujols L, Xaubet A, Ramírez J, Mullol J, Roca-Ferrer J, Torrego A, Cidlowski JA, Picado C. Expression of glucocorticoid receptors alpha and beta in steroid sensitive and steroid insensitive interstitial lung diseases. *Thorax* 2004; 59:687-693;

Q

R

Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(7):810-6

Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE Jr, Kondoh Y, Myers J, Müller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schünemann HJ; ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence –based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(6):788-824.

Raines EW, Dower SK, Ross R. Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. *Science*. 1989;243(4889):393-6.

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;24(5):591-8.

Ramos C, Becerril C, Montaña M, García-De-Alba C, Ramírez R, Checa M, Pardo A, Selman M. FGF-1 reverts epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 through MAPK/ERK kinase pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;299(2):L222-31

Reynolds HY. Lung inflammation and fibrosis: an alveolar macrophage centered perspective from the 1970s to 1980s. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, 171:98–102.

Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(5):986-1000.

Roca-Ferrer J, Garcia-Garcia FJ, Pereda J, Perez-Gonzalez M, Pujols L, Alobid I, Mullol J, Picado C. Reduced expression of COXs and production of prostaglandin E(2) in patients with nasal polyps with or without aspirin-intolerant asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:66-72.

Rocca B, Spain LM, Puré E, Langenbach R, Patrono C, FitzGerald GA. Distinct roles of prostaglandin H synthases 1 and 2 in T-cell development. *J Clin Invest*. 1999;103(10):1469-77.

Rocca B. Targeting PGE2 receptor subtypes rather than cyclooxygenases: a bridge over troubled water? *Mol Interv*. 2006;6(2):68-73, 58.

Ross B, D'Orléans-Juste P, Giaid A. Potential role of endothelin-1 in pulmonary fibrosis: from the bench to the clinic. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;42(1):16-20.

Rubbia-Brandt L, Sappino AP, Gabbiani G. Locally applied GM-CSF induces the accumulation of alpha-smooth muscle actin containing myofibroblasts. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1991;60(2):73-82

S

Saltzman LE, Moss J, Berg RA, Hom B, Crystal RG. Modulation of collagen production by fibroblasts. Effects of chronic exposure to agonists that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem J*. 1982;204(1):25-30.

Sasaki M, Kashima M, Ito T, Watanabe A, Izumiyama N, Sano M, Kagaya M, Shioya T, Miura M. Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human

lung fibroblasts by PDGF, interleukin-1beta and TNF-alpha. *Mediators Inflamm.* 2000;9(3-4):155-60.

Scotton CJ, Chambers RC. Bleomycin revisited: towards a more representative model of IPF? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010;299:L439-L441

Selman M, King TE, Pardo A; American Thoracic Society; European Respiratory Society; American College of Chest Physicians, Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy, *Ann Intern Med.* 2001;134(2):136-51.

Selman M, Pardo A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(4):364-72.

Selman M, Pardo A. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis: An integral model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014.

Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, Gabbiani G. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol* 1998;142:873-81.

Serrano-Mollar A, Closa D, Prats N, Blesa S, Martinez-Losa M, Cortijo J, Estrela JM, Morcillo EJ, Bulbena O. *In vivo* antioxidant treatment protects against bleomycin-induced lung damage in rats. *Br J Pharmacol.* 2003;138(6):1037-48.

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;176(12):1261-8.

Serrano-Mollar A. Alveolar epithelial cell injury as an etiopathogenic factor in pulmonary fibrosis. *Arch Bronconeumol.* 2012;48 Suppl 2:2-6

Singh SR, Hall IP. Airway myofibroblasts and their relationship with airway myocytes and fibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:127-132.

Smith DR, Kunkel SL, Standiford TJ, Rolfe MW, Lynch JP, III, Arenberg DA, Wilke CA, Burdick MD, Martinez FJ, Hampton IN, Whyte RI, Orringer MB, Strieter RM. Increased interleukin-1 receptor antagonist in idiopathic pulmonary fibrosis: a compartmental analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1965-1973.

Suganuma H, Sato A, Tamura R, Chida K. Enhanced migration of fibroblasts derived from lungs with fibrotic lesions. *Thorax.* 1995;50(9):984-9.

T

Takai E, Tsukimoto M, Kojima S. TGF- β 1 downregulates COX-2 expression leading to decrease of PGE2 production in human lung cancer A549 cells, which is involved in fibrotic response to TGF- β 1. *PLoS One.* 2013;8(10):e76346

Takeuchi M, Nagai S, Tsutumi T, Mio T, Izumi T. The Number of Interleukin 1 Receptors on Lung Fibroblasts in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Respiration* 1999;66:236-241

- Takii T, Akahoshi T, Kato K, Hayashi H, Marunouchi T, Onozaki K. Interleukin-1 up-regulates transcription of its own receptor in a human fibroblast cell line TIG-1: role of endogenous PGE2 and cAMP. *Eur J Immunol.* 1992;22(5):1221-7.
- Takii T, Hayashi H, Marunouchi T, Onozaki K. Interleukin-1 down-regulates type I interleukin 1 receptor mRNA expression in a human fibroblast cell line TIG-1 in the absence of prostaglandin E2 synthesis. *Lymphokine Cytokine Res.* 1994;13:213–9.
- Taniguchi H, Ebina M, Kondoh Y, Ogura T, Azuma A, Suga M, Taguchi Y, Takahashi H, Nakata K, Sato A, Takeuchi M, Raghu G, Kudoh S, Nukiwa T; Pirfenidone Clinical Study Group in Japan. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2010; 35:1079-87
- Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Degryse AL, Li B, Han W, Sherrill TP, Plieth D, Neilson EG, Blackwell TS, Lawson WE. Contribution of epithelial-derived fibroblasts to bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(7):657-65
- Taskar VS, Coultas DB. Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3:293-8
- Thampatty BP, Wang JH. A new approach to study fibroblast migration. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2007;64(1):1-5
- Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, Horowitz JC, Day RM, Thomas PE. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 2003;278(14):12384-9.
- Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442–454
- Todd NW, Luzina IG, Atamas SP. Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012;5(1):11
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(5):349-63.
- Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE Jr, Lynch DA, Nicholson AG, Ryerson CJ, Ryu JH, Selman M, Wells AU, Behr J, Bouros D, Brown KK, Colby TV, Collard HR, Cordeiro CR, Cottin V, Crestani B, Drent M, Dudden RF, Egan J, Flaherty K, Hogaboam C, Inoue Y, Johkoh T, Kim DS, Kitaichi M, Loyd J, Martinez FJ, Myers J, Protzko S, Raghu G, Richeldi L, Sverzellati N, Swigris J, Valeyre D; ATS/ERS Committee on Idiopathic Interstitial Pneumonias. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Update of the International Multidisciplinary Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(6):733-48.
- Tsukui T, Ueha S, Abe J, Hashimoto S, Shichino S, Shimaoka T, Shand FH, Arakawa Y, Oshima K, Hattori M, Inagaki Y, Tomura M, Matsushima K. Qualitative rather than quantitative changes are hallmarks of fibroblasts in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 2013;183(3):758-73.

U

Uhal BD, Joshi I, Hughes WF, Ramos C, Pardo A, Selman M. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol* 1998;275:L1192–L1199.

Uhal BD. Apoptosis in lung fibrosis and repair. *Chest*. 2002;122(6 Suppl):293S-298S.

Uhal BD, Kim JK, Li X, Molina-Molina M. Angiotensin-TGF-beta 1 crosstalk in human idiopathic pulmonary fibrosis: autocrine mechanisms in myofibroblasts and macrophages. *Curr Pharm Des*. 2007;13(12):1247-56.

V

Vancheri C, Sortino MA, Tomaselli V, Mastruzzo C, Condorelli F, Bellistri G, Pistorio MP, Canonico PL, Crimi N. Different expression of TNF-alpha receptors and prostaglandin E(2) Production in normal and fibrotic lung fibroblasts: potential implications for the evolution of the inflammatory process. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:628–634.

Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest*. 2007;117(3):557-67.

W

Waghray M, Cui Z, Horowitz JC, Subramanian IM, Martinez FJ, Toews GB, Thannickal VJ. Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB J* 2005, 19:854–856.

Wang R, Zagariya A, Ang E, Ibarra-Sunga O, Uhal BD. Fas-induced apoptosis of alveolar epithelial cells requires ANG II generation and receptor interaction. *Am J Physiol* 1999;277:L1245–L1250

Wardlaw AJ, Hay H, Cromwell O, *et al*. Leukotrienes, LTC4 and LTB4, in bronchoalveolar lavage in bronchial asthma and other respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84:19–26.

Weber A, Wasiliew P, Kracht M, Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Sci Signal*. 2010;3(105):cm1

White ES, Thannickal VJ, Carskadon SL, Dickie EG, Livant DL, Markwart S, Toews GB, Arenberg DA. Integrin alpha4beta1 regulates migration across basement membranes by lung fibroblasts: a role for phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;15;168(4):436-42.

White ES, Atrasz RG, Dickie EG, Aronoff DM, Stambolic V, Mak TW, Moore BB, Peters-Golden M. Prostaglandin E(2) inhibits fibroblast migration by E prostanoid 2 receptor-mediated increase in PTEN activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:135–141.

Wilborn J, Crofford LJ, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM, Peters-Golden M. Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. *J Clin Invest*. 1995;95(4):1861-8.

Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AJ, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 2005;166(5):1321-32

Willis BC, duBois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(4):377-82.

Willis BC, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;293(3):L525-34.

Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008;214(2):199-210.

Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012;18(7):1028-40.

X

Xaubet A, Ancochea J, Morell F, Rodriguez-Arias JM, Villena V, Blanquer R, Montero C, Sueiro A, Disdier C, Vendrell M, Spanish group on interstitial Lung Disease, SEPAR. Report on the incidence of interstitial lung diseases in Spain. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2004a;21(1):64-70

Xaubet A, Roca-Ferrer J, Pujols L, Ramírez J, Mullol J, Marin-Arguedas A, Torrego A, Gimferrer JM, Picado C. Cyclooxygenase-2 is up-regulated in lung parenchyma of chronic obstructive pulmonary disease and down-regulated in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2004b;21(1):35-42

Xaubet A, Ancochea J, Bollo E, Fernández-Fabrellas E, Franquet T, Molina-Molina M, Montero MA, Serrano-Mollar A. Normativa sobre el diagnóstico y tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática, *Arch Bronconeumol.* 2013;49(8):343-353.

Y

Z

Zhang Y, Lee TC, Guillemin B, Yu MC, Rom WN. Enhanced IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. *J Immunol.* 1993;150(9):4188-96.

Zhang K, Rekhter MD, Gordon D, Phan SH. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 1994, 145:114–125,

Zhang HY, Gharaee-Kermani M, Phan SH. Regulation of lung fibroblast alpha-smooth muscle actin expression, contractile phenotype, and apoptosis by IL-1beta, *J Immunol.* 1997;158(3):1392-9.

Zhang A, Wang MH, Dong Z, Yang T. Prostaglandin E2 is a potent inhibitor of epithelial-to-mesenchymal transition: interaction with hepatocyte growth factor. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F1323–1331

Zhou Y, Hagood JS, Lu B, Merryman WD, Murphy-Ullrich JE. Thy-1-integrin alpha v beta5 interactions inhibit lung fibroblast contraction-induced latent transforming growth factor-beta1 activation and myofibroblast differentiation. *J Biol Chem.* 2010;285(29):22382-93

VIII – ANNEX

Lung Myofibroblasts Are Characterized by Down-Regulated Cyclooxygenase-2 and Its Main Metabolite, Prostaglandin E2

Marta Gabasa^{1,2}, Dolores Royo^{1,2}, Maria Molina-Molina^{2,3}, Jordi Roca-Ferrer^{1,2}, Laura Pujols^{1,2}, Cesar Picado^{2,4}, Antoni Xaubet^{2,4*}, Javier Pereda^{1,2,5}

1 Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, **2** Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Spain, **3** Servei de Pneumologia, Grup de Recerca Pneumològic, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Bellvitge (IDIBELL), Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, **4** Servei de Pneumologia I Al·lèrgia Respiratòria, Institut Clínic Del Tòrax, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Spain, **5** Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, València, Spain

Abstract

Background: Prostaglandin E2 (PGE₂), the main metabolite of cyclooxygenase (COX), is a well-known anti-fibrotic agent. Moreover, myofibroblasts expressing α -smooth muscle actin (α -SMA), fibroblast expansion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) are critical to the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Our aim was to investigate the expression of COX-2 and PGE₂ in human lung myofibroblasts and establish whether fibroblast-myofibroblast transition (FMT) and EMT are associated with COX-2 and PGE₂ down-regulation.

Methods: Fibroblasts obtained from IPF patients (n=6) and patients undergoing spontaneous pneumothorax (control, n=6) and alveolar epithelial cell line A549 were incubated with TGF- β 1 and FMT and EMT markers were evaluated. COX-2 and α -SMA expression, PGE₂ secretion and cell proliferation were measured after IL-1 β and PGE₂ incubation.

Results: Myofibroblasts from both control and IPF fibroblast cultures stimulated with IL-1 β showed no COX-2 expression. IPF fibroblasts showed increased myofibroblast population and reduced COX-2 expression in response to IL-1 β . TGF- β 1 increased the number of myofibroblasts in a time-dependent manner. In contrast, TGF- β 1 induced slight COX-2 expression at 4 h (without increase in myofibroblasts) and 24 h, but not at 72 h. Both IPF and control cultures incubated with TGF- β 1 for 72 h showed diminished COX-2 induction, PGE₂ secretion and α -SMA expression after IL-1 β addition. The latter decreased proliferation in fibroblasts but not in myofibroblasts. A549 cells incubated with TGF- β 1 for 72 h showed down-regulated COX-2 expression and low basal PGE₂ secretion in response to IL-1 β . Immuno-histochemical analysis of IPF lung tissue showed no COX-2 immuno-reactivity in myofibroblast foci.

Conclusions: Myofibroblasts are associated with COX-2 down-regulation and reduced PGE₂ production, which could be crucial in IPF development and progression.

Citation: Gabasa M, Royo D, Molina-Molina M, Roca-Ferrer J, Pujols L, et al. (2013) Lung Myofibroblasts Are Characterized by Down-Regulated Cyclooxygenase-2 and Its Main Metabolite, Prostaglandin E2. PLoS ONE 8(6): e65445. doi:10.1371/journal.pone.0065445

Editor: Mauricio Rojas, University of Pittsburgh, United States of America

Received: December 12, 2012; **Accepted:** April 24, 2013; **Published:** June 3, 2013

Copyright: © 2013 Gabasa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by FIS PI060064 grant and SEPAR Fundació Respira. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: axaubet@clinic.ub.es

These authors contributed equally to this work as senior authors.

Background

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and fatal interstitial lung disease of uncertain etiology, characterized by the histopathological pattern of usual interstitial pneumonia. This fibrotic process involves the loss of lung architecture through increased epithelial cell apoptosis and abnormal wound healing, followed by the formation of fibroblast foci and excessive collagen deposition. In this context, the crucial role of myofibroblasts in tissue remodeling has been well described [1]. Myofibroblasts exhibit a contractile and collagen-secretory phenotype, characterized by the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA). Many

origins have been suggested for these cells [1]. The most important sources are probably perivascular and peribronchiolar adventitial fibroblasts, which differentiate into myofibroblasts – a process known as fibroblast-myofibroblast transition (FMT) – in a pro-fibrotic environment [1]. Moreover, evidence of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) reveals the importance of epithelial cells as an additional source of myofibroblasts [2]. EMT involves a transition from epithelial cells to mesenchymal myofibroblast-like cells that involves a decreased expression of epithelial markers such as E-cadherin [2].

An imbalance between pro-fibrotic and anti-fibrotic mediators appears to exist in IPF. Numerous pro-fibrotic factors such as

transforming growth factor (TGF)- β 1 [3] and angiotensin-II [4] have been reported in IPF. In contrast, few anti-fibrotic mediators have been identified. Of the latter, prostaglandin E₂ (PGE₂) is derived from the metabolism of arachidonic acid by cyclooxygenase enzymes [5]. Experimental models of lung fibrosis show the pivotal role of this prostaglandin [6,7]. PGE₂ enhances epithelial-mesenchymal wound healing since it improves epithelial cell survival [8], inhibits fibroblast proliferation [9], collagen I synthesis [10], cell migration [11] and cell differentiation into myofibroblasts [12], as well as inducing fibroblast apoptosis [13]. A deficiency of PGE₂ synthesis as a result of down-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) has been described in IPF [14–16]. Consequently, the inability to induce COX-2 and PGE₂ synthesis has been associated with increased fibroblast proliferation and alveolar epithelial cell apoptosis [17].

No studies to date have reported any connection between the myofibroblast phenotype and the lack of PGE₂ in IPF. We hypothesized that the increase in myofibroblast and mesenchymal myofibroblast-like cell population observed in IPF could be related to the down-regulation of COX-2 expression and reduced PGE₂ synthesis. Therefore, our aim was to study COX-2 regulation and PGE₂ production in myofibroblasts and in FMT and EMT processes.

Methods

Population

We obtained pulmonary biopsies from patients suffering from IPF (n = 6). The diagnosis of IPF was established according to the American Thoracic Society/European Respiratory Society Consensus Statement [18]. None of the IPF patients had received corticosteroids or other immunosuppressant therapy at the time of sample collection. As for the control group, we obtained lung tissue from subjects with no history of pulmonary disease who were undergoing surgical treatment for spontaneous pneumothorax (n = 6). No histopathological evidence of disease was found in these tissue samples. Written informed consent was obtained from all patients according to institutional guidelines, and the study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clínic, Barcelona.

Cell Culture and Treatments

Primary fibroblasts were isolated from the lung biopsies, using previously described methods [19]. Briefly, 1-sq.-mm fragments of tissue were incubated under sterile conditions in Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and 2 μ g/ml amphotericin B (Sigma, St Louis, MO, USA). Cultures were kept in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. Fibroblasts were grown to subconfluence and subcultured by 0.05% trypsin-0.02% EDTA treatment. Fibroblasts were studied at passage 5 to 6. Culture characterization was performed by immunofluorescence for vimentin (Invitrogen) and pancytokeratin (C2562, Sigma), as indicated elsewhere [19]. Fibroblast cultures stained positive for vimentin and negative for cytokeratins, demonstrating the absence of epithelial cells in these cultures.

The A549 human lung adenocarcinoma epithelial cell line (American Type Culture Collection, Rockville, MD) was cultured in RPMI 1640 media (Lonza) with 1 mM L-Glutamine (Lonza) and supplemented as mentioned above.

In all the experiments, the medium was removed when the cell cultures reached 80% confluence and the cells were incubated in

serum-free medium for 24 h. Three experimental models were then performed.

In the first set of experiments, fibroblasts were treated with or without IL-1 β (10 ng/ml; R&D systems, Minneapolis, USA), a well-known inducer of COX-2 expression [15], for 4 and 24 h and COX-2 and α -SMA expression were measured.

In a second set of experiments, we studied the effect of TGF- β 1 (5 ng/ml, R&D systems) in control and IPF cultures for 4, 24 and 72 h. We measured COX-2, α -SMA and collagen I α 1 expression. With these experiments, we established an *in vitro* model of FMT and EMT by incubating fibroblasts and A549 cells, respectively, with TGF- β 1 for 72 h. EMT was also characterized by the expression of E-cadherin and immunofluorescence.

In a third set of experiments on cells treated with TGF- β 1 for 72 h, we studied the effect of IL-1 β (10 ng/ml for fibroblasts and 1 ng/ml for A549 cells) and PGE₂ (5 ng/ml, Cayman chemicals, Michigan, USA) for an additional 24 h. The reasons for the use of a different concentration of IL-1 β are firstly based on the literature [19,20] and secondly based on our experience. We obtained similar PGE₂ levels in both cells using those concentrations, allowing the comparisons between cell types. Additional TGF- β 1 for 4 h and 24 h and the selective COX-2 inhibitor Celecoxib (10 μ M, Sigma) were also tested. In this set of experiments TGF- β 1 was removed at 72 h and fresh culture medium was added with stimuli. We measured COX-2, COX-1, α -SMA, PGE₂ secretion and proliferation. We also compared these experiments with an early treatment of TGF- β 1 at 4 h. The experiments were carried out on 6 tissue samples for each group, unless otherwise indicated. The experiments on A549 cells were performed in quadruplicate, at the very least.

Western Blot

After treatment, cells plated on 90 cm²-diameter culture dishes were washed twice with ice-cold phosphate buffer saline (PBS). Cells were lysated directly with 200 μ l of RIPA buffer [TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM (pH 7.4), 1% NP40 Igepal, 1% Triton X-100, 0.1% SDS and 5 μ l/ml of a protease inhibitor cocktail (Sigma)]. The lysate was maintained for 20 min on ice and was then collected and frozen at -80°C. Samples were thawed, sonicated twice for 15 s in a Sonifier (Branson, Danbury, CT, USA) and immediately centrifuged at 20,000 g for 10 min at 4°C for protein measurement. 12.5–30 μ g of protein from fibroblasts and A549 cells were denaturalized in a thermocycler (70°C, 10 min) in loading buffer (NuPAGE LDS sample buffer), loaded on 7% Tris-Acetate gels and run (125 V, 90 min) in a Novex XCell II Mini-Cell (Invitrogen, San Diego, CA, USA). The proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane and non-specific binding sites were blocked using blocking buffer (5% non-fat dry milk, 0.1% Tween 20 in PBS). Membranes were incubated overnight at 4°C with 1:1.000 dilution in blocking buffer of the primary antibodies against COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), COX-1 (Santa Cruz Biotechnology), α -SMA (Sigma), E-cadherin (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) or p44/42 MAPK (Erk1/2) (Cell Signalling Technology) and 1:10.000 dilution for β -actin (Sigma). Blots were then washed in 0.5% Tween 20 in PBS (T-PBS) and subsequently incubated for 2 h at room temperature with an appropriate horseradish peroxidase-labeled secondary antibody diluted 1:3,000 in blocking buffer. After washing with T-PBS, blots were incubated with an enhanced chemiluminescent substrate (Super-signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Rockford, IL, USA). Quantification of protein expression was carried out using a CCD Camera System LAS 3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) and densitometry was performed by Image gauge v.4.0 software. For

the fibroblast Western blots, results were presented as a ratio to the expression of β -actin. To check for equal loading in A549 cells, results were expressed as a ratio of band density to total p44/42 MAPK (Erk1/2) since the levels of β -actin underwent changes after TGF- β 1 treatment (data not shown).

Immunofluorescence

Cells grown in 4-well CultureSlides[®] were fixed with cold 4% paraformaldehyde for 15 min and then permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 30 min. Once blocked with 1% bovine serum albumin-PBS for 1 h, primary antibodies against α -SMA (Sigma, 1:500) or COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, 1:500) were added for 1 h at 37°C. Secondary antibodies or Phalloidin-TRITC (Sigma) were also incubated for 1 h. Cells were counterstained with DAPI (1:10,000) and were mounted with Prolong[®] Gold antifade reagent (Invitrogen, Molecular Probes).

For double-staining experiments, COX-2 antibody and its corresponding secondary antibody were first incubated for 45 min each, and thereafter α -SMA and its secondary antibody were incubated for another 45 min each. This order was established empirically in a set of experiments and demonstrated very low cross-reactivity between antibodies. Phalloidin also showed no cross-reactivity with COX-2 primary and secondary antibodies and was incubated together with COX-2 secondary antibody. Epifluorescence microscopy (Leica Microsystems, Germany) was used to analyze preparations at $\times 200$ or $\times 400$ magnification. Positive cells for α -SMA and COX-2 were counted in 12 random fields.

Immunohistochemistry

Histological sections were obtained from paraffin-embedded biopsies of control ($n = 5$) and IPF patients ($n = 5$). Paraffin was removed and sections were heated at 80°C for 40 min in citrate buffer (0.01 M, pH 6) for the antigen retrieval process. Then, samples were blocked in PBS, 0.05% v/v Triton X-100, 3% goat serum (Sigma) for 30 min at room temperature. Primary antibodies against COX-2 (Santa Cruz Biotechnology) and α -SMA (Sigma) diluted 1:1000 in blocking solution were incubated overnight at 4°C. The next steps were performed using EnVision[™] Detection Systems Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse kit (Dako, Denmark), according to the manufacturer's instructions. Nuclei were contrasted with Gill I Hematoxylin for 1 min. Sections were mounted using Glycergel[®] Mounting Medium (Dako).

Analysis of DNA Replication (Click-iT[®])

A commercial kit was used, based on the incorporation of EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), a modified nucleoside that is incorporated during DNA synthesis (Click-iT[®], Invitrogen). After treatment, cells grown in 90-sq.-cm dishes were incubated with 10 μ M EdU for 2 h before being harvested them for flow cytometry measurements (Click-iT[®] EdU Alexa Fluor[®] 488 Flow Cytometry Assay Kit, Invitrogen). The next steps were performed in accordance with the manufacturer's instructions. The technique was validated with a set of experiments incubating cells with increasing concentrations of serum. Results were presented as percentage of cells incorporating the modified nucleoside EdU. Negative control was also measured to establish positive criteria.

Collagen Expression

Total RNA was isolated with the RNeasy mini kit (Qiagen, Mississauga, ON, CA) according to the instructions of the manufacturer. One μ g of RNA was reverse-transcribed into

cDNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcriptase kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Life Technologies, Wellesley, CA) using random primers, optimized RT Buffer, dNTP's and MultiScribe[™] MuLV reverse transcriptase. cDNA was subjected to amplification by real-time PCR (7900 HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems) using TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems) for collagen type I, alpha 1 (COL1A1; Assay Id: Hs00164004_m1) and RNA polymerase II, polypeptide A (RPII; Assay Id: Hs00172187_m1) as a constitutive endogenous gene. Data were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method and the results expressed as fold-change related to control samples at time 0 h.

Sircol Collagen Assay

Total soluble collagen in cell culture supernatants was quantified using the Sircol collagen assay (Biocolor, Belfast, UK). Briefly, 500 μ l of fibroblast culture supernatant were collected and concentrated overnight using the kit's concentration reagent. 1 ml of Sirius red dye was added and incubated with gentle rotation for 30 min at room temperature. After centrifugation at 12,000 g for 10 min, the collagen-dye pellet was washed with 750 μ L of cold Acid-Salt Wash Reagent and centrifuged again. The pellet was redissolved with 250 μ L of 0.5 M NaOH, and absorbance at 540 nm was measured by microplate ELISA reader. The results are presented as total μ g Collagen secreted/ μ g total protein content.

PGE₂ Assay

PGE₂ Assay was performed in cell culture medium using Prostaglandin E₂ EIA Kit (Cayman chemicals). Supernatants were filtered through 0.22 μ m filter (BD Biosciences) and stored at -80°C . The measurement was performed according to the manufacturer's instructions. Results are presented as total pg PGE₂ secreted/ μ g total protein content.

Statistical Data Analysis

All statistical analyses were performed with SPSS 14.0 (SPSS, Chicago, IL USA). Data are expressed as median and 25th to 75th percentile. Immunofluorescence cell count results are presented in tables as mean values \pm SD. The non-parametric statistical Mann-Whitney U-test was used for control and IPF group comparisons and the Wilcoxon test was used for paired comparisons. Parametric statistical analyses for A549 cells experiments were performed with ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison post hoc tests. Differences were considered to be significant if p -values were below 0.05.

Results

Expression of COX-2 and α -SMA in Control and IPF Fibroblasts

IPF cultures showed increased population of myofibroblasts (α -SMA positive cells) basally and reduced population of COX-2 positive cells in response to IL-1 β (10 ng/ml for 24 h) compared with control cells, as observed by immunofluorescence (Table 1). As described elsewhere [15,16], western blot showed a diminished induction of COX-2 expression in response to IL-1 β stimulation in IPF fibroblasts compared to control cells (Fig. S1). A significant decrease in α -SMA positive cells was found after 24 h of IL-1 β treatment in both groups. Interestingly, α -SMA positive cells showed little or no expression of COX-2 in response to IL-1 β (Table 1, Fig. 1). This finding demonstrates that spontaneous myofibroblasts present in culture are characterized by diminished COX-2 expression in response to IL-1 β .

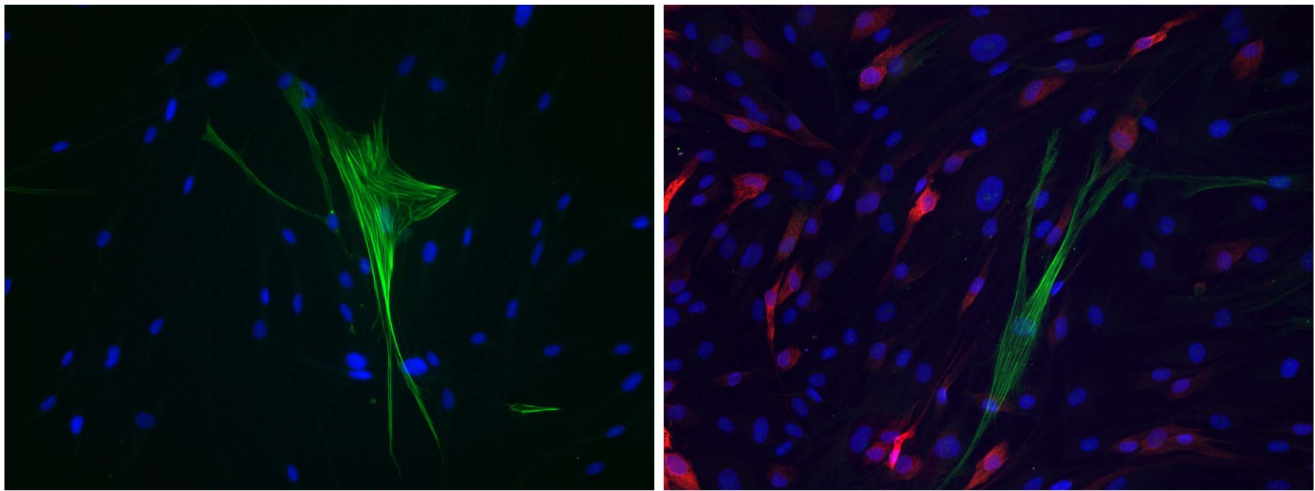


Figure 1. Co-immunofluorescence of COX-2 (red) and α -SMA (green) of a representative control fibroblast culture. In basal conditions (left), it shows no COX-2 expression and isolated α -SMA-positive cells, and after IL-1 β treatment for 24 h (right), it shows high COX-2 expression and a lack of COX-2 immunoreactivity in α -SMA-positive cells. Nuclei were stained with DAPI (blue). (Original magnification X200). doi:10.1371/journal.pone.0065445.g001

Induction of Fibroblast-myofibroblast Transition by TGF- β 1

In order to induce myofibroblasts in our cultures, we used TGF- β 1 (5 ng/ml). This treatment provoked a significant increase in myofibroblasts (α -SMA-positive cells) in a time-dependent manner, reaching statistically significant values at 24 and 72 h in both cultures (Fig. 2A). Interestingly, the TGF- β 1 treatment induced a similar amount of myofibroblasts in the control and IPF cell cultures at both points. Consequently, the differences between control and IPF in the number of myofibroblasts in non-treated cells were lost. Representative images of TGF- β 1 induction of FMT are presented (Fig. 2B).

In the control fibroblasts, TGF- β 1 stimulated COX-2 expression slightly at 4 h and more markedly at 24 h but no COX-2 expression was observed at 72 h. In IPF treated fibroblasts, no COX-2 expression was observed after TGF- β 1 treatment (Fig. 2C). Consequently, in control fibroblasts, we observed COX-2 expression at 4 h induced by TGF- β 1 without any statistical changes in the number of myofibroblasts and the opposite situation in long-term treatment with TGF- β 1 (72 h), which is characterized by a myofibroblast-enriched population with no

expression of COX-2. RT-PCR showed a marked up-regulation of collagen I α 1 synthesis in fibroblasts after TGF- β 1 treatment, a characteristic feature of the myofibroblast phenotype. This increase was significantly higher in IPF samples treated with TGF- β 1 compared to control treated samples (Fig. 2D).

We also performed Sircol assay in order to measure the secreted collagen in IPF and Control fibroblast cultures under the same experimental conditions. The results are presented as total μ g Collagen secreted/ μ g total protein content. Although the same pattern found in collagen mRNA expression was observed, no significant differences were found between control and IPF fibroblasts. (Control 0 h: 0.035 ± 0.02 ; IPF 0 h: 0.043 ± 0.01 ; Control 72 h: $0.078 \pm 0.02^*$; IPF 72 h: $0.084 \pm 0.03^*$; Control+TGF- β 1 72 h: $0.122 \pm 0.04^{*\dagger}$; IPF+TGF- β 1 72 h: $0.135 \pm 0.03^{**\dagger\dagger}$). (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. 0 h; $\dagger p < 0.05$ and $\dagger\dagger p < 0.01$ vs. 72 h without treatment). N = 6 each. We found Sircol analysis insufficiently sensitive to find these differences in our samples.

Myofibroblast Phenotype from FMT Results in Down-regulation of COX-2 Expression

We studied COX-2 and α -SMA expression in the myofibroblast-enriched cultures obtained as described in Figure 2. Both groups presented a marked increase in α -SMA expression when treated with TGF- β 1 (Fig. 3A). The TGF- β 1-treated cells showed a dramatic decrease in COX-2 expression in response to IL-1 β (Fig. 3A, B).

Consequently, an increase in α -SMA positive cells was associated with a decrease in COX-2 positive cells induced by IL-1 β (Fig. 3C). Cells positive for COX-2 were almost absent in the TGF- β 1-treated cultures. The cell counting of co-immunofluorescence is summarized in Table 2. As expected, an extremely low number of α -SMA positive cells were also positive for COX-2 after IL-1 β treatment.

COX-1 expression increased after TGF- β 1 treatment only in IPF fibroblasts (Fig. 3D), whereas it remained unmodified by IL-1 β in both groups (densitometry not shown).

Immunofluorescence revealed that cells positive for COX-2 presented a thin fibroblast-like shape and α -SMA negativity.

Table 1. Quantification of immunofluorescence of COX-2, α -SMA and COX-2+ α -SMA.

Treatment (24 h)	Determinations	Control Group	IPF Group
None	COX-2	ND	ND
	α -SMA	$2.8 \pm 1.6\%$	$9.4 \pm 3.7\%^{**}$
IL-1 β (10 ng/ml)	COX-2	$48.05 \pm 11.09\%$	$31.7 \pm 5.7\%^*$
	α -SMA	$1.6 \pm 2.7\% \dagger$	$5.1 \pm 2.8\% \dagger\dagger$
	COX-2 & α -SMA	$0.01 \pm 0.10\%$	$0.17 \pm 0.11\%$

Quantification of immunofluorescence of COX-2, α -SMA and COX-2+ α -SMA. Control and IPF fibroblasts were incubated for 24 h in the presence or absence of IL-1 β (10 ng/ml). Results are presented as mean \pm SD of the percentage of total cells. ND, not detected.

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to control group,

$\dagger p < 0.05$ compared to the respective untreated cells.

doi:10.1371/journal.pone.0065445.t001

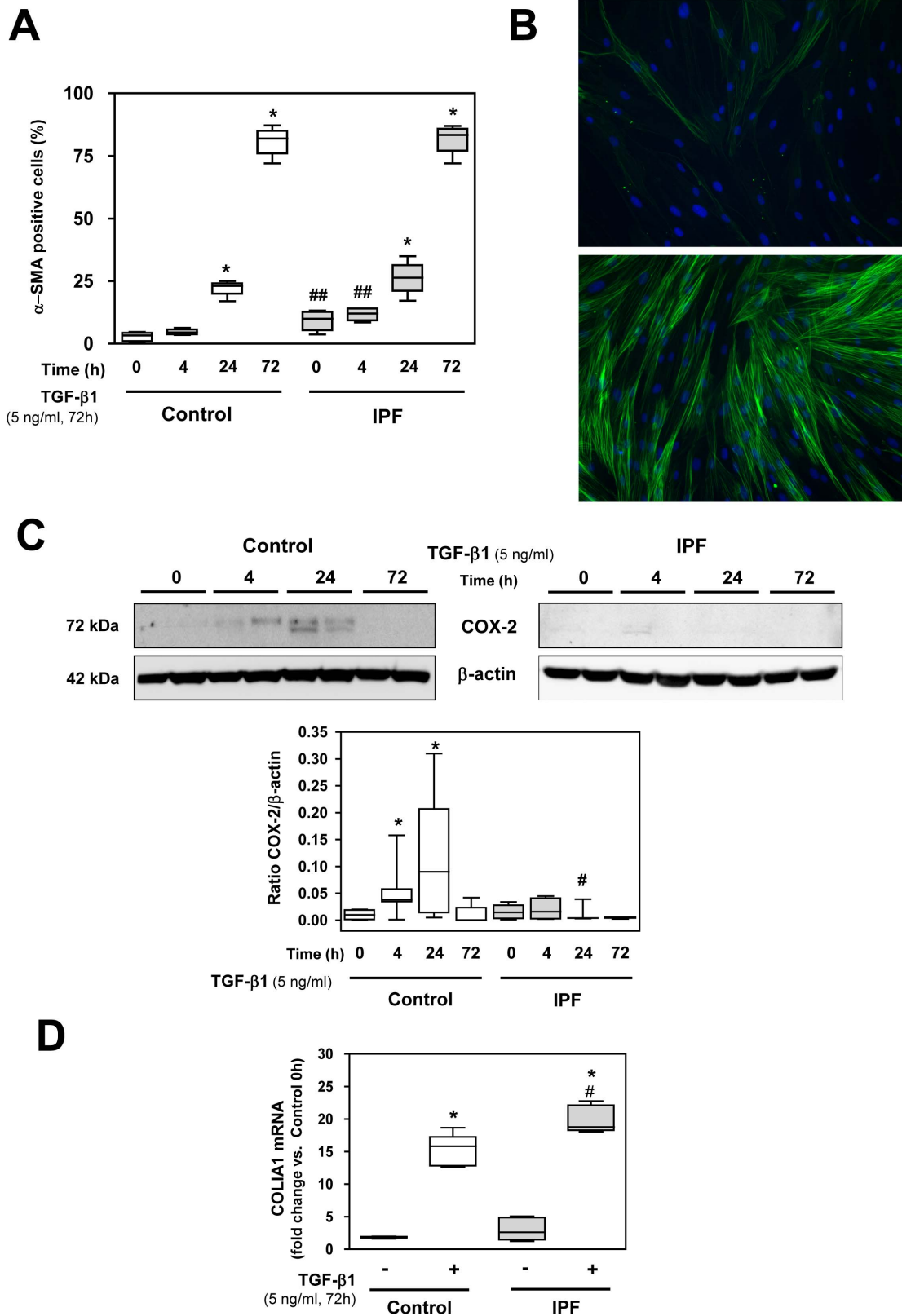


Figure 2. Induction of fibroblast-myofibroblast transition (FMT) in control and IPF fibroblasts by TGF-β1 incubation. (A) Quantification of α-SMA positive cells (myofibroblasts) by immunofluorescence. Results are presented as percentage of total cells. (B) Representative immunofluorescence showing the effect of 5 ng/ml TGF-β1 for 72 h in control fibroblasts. The expression of α-SMA is shown in green and the nuclei were stained with DAPI (blue) (Original magnification X200). (C) Representative Western blot of COX-2 and β-actin in two fibroblast cultures obtained from both control and IPF patients in response to TGF-β1 treatment at 4, 24 and 72 h. Densitometric analysis of COX-2 expressed as a ratio versus β-

actin is also shown. N=6 Control cells. N=4–6 IPF cells. (D) Collagen $\alpha 1$ mRNA measured by real-time PCR with or without TGF- $\beta 1$ treatment (5 ng/ml) for 72 h in control and IPF fibroblasts. * $P < 0.05$ compared to respective untreated cells, # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ compared to control group. doi:10.1371/journal.pone.0065445.g002

Consequently, myofibroblasts (α -SMA positive cells) showed no positive staining for COX-2 (Fig. 3E, Table 2).

Re-stimulation of myofibroblasts with TGF- $\beta 1$ for additional 4 and 24 h produced no COX-2 expression, as expected (Fig. S3).

Induction of Epithelial-mesenchymal Transition by TGF- $\beta 1$ Results in Down-regulation of COX-2 Expression

We studied EMT by treating A549 cells with TGF- $\beta 1$ (5 ng/ml, 72 h), as described above. Epithelial-specific marker E-cadherin dramatically decreased in treated A549 cells (Fig. 4A). Immunofluorescence using phalloidin (F-actin marker) showed a strong red staining in A549 cells incubated with TGF- $\beta 1$, revealing cytoskeleton remodeling and a morphological change into a myofibroblast-like phenotype (Fig. 4B). RT-PCR showed a marked up-regulation of collagen $\alpha 1$ synthesis in A549 cells after TGF- $\beta 1$ treatment (Fig. 4C). Weak expression of α -SMA and no expression of COX-1 in A549 were found, either basally or after stimulation with TGF- $\beta 1$ (results not shown).

Unlike fibroblasts, A549 cells expressed COX-2 in the absence of IL-1 β stimulation (Fig. 4D). Interestingly, TGF- $\beta 1$ treatment for 72 h decreased this basal COX-2 expression. We then observed an increase in COX-2 expression in response to IL-1 β (1 ng/ml), which was reduced in TGF- $\beta 1$ -treated cells (Fig. 4D). This inhibition can be clearly observed by immunofluorescence (Fig. 4E).

Myofibroblast Phenotype from FMT and EMT Implies a Decrease in PGE₂ Synthesis

We examined PGE₂ levels in culture supernatants of control, IPF fibroblasts (Fig. 5A) and A549 cells (Fig. 5B) treated with TGF- $\beta 1$. IL-1 β incubation increased PGE₂ secretion in fibroblasts and A549 cells. This effect was diminished in TGF- $\beta 1$ pretreated cells (Fig. 5A, B). The results correlated with COX-2 Western blot analysis and immunofluorescence. Therefore, a myofibroblast-like phenotype is associated with a notable decrease in PGE₂ secretion.

COX-2 Down-regulation of Myofibroblast-like Phenotype Alters Cell Proliferation

We studied the role of COX-2 and PGE₂ in myofibroblast-enriched culture proliferation by the Click-iT[®] technique. Fibroblasts and A549 cells were incubated with IL-1 β (10 ng/ml and 1 ng/ml respectively), PGE₂ (5 ng/ml) and the selective COX-2 inhibitor Celecoxib (10 μ M) for 24 h.

In fibroblast control cells, IL-1 β treatment provoked a significant decrease in proliferation (Fig. 6A). This decrease appears to be mediated by COX-2 since PGE₂ completely abrogated cell proliferation and the addition of Celecoxib reversed the IL-1 β effect. IPF fibroblasts presented a diminished proliferation compared with control fibroblasts, but similar effects were observed after incubation with IL-1 β , PGE₂ and Celecoxib. Moreover, TGF- $\beta 1$ treatment induced a decrease in control fibroblast proliferation but no differences were observed in IPF fibroblast cultures. Interestingly, the inhibitory effect on proliferation associated with IL-1 β exposure was annulled in TGF- $\beta 1$ treated cells (Fig. 6A).

In A549 cells, incubation with IL-1 β significantly reduced cell proliferation in both TGF- $\beta 1$ -treated and non-TGF- $\beta 1$ -treated cells (Fig. 6B). This effect seems to be independent of COX-2 and PGE₂ since Celecoxib was not able to restore control levels and

PGE₂ itself had no effect on cell proliferation. Furthermore, we observed that TGF- $\beta 1$ treatment significantly increased cell proliferation.

Myofibroblast Foci in IPF Lungs are Characterized by the Presence of α -SMA and Absence of COX-2

The localization of α -SMA and COX-2 was examined by immunohistochemistry in IPF and control lung tissue. Epithelial cells from control tissue were slightly stained for COX-2 (Fig. 7A) and staining of α -SMA was present in airway smooth muscle cells (Fig. 7B). Moreover, in IPF tissue α -SMA was strongly localized in fibroblast/myofibroblast foci (Black arrows, Fig. 7D). Interestingly, metaplastic epithelial cells presented strong COX-2 staining but fibroblast/myofibroblast foci showed no COX-2 expression (White arrows, Fig. 7C). Immuno-histochemical staining for α -SMA and COX-2 was negative in histological slides incubated without the primary antibody.

Discussion

IPF is characterized by increased expression of TGF- $\beta 1$, increased myofibroblast numbers and reduced production of PGE₂ resulting from a limited induction of COX-2. We postulated that the three findings are somehow related. Consequently, we hypothesized that myofibroblasts are characterized by an impaired COX-2 expression and reduced PGE₂ secretion.

We first confirmed previous studies reporting that IPF fibroblasts cultures are characterized by reduced COX-2 expression [15] but increased α -SMA [21,22] compared with control fibroblast cultures. Since COX-2 was not detected at baseline, stimulation with IL-1 β was performed. This first confirmation suggests that our cell lines behave as published by other groups. We must point out that the use of lung fibroblasts obtained from patients with spontaneous pneumothorax as surrogate of “normal” (control) lung has some limitations. Although histological analysis of control tissue was normal in our patients, previous studies have reported that fibroblasts obtained from surgical resections during pleurodesis for spontaneous pneumothorax, may proceed from areas with pathological abnormalities, including inflammatory and fibrotic reactions [23]. To the best of our knowledge, however, there are not other better options to obtain samples from healthy or minimally affected lung tissue.

We secondly analyzed the relationship between COX-2 expression and the myofibroblast phenotype using an immunofluorescence technique. Interestingly, myofibroblasts stained negative for COX-2 after IL-1 β stimulation, suggesting that the myofibroblast phenotype is characterized by a down-regulated COX-2 expression. Cells expressing COX-2 were thinner, smaller and sharper than myofibroblasts. IL-1 β treatment also decreased the number of myofibroblasts, thereby confirming this cytokine as a potent inhibitor of FMT, as has been described [12]. We could not find any morphological difference between fibroblasts expressing COX-2 and those not expressing it.

All in all, these findings suggest that myofibroblast transformation eventually results in the down-regulation of COX-2. The presence of more myofibroblast in fibroblast cultures and in the lung in IPF may account for the reported low induction of COX-2 in IPF tissues. However, the small difference between the percentages of myofibroblasts in IPF and control lung fibroblast cultures – together with the observation that COX-2-expressing

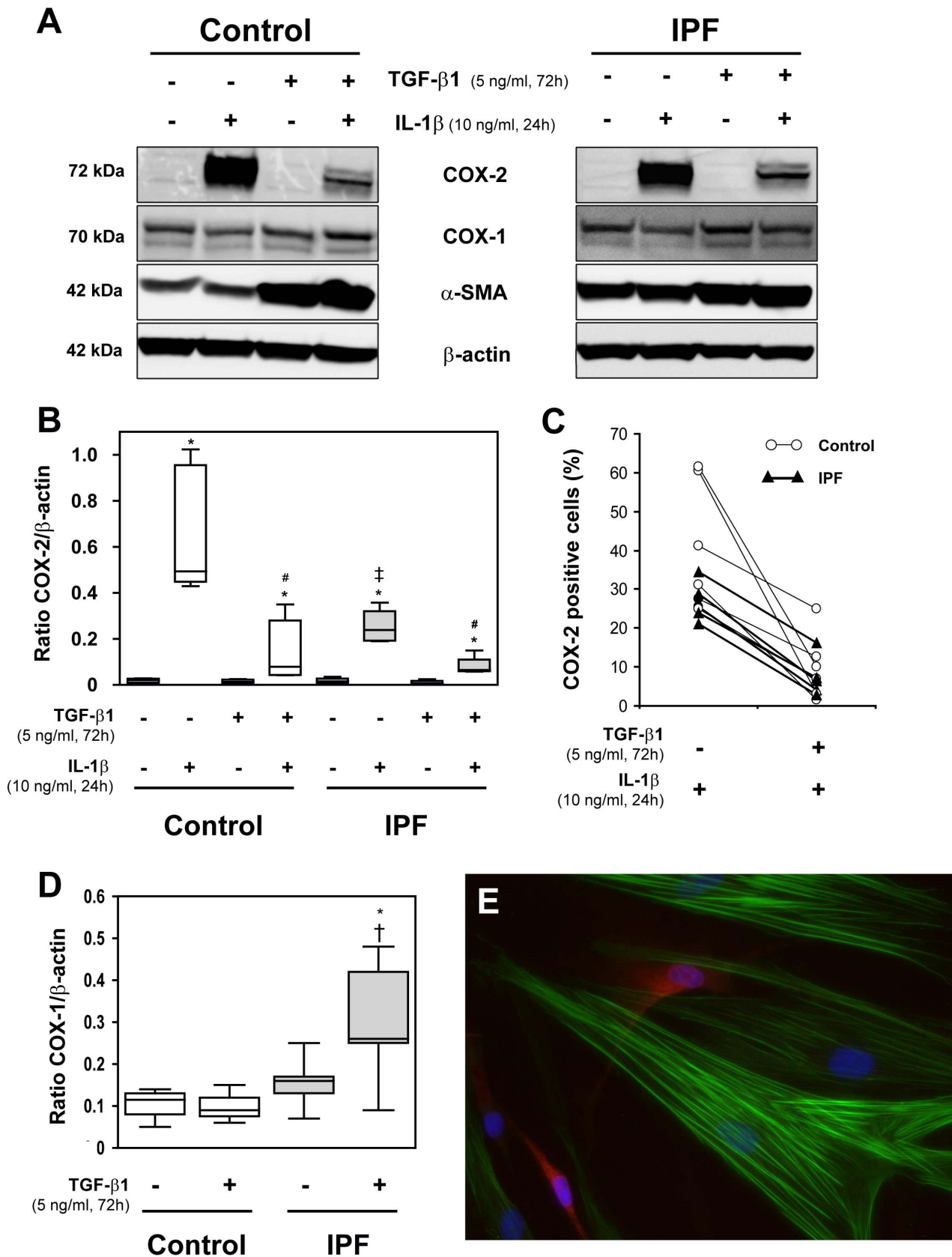


Figure 3. Effect of IL-1 β stimulation on a myofibroblast-enriched population. (A) Protein levels in control and IPF fibroblasts of COX-2, COX-1, α -SMA and β -actin at 72 h with or without TGF- β 1 treatment (5 ng/ml), and at subsequent 24 h in the presence or absence of IL-1 β (10 ng/ml), measured by Western blot. (B) Densitometric analysis of COX-2 expressed as a ratio versus β -actin. (C) Quantification of COX-2 positive cells by

immunofluorescence. Results are presented as percentage of total cells. (D) COX-1/ β -actin ratio at 72 h in the presence or absence of TGF- β 1 (5 ng/ml). * $P < 0.05$ compared to untreated cells, # $P < 0.05$ compared to IL-1 β treated cells, † $P < 0.05$ and ‡ $P < 0.01$ compared to control group in the same conditions. (E) Representative co-immunofluorescence image of COX-2 (red) and α -SMA (green) of a myofibroblast-enriched culture obtained from control fibroblasts stimulated with IL-1 β for 24 h. Nuclei were stained with DAPI (blue). Note that myofibroblasts do not express COX-2 in response to IL-1 β and the different shape of the COX-2 positive cells (Original magnification X400).
doi:10.1371/journal.pone.0065445.g003

fibroblasts were apparently indistinguishable from non-COX-2-expressing fibroblasts – suggests that the mechanisms involved in the down-regulation of COX-2 may also be present in IPF fibroblasts (α -SMA negative cells).

To gain insight into the relationship between myofibroblast phenotype and COX-2 regulation, the myofibroblast numbers were increased by inducing the transition of fibroblast into myofibroblast with TGF- β 1. As previously described, we observed that TGF- β 1 myofibroblast induction was time and dose-dependent [12] and was accompanied by a strong increase in collagen I α 1 expression [1], with greater expression of collagen I α 1 in IPF cultures than in control cultures. In contrast, the Sircol method was not sensitive enough to find any significant differences between control and IPF cells in our samples. The percentage of myofibroblasts markedly increased in cultures, to the same extent as in the IPF and control fibroblasts.

Previous reports have demonstrated that TGF- β 1 increases COX-2 expression and PGE₂ synthesis in fibroblasts over short periods (2–24 h) [24–26]. These reports agree with our results, since we observed increased COX-2 induced by TGF- β 1 at 4 and 24 h in control fibroblasts. The number of myofibroblasts remained low at those time points. At longer times (72 h), the high amount of myofibroblasts resulted in reduced COX-2 expression. Moreover, after we treated control cells with IL-1 β from that time point for additional 4 or 24 h, COX-2 expression was reduced dramatically. In contrast, we could not observe induction of COX-2 expression in IPF cultures after TGF- β 1 treatment, even after short periods. We performed experiments at 4 h with and without TGF- β 1 and with and without IL-1 β and we observed that, together, both treatments enhanced COX-2 expression, as described elsewhere (see Fig. S2) [27]. We cannot rule out therefore that FMT is characterized by an initial phase

with a slight up-regulation of COX-2. Another possibility is that incubation with TGF- β 1 produces an increase in COX-2 expression, independent of FMT. Future experiments (e.g. the use of other FMT inducers) would help us to clarify this matter and to accurately determine the stage at which myofibroblasts finally down-regulate COX-2.

Consequently, the number of cells expressing COX-2 after stimulation with IL-1 β after 72 h of TGF- β 1 decreases in parallel with the increase in the number of fibroblasts transformed into myofibroblasts. In addition, re-incubation with TGF- β 1 for an additional 4 and 24 h only induced COX-2 if the culture was not enriched with myofibroblasts (see Fig. S3), discarding a possible artifact of rapid expression/degradation of the enzyme. However, in those long-term studies, the level of COX-2 induction in response to IL-1 β was not as homogeneous as in short-term studies and variability was found, mainly in control cells and not related to technique employed. Interestingly, patients with the highest levels of COX-2 after IL-1 β stimulation in long-term studies showed the lowest numbers of α -SMA positive cells before IL-1 β treatment and vice versa. The origin of the variability in terms of α -SMA or in terms of COX-2 expression is unknown but both parameters are clearly related as we have shown. Since TGF- β 1 increases dramatically α -SMA positive cells in all cell lines studied, reduced COX-2 expression after TGF- β 1 treatment is consistent in all the patients studied.

With long-term studies we confirmed our previous observations linking down-regulation of COX-2 with the myofibroblast phenotype. We also investigated the secretion of PGE₂ in myofibroblast-enriched cultures. PGE₂ secretion induced by IL-1 β in TGF- β 1-treated fibroblasts was strongly reduced in both the control and IPF patients, as a result of the inhibition of COX-2 caused by long-term exposure to TGF- β 1.

Table 2. Quantification of immunofluorescence of COX-2, α -SMA and COX-2+ α -SMA.

Treatment		Determinations	Control Group	IPF Group	
None (72 h)	None (24 h)	COX-2	ND	ND	
		α -SMA	2.9 \pm 9%	9.2 \pm 2.9% **	
		IL-1 β (10 ng/ml, 24 h)	COX-2	41.2 \pm 16.3% †	26.7 \pm 5.2% *†
			α -SMA	1.7 \pm 2.5% †	6.05 \pm 4.1% *†
		COX-2 & α -SMA	0.02 \pm 0.07%	0.14 \pm 0.09%	
TGF- β 1 (5 ng/ml, 72 h)	None (24 h)	COX-2	ND	ND	
		α -SMA	82.3 \pm 5.3% ‡	79.9 \pm 8.9% ‡	
		IL-1 β (10 ng/ml, 24 h)	COX-2	9.9 \pm 8.5% ‡	7.4 \pm 5.3% ‡
			α -SMA	70.7 \pm 11.9% ‡§	72.4 \pm 11.04% ‡§
			COX-2 & α -SMA	0.4 \pm 0.5%	0.3 \pm 0.07%

Quantification of immunofluorescence of COX-2, α -SMA and COX-2+ α -SMA. Control and IPF fibroblasts were incubated for 72 h in the presence or absence of TGF- β 1, followed by further incubation in the absence or presence of IL-1 β (10 ng/ml) for 24 h. Results are presented as mean \pm SD of the percentage of total cells. ND, not detected.

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to control group in the same conditions,

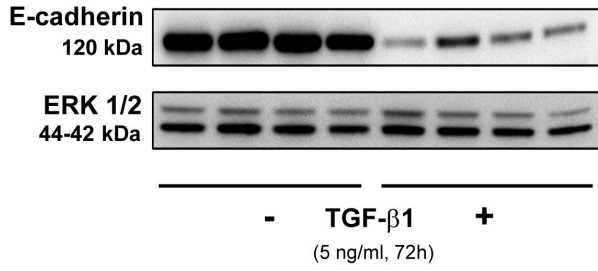
† $P < 0.05$ compared to the respective untreated cells,

‡ $P < 0.05$ compared to non-treated TGF- β 1 cells.

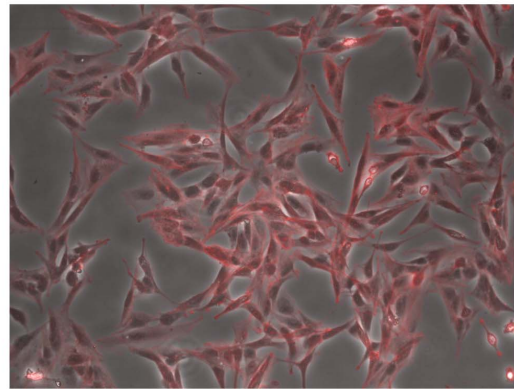
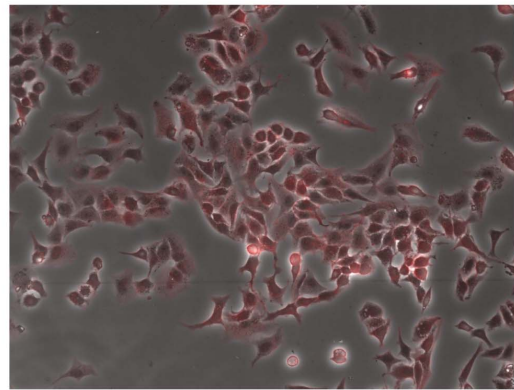
§ $P < 0.05$ compared to percentage of α -SMA in TGF- β 1 treated cells in the absence of IL-1 β .

doi:10.1371/journal.pone.0065445.t002

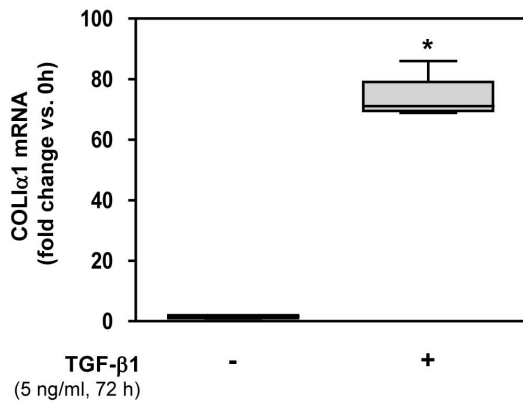
A



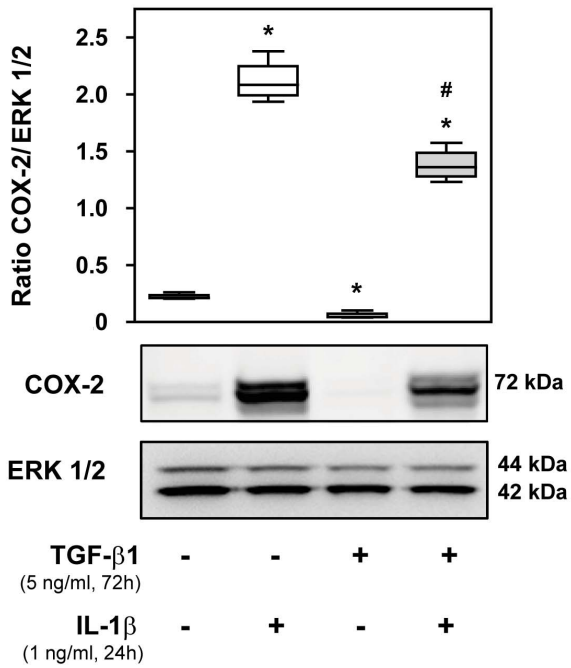
B



C



D



E

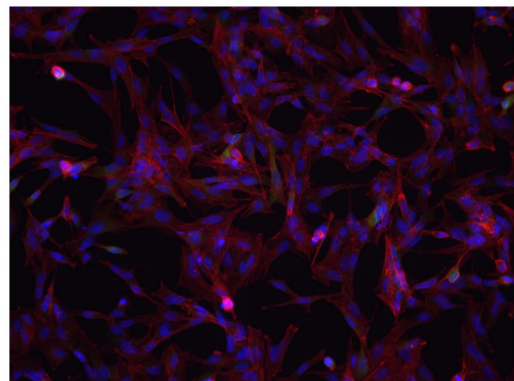
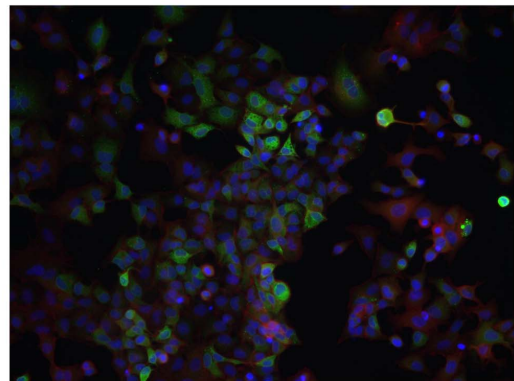


Figure 4. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in A549 cells by TGF- β 1 incubation and effect of IL-1 β in transformed cells. Effect of 5 ng/ml TGF- β 1 for 72 h in A549 cell culture. (A) Representative Western blot of four replicates of E-cadherin and ERK 1/2. (B) Representative immunofluorescence showing the expression of F-actin (stained with phalloidin, red) and bright field (Original magnification X400). (C) Collagen I α 1 mRNA measured by real-time PCR. Effect of IL-1 β for 24 h (1 ng/ml) in A549 cells after incubation with 5 ng/ml TGF- β 1 (72 h). (D) Representative Western blot and densitometric analysis of COX-2 expression versus ERK 1/2. * P <0.05 compared to untreated cells, # P <0.01 compared to IL-1 β -treated cells. (E) Immunofluorescence of COX-2 (green) and F-actin (stained with phalloidin, red) in cells cultured in absence (upper) or presence (lower) of TGF- β 1. In both images, cells were stimulated with IL-1 β (1 ng/ml). Nuclei were stained with DAPI (blue). Note the almost complete absence of COX-2 staining in TGF- β 1-treated cells (original magnification X400). doi:10.1371/journal.pone.0065445.g004

The incubation of TGF- β 1-treated cells with IL-1 β provoked a reduction in α -SMA positive cells, suggesting that IL-1 β not only inhibits myfibroblast cell transition but also promotes the disappearance of myfibroblasts in culture. Interestingly, COX-1 expression only increased significantly after TGF- β 1 treatment in fibroblasts obtained from IPF patients. Since the reduction of COX-2 in IPF fibroblast cultures is notable, we are tempted to

speculate that these cells may respond to TGF- β 1 treatment by increasing COX-1 expression to maintain basal COX metabolism.

We studied A549 cells, which are widely used as a model of EMT [28,29]. However, the tumour origin of the cell line limits the extrapolation of the results to primary epithelial pulmonary cells. These cells are useful for studying COX-2 expression since they do not express COX-1 and show high basal COX-2 expression [30]. In A549 cells, TGF- β 1 treatment decreased basal COX-2 expression and provoked a diminished COX-2 induction after IL-1 β stimulation. Accordingly, PGE₂ levels paralleled COX-2 expression. Therefore, the EMT process leading the myfibroblast-like phenotype could also contribute to the down-regulation of COX-2 and PGE₂ observed in IPF.

We also examined the interrelationship between TGF- β 1, IL-1 β , COX-2 and PGE₂ in proliferation once the cells were transformed into myfibroblasts. Interestingly, treatment with IL-1 β decreased proliferation in control fibroblasts. This effect may be mediated by COX-2 activation, since the selective COX-2 inhibitor Celecoxib completely restored cell proliferation. In contrast, the anti-proliferative effect of IL-1 β was lost in myfibroblasts from both the control and the IPF patients. The lack of any effect of IL-1 β on myfibroblasts appears to be the result of impaired COX-2 induction. Consequently, the exogenous addition of the COX-2 metabolite PGE₂ decreased cell proliferation not only in fibroblasts but also in myfibroblasts. Our findings agree with reports of the anti-proliferative effects of PGE₂ in various cell types [9].

The incubation of A549 cells with TGF- β 1 may inhibit epithelial cell proliferation [31]. We studied the proliferation of A549s after their transformation into myfibroblast-like phenotype by TGF- β 1 treatment. In these conditions, we found increased cell proliferation in cells treated with TGF- β 1 compared to untreated cells. The treatment of A549 cells with IL-1 β provoked a remarkable decrease in proliferation compared with untreated cells. This effect does not seem to be mediated by COX-2 and PGE₂, since the COX-2 inhibitor Celecoxib did not restore proliferation and PGE₂ treatment had no inhibitory effect on cell proliferation. Our results suggest that PGE₂ may modulate cell proliferation specifically in FMT but not in EMT, and they point to PGE₂ as a potential therapeutic treatment for IPF, largely on account of its targeting of myfibroblasts. A recent report has demonstrated that PGE₂ deficiency in IPF results in increased alveolar epithelial cell apoptosis and reduced sensitivity of fibroblasts to apoptosis [17]. Consequently, PGE₂ may also regulate apoptosis differentially in fibroblasts and epithelial cells.

We also studied histological slides of control and IPF human lungs. In line with previous reports [32], we observed a slight basal COX-2 expression in epithelial cells and α -SMA staining in airway smooth muscle cells from control lungs. Little or no COX-2 staining was observed, however, in the fibroblast and myfibroblast foci of IPF patients. Moreover, we observed, in keeping with Lappi-Blanco [33], increased COX-2 staining in epithelial metaplastic tissue in IPF. Therefore, cells that maintain the epithelial phenotype have high COX-2 expression while fibroblast/myfibroblast areas do not express the enzyme. Clearly, our

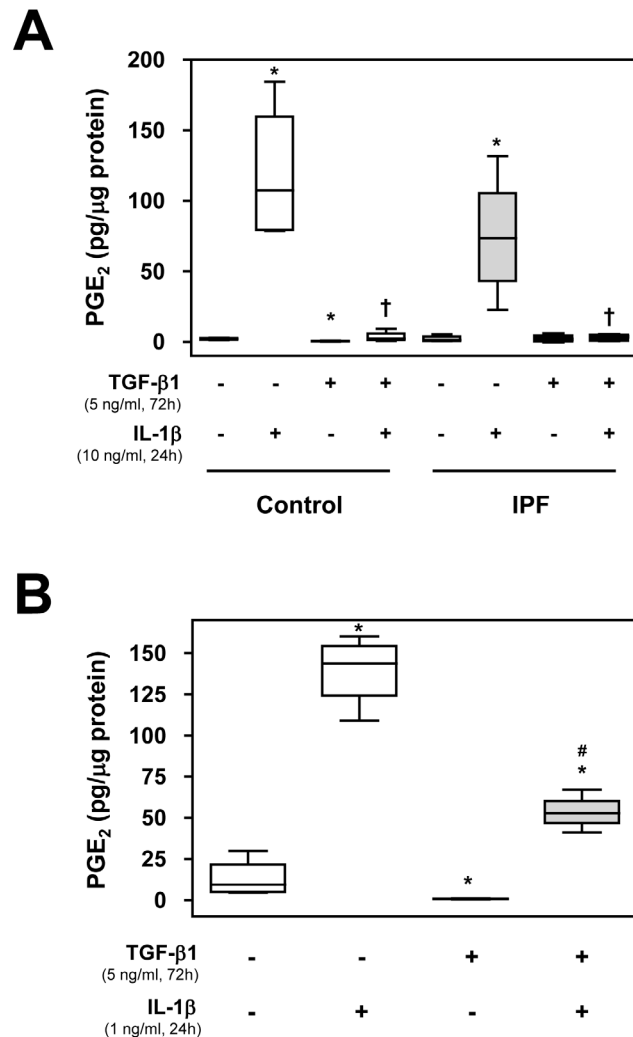


Figure 5. Measurement of PGE₂ secretion after FMT or EMT induction. Control and IPF fibroblasts (A) and A549 cells (B) were incubated for 72 h in the presence or absence of TGF- β 1 (5 ng/ml), followed by treatment in the presence or absence of IL-1 β (10 ng/ml or 1 ng/ml, respectively) for 24 h. Supernatant was then collected and total PGE₂ was measured using Prostaglandin E₂ EIA Kit (Cayman). Results are expressed as PGE₂ secreted/ μ g total protein content. * P <0.05 compared to untreated cells, † P <0.05 and # P <0.01 compared to IL-1 β -treated cells. doi:10.1371/journal.pone.0065445.g005

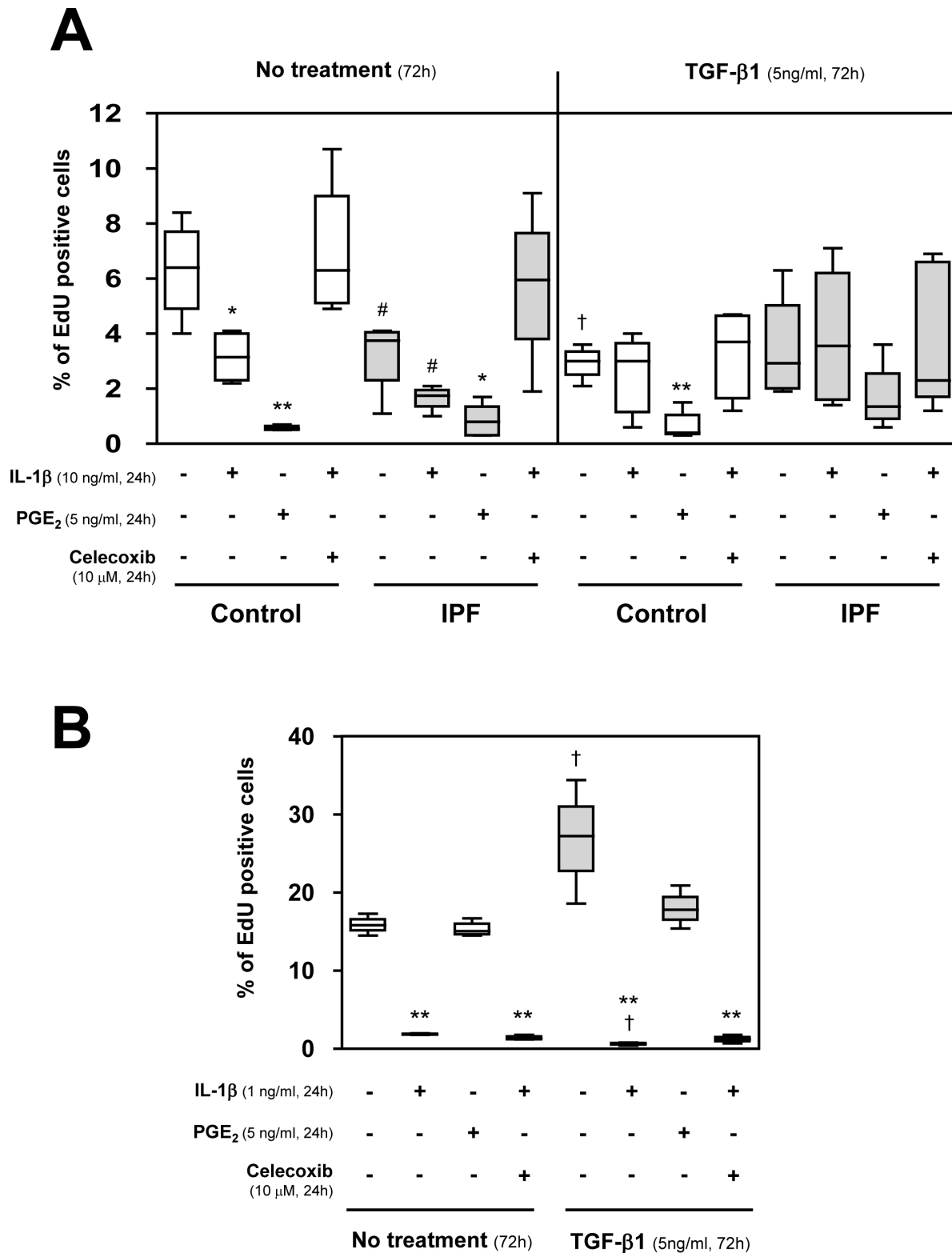


Figure 6. Cell proliferation measured by the analysis of DNA replication. For this purpose, control and IPF fibroblasts (A) and A549 cells (B) were incubated for 72 h in the presence or absence of TGF- β 1 (5 ng/ml), followed by treatment in the presence or absence of IL-1 β (10 ng/ml or 1 ng/ml, respectively), PGE₂ (5 ng/ml) and the selective COX-2 inhibitor Celecoxib (10 μ M). Cell proliferation was then analyzed by measuring the incorporation of the modified nucleoside EdU into the DNA using the Click-iT[®] commercial kit. Cells were incubated with 10 μ M EdU for 2 h before being harvested for flow cytometry measurements. Results are expressed as the percentage of EdU positive cells. * P <0.05 and ** P <0.01 compared to respective untreated cells, # P <0.05 compared to control group in the same conditions, † P <0.05 compared to non-treated TGF- β 1 cells in the same conditions.

doi:10.1371/journal.pone.0065445.g006

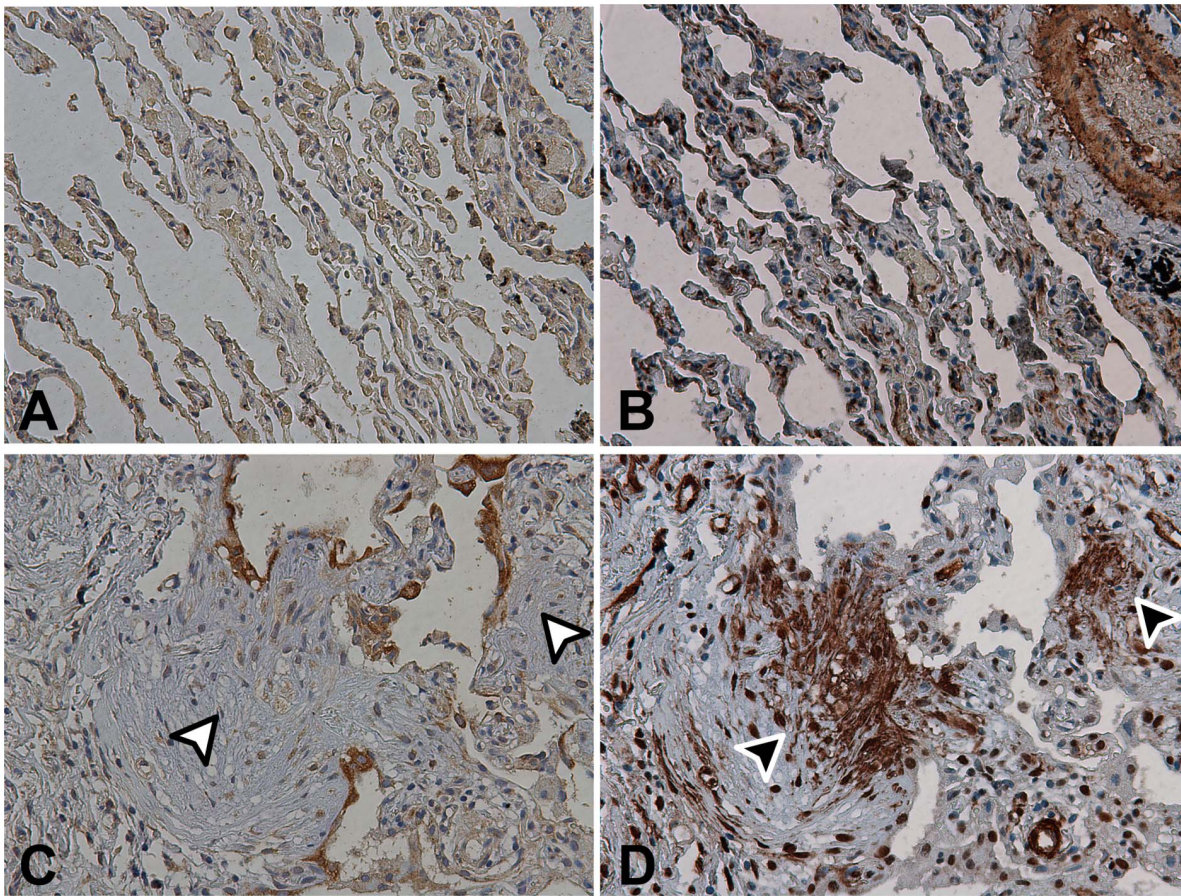


Figure 7. Immunohistochemical detection of COX-2 and α -SMA in healthy lung tissue (A–B) and in idiopathic pulmonary fibrosis tissue (C–D). Immunolocalizations of COX-2 (A–C) and α -SMA (B–D) are shown. The image shows slight basal expression of COX-2 and isolated α -SMA staining related to α -SMA-positive cells in control tissue. In contrast, increased α -SMA staining (black arrows) and absence of COX-2 expression (white arrows) are observed in fibroblastic foci. Metaplastic epithelium presents widespread expression of COX-2 (Original magnification X200). doi:10.1371/journal.pone.0065445.g007

model of A549 cells does not mirror metaplastic epithelial cells as the latter present diminished COX-2 expression after treatment with TGF- β 1. They may represent cells undergoing EMT in the fibrotic foci, or elsewhere in the interstitial space.

The mechanisms of COX-2 inhibition in the myofibroblast phenotype remain unknown. Recent findings suggest that defective histone acetylation in the COX-2 promoter may be responsible for the diminished COX-2 gene transcription observed in IPF fibroblasts [34]. Since PGE₂ has shown potent anti-fibrotic properties in several studies [9–13], the effect of an altered secretion of PGE₂ could easily be linked to the development of fibrotic processes. Further studies are needed to clarify whether the abrogation of COX-2 in the myofibroblasts of IPF is irreversible.

Conclusions

The myofibroblast phenotype is associated with a down-regulation of COX-2 and, consequently, a reduced production of its main metabolite PGE₂. These events could be crucial in IPF development and progression. Finally, our results suggest that targeting COX-2 and/or PGE₂ could be a potential therapy for IPF.

Supporting Information

Figure S1 Expression of COX-2, COX-1 and α -SMA in control (n = 5) and IPF (n = 5) fibroblasts basally and induced by IL-1 β (10 ng/ml) for 4 and 24 h. (A) Representative image of a Western blot and (B) densitometric analysis of COX-2 expressed as ratio versus β -actin expression. *P<0.05 compared to respective untreated cells, #P<0.05 compared to control group in same conditions. (TIF)

Figure S2 Protein levels of COX-2, COX-1, α -SMA and β -actin in control and IPF fibroblasts stimulated for 4 h. Cells were incubated in the presence or absence of IL-1 β (10 ng/ml) and/or TGF- β 1 (5 ng/ml) for 4 h. (A) Representative image of a Western blot. (B) Densitometric analysis of COX-2 expressed as ratio versus β -actin expression. * P<0.05 compared to respective untreated cells, † P<0.05 compared to IL-1 β treated cells in the same group. (TIF)

Figure S3 Absence of COX-2 expression in control cells stimulated for 72 h with TGF- β 1 and further incubation for 4 or 24 h with renewed TGF- β 1. Cells were incubated in the presence or absence of TGF- β 1 (5 ng/ml) for 72 h and for

additional 4 or 24 h of fresh TGF- β 1 (5 ng/ml). Representative Western blot of a control fibroblast culture. (TIF)

Acknowledgments

We want to thank the IDIBAPS Cytometry Platform and Serveis Científicotècnics, Universitat de Barcelona.

References

- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, et al. (2007) The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 170: 1807–1816.
- Willis BC, duBois RM, Borok Z (2006) Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc* 3: 377–382.
- Broeckelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA (1991) Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6642–6646.
- Uhal BD, Kim JK, Li X, Molina-Molina M (2007) Angiotensin-TGF-beta 1 crosstalk in human idiopathic pulmonary fibrosis: autocrine mechanisms in myofibroblasts and macrophages. *Curr Pharm Des* 13: 1247–1256.
- Brock TG, McNish RW, Peters-Golden M (1999) Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. *J Biol Chem* 274: 11660–11666.
- Bonner JC, Rice AB, Ingram JL, Moomaw CR, Nyska A, et al. (2002) Susceptibility of cyclooxygenase-2-deficient mice to pulmonary fibrogenesis. *Am J Pathol* 161: 459–470.
- Hodges RJ, Jenkins RG, Wheeler-Jones CP, Copeman DM, Bottoms SE, et al. (2004) Severity of lung injury in cyclooxygenase-2-deficient mice is dependent on reduced prostaglandin E(2) production. *Am J Pathol* 165: 1663–1676.
- Horowitz JC, Peters-Golden M (2010) Prostaglandin E2's new trick: "decider" of differential alveolar cell life and death. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 2–3.
- Elias JA, Rossman MD, Zurier RB, Daniele RP (1985) Human alveolar macrophage inhibition of lung fibroblast growth. A prostaglandin-dependent process. *Am Rev Respir Dis* 131: 94–99.
- Saltzman LE, Moss J, Berg RA, Hom B, Crystal RG (1982) Modulation of collagen production by fibroblasts. Effects of chronic exposure to agonists that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem J* 204: 25–30.
- Kohyama T, Ertl RF, Valenti V, Spurzem J, Kawamoto M, et al. (2001) Prostaglandin E2 inhibits fibroblast chemotaxis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L1257–1263.
- Kolodnick JE, Peters-Golden M, Larios J, Toews GB, Thannickal VJ, et al. (2003) Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoicd receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29: 537–544.
- Huang SK, White ES, Wetlaufer SH, Grifka H, Hogaboam CM, et al. (2009) Prostaglandin E(2) induces fibroblast apoptosis by modulating multiple survival pathways. *FASEB J* 23: 4317–4326.
- Borok Z, Gillissen A, Buhl R, Hoyt RF, Hubbard RC, et al. (1991) Augmentation of functional prostaglandin E levels on the respiratory epithelial surface by aerosol administration of prostaglandin E. *Am Rev Respir Dis* 144: 1080–1084.
- Wilborn J, Crofford LJ, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM, et al. (1995) Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 95: 1861–1868.
- Xaubet A, Roca-Ferrer J, Pujols L, Ramirez J, Mulla J, et al. (2004) Cyclooxygenase-2 is up-regulated in lung parenchyma of chronic obstructive pulmonary disease and down-regulated in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 21: 35–42.
- Maher TM, Evans IC, Bottoms SE, Mercer PF, Thorley AJ, et al. (2010) Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 73–82.
- American Thoracic Society. (2000) Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* 161: 646–664.
- Roca-Ferrer J, Garcia-Garcia FJ, Pereda J, Perez-Gonzalez M, Pujols L, et al. (2011) Reduced expression of COXs and production of prostaglandin E(2) in patients with nasal polyps with or without aspirin-intolerant asthma. *J Allergy Clin Immunol* 128: 66–72.
- Ling H, Jia X, Zhang Y, Gapter LA, Lim YS, et al. (2010) Pachymic Acid Inhibits Cell Growth and Modulates Arachidonic Acid Metabolism in Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells. *Mol Carcinog* 49: 271–82.
- Kuhn C, McDonald JA (1991): The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol* 138: 1257–1265.
- Ramos C, Montano M, Garcia-Alvarez J, Ruiz V, Uhal BD, et al. (2001) 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* 24: 591–598.
- Fang HY, Lin CY, Chow KC, Huang HC, Ko WJ (2010) Microarray detection of gene overexpression in primary spontaneous pneumothorax. *Exp Lung Res*;36: 323–330.
- McAnulty RJ, Chambers RC, Laurent GJ (1995) Regulation of fibroblast procollagen production. Transforming growth factor-beta 1 induces prostaglandin E2 but not procollagen synthesis via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *Biochem J* 307: 63–68.
- Keerthisingam CB, Jenkins RG, Harrison NK, Hernandez-Rodriguez NA, Booth H, et al. (2001) Cyclooxygenase-2 deficiency results in a loss of the anti-proliferative response to transforming growth factor-beta in human fibrotic lung fibroblasts and promotes bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol* 158: 1411–22.
- Matsumura T, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Munemasa Y, et al. (2009) Regulation of transforming growth factor-beta-dependent cyclooxygenase-2 expression in fibroblasts. *J Biol Chem* 18; 284: 35861–71.
- Diaz A, Chepenik KP, Korn JH, Reginato AM, Jimenez SA (1998) Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α and transforming growth factor- β 1 in human lung fibroblasts. *Exp Cell Res* 241: 222–229.
- Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z (2005) TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res* 6: 56.
- Ramos C, Becerril C, Montano M, Garcia-De-Alba C, Ramirez R, et al. (2010) FGF-1 reverses epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 through MAPK/ERK kinase pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299: L222–231.
- Mitchell JA, Belvisi MG, Akarasereonont P, Robbins RA, Kwon OJ, et al. (1994) Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br J Pharmacol* 113: 1008–1014.
- Anscher MS (2010) Targeting the TGF-beta1 pathway to prevent normal tissue injury after cancer therapy. *Oncologist* 15: 350–359.
- Singh SR, Hall IP (2008) Airway myofibroblasts and their relationship with airway myocytes and fibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 5: 127–132.
- Lappi-Blanco E, Kaarteenaho-Wiik R, Maasilta PK, Anttila S, Paakko P, et al. (2006) COX-2 is widely expressed in metaplastic epithelium in pulmonary fibrous disorders. *Am J Clin Pathol* 126: 717–724.
- Coward WR, Watts K, Feghali-Bostwick CA, Knox A, Pang L (2009) Defective histone acetylation is responsible for the diminished expression of cyclooxygenase 2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Mol Cell Biol* 29: 4325–4339.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MG MMM CP AX JP. Performed the experiments: MG DR JP. Analyzed the data: MG CP AX JP. Contributed reagents/materials/analysis tools: MG DR JR-F LP. Wrote the paper: MG JP. Revision of the manuscript: MMM JR-F LP CP AX.