



11282
3
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTO DEL SURFACTANTE PULMONAR SOBRE
LA TASA DE CRECIMIENTO CELULAR, APOPTOSIS
Y EXPRESIÓN GÉNICA DE COLÁGENA, COLAGENASA
Y TIMP-1 EN FIBROBLASTOS DERIVADOS
DE PULMÓN HUMANO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

M. en C. LUIS GUILLERMO VÁZQUEZ DE LARA CISNEROS

ASESOR DE TESIS:
DR. MOISÉS SELMAN LAMA

MÉXICO, D.F.

2000
283192



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi Padre.
In Memoriam

A Laura, Ileri, Fernando y Luis.

A mis maestros:
Dr. Moisés Selman y Dra. Annie Pardo.

EFFECTO DEL SURFACTANTE PULMONAR SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO CELULAR, APOPTOSIS Y EXPRESIÓN GÉNICA DE COLAGENA, COLAGENASA Y TIMP-1 EN FIBROBLASTOS DERIVADOS DE PULMÓN HUMANO.

RESUMEN

La migración de fibroblastos hacia los espacios alveolares, es un evento que ocurre habitualmente después de un daño pulmonar; en estas condiciones, los fibroblastos quedan expuestos al surfactante. Se examinó el efecto de Survanta y las apoproteínas del surfactante SP-A y SP-D sobre la tasa de crecimiento celular y apoptosis, y sobre la expresión de proalfa1(I) colágena, colagenasa-1 y TIMP-1.

Material y Métodos. Se expusieron cultivos de fibroblastos normales de pulmón humano a 100, 500 y 1000 microg/ml de Survanta; 10, 50 y 100 microg/ml de SP-A, 500 mg/ml de Survanta mas 50 microg/ml de SP-A o 3 microg/ml de SP-D. La tasa de crecimiento celular se evaluó utilizando un ensayo, la apoptosis mediante tinción nuclear, marcado distal de DNA y ELISA. La expresión de proalfa1(I) colágena, colagenasa-1 y TIMP-1 mediante Northern blot.

Resultados. Survanta indujo la apoptosis en los fibroblastos, aumentó la expresión de colagenasa-1 y disminuyó aproximadamente 10 veces la expresión de proalfa1(I) colágena afectando la estabilidad del mRNA. La SP-A aumentó aproximadamente en un 80% la expresión de colagenasa-1, sin ningún efecto apreciable sobre la expresión de colagenasa-1, TIMP-1 o la tasa de crecimiento celular. La SP-D aumentó considerablemente la expresión de proalfa1(I) colágena, sin efecto aparente sobre colagenasa-1. Cuando los fibroblastos se expusieron simultaneamente a Survanta y SP-A, los efectos de Survanta se disminuyeron.

Conclusiones. La fracción lípida del surfactante indujo la apoptosis de fibroblastos, e indujo un fenotipo profibrosante. La SP-A atenuó estos efectos.

SURFACTANT EFFECTS ON HUMAN LUNG FIBROBLASTS GROWTH RATE, APOPTOSIS AND COLLAGEN, COLLAGENASE AND TIMP-1 GENE EXPRESSION

Abstract

Fibroblast migration into alveolar spaces is a common event following lung injury, and under these conditions, fibroblasts can be exposed to pulmonary surfactant. We examined the effect of Survanta and surfactant protein A (SP-A) on fibroblast growth and apoptosis, and on α -1 type I collagen, collagenase-1 and TIMP-1 expression. Lung fibroblasts were exposed to 100, 500 and 1000 microg/ml of Survanta, or to 10, 50 and 100 microg/ml of SP-A, or 500 microg/ml Survanta plus 50 microg/ml SP-A. Growth rate was evaluated by a formazan-based chromogenic assay, apoptosis by nuclear staining, DNA-end labeling, and ELISA, and collagen, collagenase-1 and TIMP-1 expression by Northern blot. Survanta provoked fibroblast apoptosis, induced collagenase-1 expression and decreased ~10-fold type I collagen mRNA affecting mRNA stability as assessed using actinomycin D. SP-A increased ~80% collagen expression, and displayed no effect on collagenase-1, TIMP-1 or growth rate. When fibroblasts were exposed simultaneously to Survanta and SP-A, the effects of Survanta were partially reversed. These findings suggest that surfactant lipids may protect against intraluminal fibrogenesis by inducing fibroblast apoptosis, decreasing collagen and increasing collagenase-1 expression.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
RESUMEN.....	viii
1 ANTECEDENTES.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 EL SURFACTANTE PULMONAR.....	2
1.2.1 DEFINICIÓN:.....	2
1.2.2 PERSPECTIVA HISTÓRICA:.....	3
1.2.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL SURFACTANTE PULMONAR.....	4
1.2.4 METABOLISMO DE LA SUSTANCIA TENSOACTIVA PULMONAR.....	6
1.2.5 EL SURFACTANTE PULMONAR COMO REGULADOR DE LA ACTIVIDAD CELULAR.....	7
1.3 ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LAS ENFERMEDADES FIBROSANTES DEL PULMÓN.....	8
1.3.1 DEFINICIÓN.....	8
1.3.2 PATOGENIA DE LA RESPUESTA FIBROSANTE.....	9
1.3.3 FIBROSIS INTERSTICIAL VERSUS FIBROSIS INTRAALVEOLAR.....	10
1.4 LAS COLÁGENAS.....	11
1.4.1 GENERALIDADES SOBRE LA FAMILIA DE LAS COLÁGENAS.....	11
1.4.2 LA COLÁGENA TIPO I.....	12
1.5 LA FAMILIA DE LAS METALOPROTEINASAS DE MATRIZ.....	13
1.6 EL FENÓMENO DE APOPTOSIS.....	14
1.6.1 DEFINICIÓN.....	14
1.6.2 PERSPECTIVA HISTÓRICA.....	14
1.6.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE LA APOPTOSIS.....	15
1.7 PAPEL DEL SURFACTANTE EN LA FIBROSIS PULMONAR.....	16
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4 MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
4.1 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS.....	20
4.2 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN LÍPIDA DEL SURFACTANTE.....	20
4.3 OBTENCIÓN DE LA SP-A Y LA SP-D.....	20
4.4 EVALUACIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO CELULAR.....	21
4.5 EXPRESIÓN DE LOS mRNAs DE COLÁGENA α 1(I), MMP-1 Y TIMP-1.....	22
4.6 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD APOPTÓTICA.....	22
4.7 AISLAMIENTO DE RNA TOTAL Y ANÁLISIS DE NORTHERN BLOT.....	23
4.8 SONDAS DE DNA COMPLEMENTARIO.....	24
4.9 EVALUACION DE LA ESTABILIDAD DE RNAm DE COLAGENA TIPO I.....	24
5 RESULTADOS.....	26
5.1 EFECTO DEL SURFACTANTE PULMONAR, SP-A Y SP-D SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO CELULAR.....	26

5.2 EFECTO DE SURVANTA Y SP-A SOBRE LA APOPTOSIS DE FIBROBLASTOS.....	27
5.3 EFECTO DEL SURVANTA Y LA SP-A SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE PRO COLÁGENA α 1(I).....	28
5.4 EFECTO DEL SURVANTA Y LA SP-A SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MMP-1 Y TIMP-1.....	29
5.5 EFECTO DE LA SP-D SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS mRNAs DE PRO α 1(I) COLÁGENA Y MMP-1.....	29
6 DISCUSIÓN.....	44
7 CONCLUSIONES.....	51
8 BIBLIOGRAFÍA.....	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Pag.
Figura 1.- Efecto de Survanta sobre la tasa de crecimiento de cultivos de fibroblastos en medio con SFB al 1%.	31
Figura 2.- Efecto de SP-A y SP-D sobre la tasa de crecimiento de cultivos de fibroblastos en medio con SFB al 1%.	32
Figura 3.- Efecto de Survanta sobre la tasa de crecimiento de cultivos de fibroblastos en medio sin suero.	33
Figura 4.- Efecto de la SP-A sobre la tasa de crecimiento de cultivos de fibroblastos en medio sin suero.	34
Figura 5.- Efecto de Survanta y la SP-A sobre la tasa de crecimiento de cultivos de fibroblastos en medio sin suero.	35
Figura 6.- Tinción nuclear con bromuro de etidio.	36
Figura 7.- Marcado distal de DNA (DNA end-labeling) mediante TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling).	37
Figura 8.- Ensayo de ELISA para fragmentación de DNA en fibroblastos normales de pulmón humano.	38
Figura 9.- Efecto de Survanta, SP-A y Survanta mas SP-A sobre la expresión génica de pro α 1(I) colágena, MMP-1 y TIMP-1.	39
Figura 10.- Densitometría de la autorradiografía del Northern blot de la figura 9 para el transcrito de pro α 1(I) colágena.	40
Figura 11.- Efecto de Survanta sobre la estabilidad del mRNA de pro α 1(1) colágena.	41
Figura 12.- Densitometría de la autorradiografía del Northern blot de la figura 9 para el transcrito de MMP-1.	42
Figura 13.- Efecto de la SP-D sobre la expresión génica de pro α 1(I) colágena y MMP-1.	43

LISTA DE ABREVIATURAS.

BrdU	5'-bromo-2'-desoxiuridina
cDNA	DNA complementario
dCTP	desoxicitidin trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
IFN	Interferón
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MT-MMP	Metaloproteinasas de membrana
NID	Neuropatías intersticiales difusas
PAF	Factor activador de plaquetas
PE	fosfatidiletanolamina
PG	fosfatidilglicerol
PI	fosfatidilinositol
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal de bovino
SIRPA	Síndrome de insuficiencia respiratoria progresiva del adulto
SP	Surfactante pulmonar
TGF	Factor de crecimiento transformante
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasas
TNF	factor de necrosis tumoral

AGRADECIMIENTOS.

A mis maestros: Dr. Moisés Selman y Dra. Annie Pardo (sin adjetivos, porque se que no les gustan).

A los miembros del laboratorio de Bioquímica de la unidad de investigación del INER: Dr. Carlos Ramos A., M.C. Marta Montañó y M.C. Carina Becerril, por su invaluable ayuda en el desarrollo de la tesis y por haberme aceptado como su compañero de trabajo.

Al Dr. David. S. Phelps, por su desinteresada ayuda en los experimentos con SP-A.

Al Dr. Jorge Meléndez y a la Dra. Vilma Maldonado, por su ayuda en los experimentos de apoptosis.

Al CONACyT, por la beca otorgada para efectuar el doctorado.

A los miembros del jurado: Dr. Ruy Pérez Tamayo, Dra. Teresa Fortoul Van der Goes, Dr. Pedro Reyes, Dra. Alessandra Carnevale y Dr. Julio Granados, por el tiempo invertido en la revisión del manuscrito.

A mi amigo el profesor Eduardo Castañon Chavarría, por el apoyo moral que a contratiempo y síncopa me dispensó en los momentos aciagos de la fase experimental.

RESUMEN

Introducción. La migración de fibroblastos hacia los espacios alveolares, ocurre habitualmente después de un daño pulmonar; en estas condiciones, los fibroblastos quedan expuestos al surfactante. Se examinó el efecto de Survanta y las apoproteínas del surfactante SP-A y SP-D sobre la tasa de crecimiento celular y apoptosis, y sobre la expresión génica de pro α 1(I) colágena, colagenasa-1 y TIMP-1. Survanta es una preparación comercial de surfactante para administración exógena, se prepara por extracción con solventes de pulmones de bovino y ofrece un compuesto estéril, libre de endotoxinas y con una composición química y características físicas consistentes.

Material y Métodos. Se expusieron cultivos de fibroblastos normales de pulmón humano a 100, 500 y 1000 μ g/ml de Survanta; 10, 50 y 100 μ g/ml de SP-A, 500 mg/ml de Survanta más 50 μ g/ml de SP-A o 3 μ g/ml de SP-D. La tasa de crecimiento celular se evaluó utilizando un ensayo cromogénico basado en una sal de formazán, la apoptosis mediante tinción nuclear, marcado distal de DNA y ELISA. La expresión de los mRNAs de pro α 1(I) colágena, colagenasa-1 y TIMP-1 mediante Northern blot.

Resultados. Survanta indujo la apoptosis en los fibroblastos, aumentó los niveles de mRNA de colagenasa-1 y disminuyó aproximadamente 10 veces la expresión génica de pro α 1(I) colágena afectando la estabilidad del mRNA, evaluada mediante ensayos con actinomicina D. La SP-A aumentó aproximadamente en un 80% la expresión del mRNA de colagenasa-1, sin ningún efecto sobre la expresión de génica de colagenasa-1, TIMP-1 o la tasa de crecimiento celular. La SP-D aumentó considerablemente la expresión del mRNA de pro α 1(I) colágena, sin efecto aparente sobre colagenasa-1. Cuando los fibroblastos se expusieron simultáneamente a Survanta y SP-A, los efectos de Survanta se inhibieron parcialmente.

Discusión. Estos hallazgos sugieren que la fracción lípida y/o las apoproteínas hidrofóbicas pudieran proteger contra la fibrogénesis intraluminal al inducir la apoptosis de fibroblastos, al aumentar la expresión génica de colagenasa-1 y al disminuir los niveles de mRNA de pro α 1(I) colágena.

1 ANTECEDENTES.

1.1 INTRODUCCIÓN

En los pulmones, el epitelio alveolar está completamente cubierto por un complejo lipoproteico conocido como sustancia tensioactiva pulmonar o surfactante pulmonar (SP), el cual desempeña un papel crucial en la mecánica ventilatoria, disminuyendo la tensión superficial alveolar y facilitando el intercambio gaseoso. Sin embargo, en años recientes, se ha demostrado que el SP puede desempeñar otras funciones y actualmente se le reconoce como un factor que participa en los mecanismos de defensa y en la regulación de la respuesta inmune en el pulmón (26).

La fibrosis pulmonar difusa es el resultado final común de numerosas agresiones agudas y crónicas que afectan al aparato respiratorio, y también puede ser parte de diversas enfermedades sistémicas, como la artritis reumatoide y la esclerosis sistémica progresiva (79). En términos generales, e independientemente de su etiología, la fibrosis pulmonar se caracteriza por proliferación de fibroblastos y acumulación de matriz extracelular, principalmente colágenas fibrilares, en el parénquima pulmonar (75).

Los mecanismos patogénicos que operan en el desarrollo de la fibrosis pulmonar no se conocen con precisión. En las últimas dos décadas, se han realizado numerosas investigaciones, tanto en humanos como en modelos experimentales, con el objeto de dilucidar la secuencia de los eventos que preceden y acompañan el excesivo depósito de colágenas en el pulmón. Uno de los avances mas recientes, es el descubrimiento de que procesos patológicos *intraalveolares* desempeñan un papel relevante en la patogenia de la fibrosis pulmonar. (76). Esto ha constituido un avance importante en este campo, ya que clásicamente se había considerado que las enfermedades fibrosantes del pulmón afectaban exclusiva o predominantemente al intersticio del parénquima pulmonar. En otras palabras, hoy se sabe que los mismos

mecanismos patogénicos que operan en el desarrollo de la fibrosis intersticial están ocurriendo en los espacios alveolares.

Normalmente, los fibroblastos pulmonares están confinados al intersticio y en este contexto, no tienen contacto con el surfactante. Sin embargo, durante el desarrollo de la fibrosis pulmonar, estas células migran hacia los espacios alveolares donde se ponen en contacto con diferentes componentes alveolares incluyendo el agente tensioactivo. En este sentido, existe teóricamente la posibilidad de que el surfactante pulmonar tenga algún efecto sobre la expresión génica y/o síntesis de moléculas involucradas en la generación de matriz celular por los fibroblastos de pulmón.

En el presente trabajo, se investigó el efecto que tiene el surfactante pulmonar y las apoproteínas SP-A y SP-D, sobre la expresión de los mRNAs de colágena, colagenasa e inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (TIMP-1), así como en la tasa de crecimiento y apoptosis en cultivos de fibroblastos de pulmón humano.

1.2 EL SURFACTANTE PULMONAR

1.2.1 DEFINICIÓN:

El surfactante pulmonar (SP) es un complejo lipoproteico producido y almacenado en los neumocitos tipo II de los alvéolos de pulmón de mamífero. Una de sus funciones primordiales es la de aumentar la distensibilidad pulmonar, y de esta forma evitar la atelectasia y el edema durante la respiración normal. Su nombre en español deriva de la literatura anglosajona, donde aparece el término *surfactant* para describir a esta sustancia. En el idioma inglés, es un neologismo proveniente de la contracción de *surface active agent*. En nuestro idioma, se ha empleado el término *surfactante* para denominar a esta sustancia tensioactiva pulmonar. Aún cuando formalmente es un barbarismo, en el presente trabajo se utilizarán indistintamente ambos

términos, debido a la difusión tan amplia que la palabra surfactante ha tenido en la literatura en español.

1.2.2 PERSPECTIVA HISTÓRICA:

En 1929, Neergaard postuló por primera vez la existencia de una sustancia con actividad de superficie en el pulmón (10). Curiosamente, este trabajo se ignoró durante 30 años por la comunidad científica, y no fue hasta 1959, que la sustancia tensoactiva pulmonar fue redescubierta por los trabajos de investigación de Radford, Pattle y Clements (69, 62, 14). En su primera etapa, los estudios trataron principalmente el problema de la tensión de superficie alveolar en la interfase aire-líquido, y el papel del surfactante en la estabilidad alveolar. Pattle especuló también que la ausencia de la sustancia de recubrimiento alveolar puede en ocasiones ser una de las dificultades que el prematuro tiene que enfrentar. En 1959, Avery y Mead demostraron que la deficiencia de surfactante pulmonar producía el llamado síndrome de membrana hialina (4). En 1961, se identificó a la fosfatidilcolina como el principal componente del surfactante (41) y en los siguientes 20 años el estudio se dedicó principalmente a los lípidos del surfactante.

Al principio de la década de los setentas, se demostró que el material de surfactante recuperado por medio del lavado alveolar de pulmones maduros era capaz de mejorar la expansión y ventilación pulmonar en animales prematuros.

En 1980 se inicia el estudio de las apoproteínas del surfactante y a partir de entonces, se encuentran en la literatura científica numerosos trabajos que abordan diversos aspectos sobre su estructura, expresión génica, procesamiento, regulación, función, y sus interrelaciones. A partir de los trabajos anteriores, la investigación y el estudio de la sustancia tensoactiva pulmonar se incrementó considerablemente y actualmente, ya han sido establecidos muchos detalles sobre la síntesis, secreción y mecanismos de regulación de esta.

El reemplazo de la sustancia tensioactiva pulmonar como terapia en el síndrome de dificultad respiratoria en recién nacidos pretérmino, actualmente se encuentra bien establecido y se aplica en forma rutinaria en algunos lugares del mundo (68).

1.2.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL SURFACTANTE PULMONAR.

Los datos sobre la composición del SP difieren ligeramente de un estudio a otro, pero las tendencias globales son bastante congruentes. En este sentido, una composición representativa de la sustancia tensioactiva pulmonar sería: 80 a 85% de fosfolípidos (en peso), con elevado contenido de *dipalmitoil fosfatidilcolina* (DPPC), 5 a 10% de lípidos neutros, y 5 a 10% de proteínas, parte de ellas en la forma de apoproteínas específicas (29).

La fosfatidilcolina conforma aproximadamente el 80 % de los lípidos totales y cerca de dos terceras partes del total del tensioactivo pulmonar. En condiciones normales, aproximadamente el 70% de sus ácidos grasos están saturados, siendo el ácido palmítico el ácido graso saturado más común. Otros lípidos que componen al SP son: fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) entre otros; el 10 % restante está compuesto por otros lípidos principalmente colesterol y fosfatidilserina, esfingomielina y lisofosfatidilcolina. La DPPC se considera el compuesto más activo para disminuir la tensión superficial alveolar, pero la presencia de otros componentes, como el *fosfatidilglicerol*, o *fosfatidilinositol*, así como las proteínas, resultan imprescindibles para una adecuada disposición espacial, redistribución y probablemente reutilización del surfactante (29).

Alrededor de 10 % del peso total del tensioactivo son proteínas, 80% de ellas son provenientes del suero y sólo el 20 % son específicas. Actualmente, se reconoce la presencia de al menos 4 apoproteínas, denominadas SP-A, SP-B, SP-C y SP-D, en orden decreciente a su peso molecular (66). En general, son moléculas con propiedades anfipáticas o francamente hidrofóbicas, la mayoría de ellas con muchas modificaciones

postraduccionales, cuyas funciones más importantes son las siguientes: a) aumento de la actividad biofísica del SP, b) asociación con otros componentes del SP, c) formación de la mielina tubular, d) participación en los fenómenos de secreción, recambio y aclaramiento del SP en el alvéolo y e) como moduladores de los mecanismos de defensa del pulmón (47).

La SP-A es una colectina, es decir que tiene un dominio colágena-lectina; es una proteína hidrofílica y calcio-dependiente, la porción N-terminal de cada monómero es tipo colágena y la porción C-terminal es globular y glucosilada. La región N-terminal forma triples hélices, seis de las cuales interactúan para formar un octadecámero que semeja el componente C1q del complemento. Tiene un peso molecular de 26 a 28 kDa y es la más abundante en el espacio alveolar. Diferentes estudios han sugerido que esta proteína desempeña un papel importante en la formación de mielina tubular, una estructura transicional del tensioactivo que se encuentra primero en las secreciones alveolares. Asimismo, participa en la agregación de los fosfolípidos del surfactante, en el aumento de su actividad biofísica, en la inhibición de la secreción de los lípidos, y en la activación de los macrófagos alveolares. En este contexto, se ha demostrado que el SP colabora en la fagocitosis de algunas bacterias, virus y partículas coloidales de oro (20).

La SP-B tiene un peso molecular de 8-9 kDa y a pesar de ser una proteína muy hidrofóbica, es ligeramente soluble en soluciones acuosas. Se desconoce alguna función reguladora, pero parece ser una proteína clave para la formación de una monocapa estable y funcional del surfactante pulmonar en la superficie alveolar. Por otro lado, también participa en la formación de mielina tubular y por consiguiente ayuda a evitar la insuficiencia respiratoria, como lo demuestran estudios con pacientes que presentan una deficiencia congénita de SP-B. Esta proteína tiene una carga netamente positiva que parece ser importante en su interacción con los fosfolípidos aniónicos (interacción selectiva con fosfaditilglicerol (19).

La SP-C es la más pequeña de las cuatro apoproteínas específicas del surfactante pulmonar; su peso molecular es de aproximadamente 4 kDa y es la más hidrofóbica, lo que la hace soluble sólo en compuestos orgánicos. Su participación en el tensioactivo pulmonar no está muy clara. Se cree que contribuye a la formación y estabilización de la monocapa del tensioactivo. En estudios que se han llevado a cabo *in vivo* se ha observado que la SP-C puede ser importante para la adsorción de los fosfolípidos, mientras que la SP-B apoya la reducción de la tensión superficial más efectivamente (28).

La SP-D es una colectina sintetizada por las células alveolares tipo II, aunque también ha sido identificada en las células de Clara. Su peso molecular es de aproximadamente 43 kDa, sus características estructurales y biofísicas son similares a la SP-A, y al igual que esta última proteína no tiene un papel relevante en la actividad de superficie, pero probablemente está involucrada en la estimulación de los macrófagos (34, 87).

1.2.4 METABOLISMO DE LA SUSTANCIA TENSOACTIVA PULMONAR

El surfactante es secretado como cuerpos laminares, que se convierten en mielina tubular. Es a partir de esta configuración fisicoquímica como los fosfolípidos se adsorben a la superficie para formar la monocapa en la interfase aire-líquido. La película así formada es dinámica durante la expansión y compresión de la ventilación cíclica. El surfactante que entra en la monocapa es rico en proteínas específicas y en fosfolípidos insaturados. Estos elementos se pierden conforme la monocapa se enriquece en fosfatidilcolina saturada. Las pequeñas formas vesiculares con propiedades inadecuadas de superficie se generan en la monocapa, con los cambios cíclicos del área (32).

En el recién nacido a término todo el surfactante está en formas laminares, y con la respiración, la mielina tubular y las formas vesiculares se incrementan en porcentajes semejantes a los que se hayan en el adulto. Por lo tanto, no existe una poza metabólica común de surfactante alveolar, sino

varias, lo que complica la interpretación de la mayor parte de los estudios sobre su función.

En el pulmón adulto los macrófagos alveolares y los neumocitos tipo II degradan cerca del 50 % de la fosfatidilcolina del surfactante por las vías metabólicas lisosómicas; el otro 50% es reciclado en cuerpos laminares para nueva secreción. La vía metabólica de reprocesamiento conserva los componentes del surfactante y “reactiva” aquellos necesarios para regenerar surfactante activo en la resecretión (6).

1.2.5 EL SURFACTANTE PULMONAR COMO REGULADOR DE LA ACTIVIDAD CELULAR.

El tensioactivo pulmonar tiene otras funciones además de la de reducir la tensión superficial intraalveolar. Recientemente, se han descrito efectos sobre la proliferación celular y sobre la secreción de sustancias que participan en la respuesta inflamatoria. De acuerdo a estas investigaciones, el surfactante desempeña un papel importante en los mecanismos de defensa pulmonar y en la inmunomodulación local, aunque los efectos observados varían de acuerdo al componente empleado. Tanto el surfactante completo como el componente lípido aislado, suprimen la proliferación de células B y células T en respuesta a mitógenos (12). En contraste, la apoproteína SP-A estimula la proliferación de linfocitos (43). Por otro lado, el surfactante pulmonar reduce la secreción de interleucinas 1 y 6 (IL-1 e IL-6) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) por monocitos humanos (44). Por el contrario, la SP-A estimula la producción de estas citocinas. Estos datos sugieren que las cantidades relativas de SP-A y lípidos en el agente tensioactivo son importantes para el mantenimiento del balance inmune normal en el pulmón y que bajo ciertas circunstancias la SP-A puede ser un mediador importante de la inflamación. De esta manera, aunque el efecto primario del surfactante en la inflamación parezca ser de predominio inhibitor, el proceso es complejo. El efecto inhibitor o estimulador preciso depende de la intrincada interacción de

muchas células y factores químicos que pueden ser difíciles de aplicar en modelos *in vitro*.

1.3 ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LAS ENFERMEDADES FIBROSANTES DEL PULMÓN.

1.3.1 DEFINICIÓN.

Como se mencionó, la fibrosis pulmonar difusa es el resultado final común de un grupo heterogéneo y numeroso de padecimientos pulmonares conocidos genéricamente como neumopatías intersticiales difusas (NID) o enfermedades fibrosantes del pulmón. Este término agrupa un gran número de padecimientos respiratorios agudos y crónicos caracterizados por comprometer difusamente el parénquima pulmonar, afectando primordialmente al intersticio y a los espacios alveolares, aunque muchas de ellas también producen lesión de las vías aéreas periféricas (76).

Al agrupar a un gran número de padecimientos, no existe uniformidad en cuanto a la clasificación de las NID. Un enfoque útil para su clasificación es el separar la NID en dos grupos: aquellos con causa conocida y los de causa desconocida. Cada uno de estos grupos se puede dividir en subgrupos de acuerdo a la presencia o ausencia de granulomas en áreas intersticiales o vasculares. Dentro de las NID de causa conocida, las más comunes son las debidas a inhalantes ocupacionales o ambientales. Dentro de la categoría de causa desconocida, las más frecuentes son la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), también conocida como neumonía intersticial usual o alveolitis fibrosante criptogénica, la sarcoidosis y las NID asociadas a enfermedades colágeno-vasculares (31).

1.3.2 PATOGENIA DE LA RESPUESTA FIBROSANTE.

A pesar de numerosos estudios realizados tanto en humanos como en modelos experimentales, la secuencia de los eventos patogénicos que conducen a la fibrosis pulmonar difusa no se conoce con precisión.

Las alteraciones patológicas afectan fundamentalmente a las estructuras celulares y extracelulares que forman parte del parénquima pulmonar y provocan la destrucción de las unidades alveolo-capilares, con cambios irreversibles en la arquitectura y función de este órgano.

Independientemente de su etiología, las enfermedades pulmonares intersticiales difusas que evolucionan hacia la fibrosis parecen compartir al menos las siguientes fases fisiopatológicas (76):

- A. Daño inicial
- B. Inflamación
- C. Fibroproliferación
- D. Depósito anormal de moléculas de matriz, en especial colágenas tipo I y III.

La expansión exagerada de la población de fibroblastos, en conjunto con la excesiva acumulación de matriz intersticial, constituyen los dos procesos patológicos claves que transforman a padecimientos potencialmente reversibles (NID en etapa inflamatoria) en progresivos, irreversibles y letales. En este contexto, la comprensión de los mecanismos que controlan la proliferación y el comportamiento de los fibroblastos frente a diversos estímulos, puede ser fundamental para el hallazgo de medidas terapéuticas apropiadas.

En relación al depósito de matriz extracelular, una característica común en la patogenia de la fibrosis es la alteración en la homeostasis de la colágena, en la cual la síntesis de colágenas fibrilares excede a su degradación, ya sea por un aumento de la primera y/o una disminución de la

segunda. Diferentes estudios realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que existe un aumento transitorio en la síntesis de colágena y de manera importante, una disminución progresiva en la degradación de esta proteína (55, 61, 77-79), lo que apoya el concepto de que al menos la actividad de la colagenasa intersticial (MMP-1) está involucrada. Asimismo, en las enfermedades fibrosantes del pulmón se observa a menudo ruptura de las membranas basales (70) lo que sugiere un aumento en la actividad de las enzimas responsables de su degradación, entre ellas las gelatinasas A y B (MMP-2, MMP-9). Estas enzimas pertenecen a la familia de las metaloproteinasas cuyo papel en diferentes procesos fisiológicos y patológicos está recién comenzando a conocerse.

1.3.3 FIBROSIS INTERSTICIAL VERSUS FIBROSIS INTRAALVEOLAR

Clásicamente, se ha considerado que las enfermedades fibrosantes del pulmón afectan, tanto durante la inflamación como en la fibrosis, al *intersticio* del parénquima pulmonar, esto es, al espacio tisular que se encuentra comprendido entre las paredes alveolares. Sin embargo, varios estudios han demostrado que procesos patológicos *intraalveolares* desempeñan un papel importante en el desarrollo de la respuesta fibrosante.

En un excelente estudio, Basset y asoc. (5), analizaron los cambios histopatológicos y ultraestructurales en material de biopsia y de autopsia de 373 pacientes con una amplia variedad de neumopatías intersticiales difusas. Las lesiones intraalveolares se clasificaron en 3 tipos: a) lesiones polipoides intraluminales formadas por células inflamatorias, fibroblastos y fibras de colágena, b) obliteración de la luz alveolar por conglomerados de tejido conjuntivo y c) incorporación de masas de fibrosis intraalveolar a las paredes alveolares. Estos 3 procesos patológicos se observaron en mayor o menor grado en un alto porcentaje de los pacientes con diferentes neumopatías intersticiales difusas, aunque su frecuencia fue variable dependiendo de la NID en cuestión.

Los hallazgos mencionados demuestran que el término de enfermedad "intersticial" compartamentaliza erróneamente a estos padecimientos, y que los fenómenos patológicos intraalveolares pueden ser muy importantes en la destrucción progresiva del parénquima por fibrosis intersticial.

1.4 LAS COLÁGENAS.

1.4.1 GENERALIDADES SOBRE LA FAMILIA DE LAS COLÁGENAS.

Las colágenas representan una familia de proteínas estructuralmente relacionadas pero genéticamente distintas, que constituyen las moléculas más abundantes de la matriz intersticial del pulmón (8). Hasta la fecha se han descrito 19 diferentes tipos genéticos de colágena; sin embargo, sólo 14 de ellas han sido suficientemente caracterizadas a nivel molecular (76). Estructuralmente, son proteínas formadas por tres cadenas polipeptídicas denominadas "cadenas α ". Tres cadenas α se unen para formar un monómero de colágena. Una característica común a todas las colágenas es que contienen dominios globulares y de triple hélice (11). Las regiones de triple hélice son atribuidas al hecho de que existen secuencias repetitivas Gly-X-Y en cada cadena (donde X y Y pueden ser cualquier aminoácido, pero frecuentemente son los aminoácidos prolina e hidroxiprolina, respectivamente). La configuración estereoquímica de los aminoácidos causa que cada cadena α tome una conformación helicoidal con giro a la izquierda, con una distancia repetitiva entre los residuos de 0.291 nm y un giro relativo de 110°; esto hace que existan 3.27 residuos por vuelta de la hélice y haya una distancia de 0.87 nm cada tercera glicina. Otra característica de las cadenas α necesaria para la conformación de la triple hélice, es la presencia de glicina cada tercer residuo. Debido a que no hay cadenas laterales voluminosas en el carbono α de la glicina, las tres cadenas α pueden enrollarse alrededor de un eje común para formar una super-hélice con giro a la izquierda (67).

Las colágenas pueden dividirse en dos clases: fibrilares y no fibrilares. Las colágenas fibrilares (tipos I, II, III, V, y XI) son los componentes estructurales más abundantes del tejido conjuntivo. Las colágenas no fibrilares se dividen en tres grupos: colágenas de la membrana basal (tipos IV y VII), colágenas de cadena corta (tipos VIII y IX), y colágenas FACIT (colágenas asociadas a fibrillas con triples hélices interrumpidas) (17).

En el parénquima pulmonar se encuentran al menos cinco tipos genéticos diferentes de colágenas (48). Las colágenas tipo I y III son las más abundantes y presentan una relación de 2:1 en el espacio intersticial. En el *intersticio también se encuentran pequeñas cantidades de colágenas tipo V y VI*. Por otro lado, las membranas basales del epitelio alveolar y del endotelio capilar son ricas en colágena tipo IV, la cual codistribuye con otras moléculas extracelulares, en especial laminina.

El patrón de síntesis de las colágenas es tejido-específico y está *regulado tanto a nivel transcripcional como traduccional*, además, las moléculas sintetizadas están sujetas a numerosas modificaciones postranscripcionales. Por otro lado, una vez en los espacios extracelulares, estas proteínas son degradadas por enzimas específicas, miembros de la familia de las metaloproteinasas (40, 60).

1.4.2 LA COLÁGENA TIPO I

La colágena intersticial más abundante, y que se ha estudiado más extensamente, es la colágena tipo I. Esta molécula está formada por 3 polipéptidos llamados cadenas α (I). Una molécula de colágena I usualmente consiste de dos cadenas α 1(I) y una cadena α 2(I); sin embargo, se pueden formar homotrímeros α 1(I) cuando no se hace la cadena α 2(I). La colágena I es sintetizada como un precursor de peso molecular más alto llamado procolágena, que consiste de tres cadenas *pro* α con péptidos de extensión en las porciones N- y C- terminales. Los residuos de hidroxiprolina, formados por

hidroxilación postraducciona de aproximadamente la mitad de los residuos de prolina, estabilizan la triple hélice (8).

Los genes que codifican para las cadenas $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$ y $\text{pro}\alpha 2(\text{I})$, COL1A1 y COL1A2, están localizados en los cromosomas 17 y 7 respectivamente. Aún cuando los niveles de los mensajeros para $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$ y $\text{pro}\alpha 2(\text{I})$ se mantienen generalmente en una relación 2:1, la transcripción de estos genes puede ser regulada independientemente. Los péptidos de extensión N- y C- terminales, liberados cuando los monómeros de procolágena se integran en las fibrillas, pueden inhibir o estimular la síntesis de colágena (35).

1.5 LA FAMILIA DE LAS METALOPROTEINASAS DE MATRIZ

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son las principales enzimas responsables de la degradación de la matriz extracelular y desempeñan un papel central en diversos procesos fisiológicos como la morfogénesis, la angiogénesis, y la inflamación. (59).

Las MMPs son una familia de endopeptidasas que contienen zinc, y que incluyen a diferentes clases de enzimas como son las colagenasas, gelatinasas, estromelinas y las metaloproteinasas "tipo membrana".

Las colagenasas rompen la región triple helicoidal de las colágenas intersticiales y a la fecha, 3 miembros de este grupo han sido clonados: MMP-1, (colagenasa-1) llamada también colagenasa intersticial de fibroblastos, MMP-8 (colagenasa-2) denominada colagenasa de neutrófilos, y MMP-13 o colagenasa 3, recientemente clonada de un carcinoma humano mamario (21, 24, 30).

La subfamilia de las gelatinasas degradan a la colágena tipo IV, principal constituyente de membranas basales, fibronectina y elastina, y a la fecha se han caracterizado dos miembros de este subgrupo que son la Gelatinasa A (colagenasa tipo IV de 72 kDa/MMP-2), y la Gelatinasa B (colagenasa tipo IV de 92 kDa/MMP-9) (57, 9).

La subfamilia de estromelisinias tiene una amplia especificidad de sustratos que incluye a la parte proteica de los proteoglicanos, a la fibronectina, y la laminina. Varias enzimas se han clasificado tentativamente en este grupo e incluyen a la estromelisina 1 (MMP-3), estromelisina 2 (MMP10), estromelisina 3 (MMP-11), matrilisina (MMP-7), y a la metaloelastasa (MMP-12) (60).

Finalmente, de las metaloproteinasas de membrana (MT-MMP) recientemente descubiertas se han caracterizado cuatro enzimas (57, 9).

Los principales inhibidores fisiológicos de las MMPs son una familia de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs). Cuatro diferentes TIMPs se han identificado a la fecha que son TIMP-1, 2, 3 y 4. Los TIMPs forman complejos de alta afinidad con las formas activas de MMPs e inhiben su actividad enzimática a través de una interacción no covalente (57).

1.6 EL FENÓMENO DE APOPTOSIS.

1.6.1 DEFINICIÓN.

En los últimos años, el interés en la muerte celular como un proceso fisiológico importante en el desarrollo normal de los órganos, en la homeostasis tisular y como mecanismo de defensa ha crecido exponencialmente. El término apoptosis engloba a una serie de mecanismos genéticamente regulados que al ser estimulados, conducen a una muerte celular programada con características morfológicas y bioquímicas únicas (18, 50).

1.6.2 PERSPECTIVA HISTÓRICA.

El concepto de apoptosis es relativamente nuevo. En 1971, investigadores de la Universidad de Edinburgo publicaron un estudio en donde describieron morfológicamente este fenómeno en un modelo de atrofia hepática en ratas. Inicialmente, utilizaron el término "necrosis por encogimiento" (*shrinkage necrosis*) (38), y un año después, acuñaron el

término *apoptosis* (37). El siguiente paso crítico en el conocimiento de este fenómeno se dio a partir de estudios con tejido linfoide irradiado. Ya se sabía que los núcleos de linfocitos irradiados se rompen (83), pero en 1976 (81) y en 1981 (95, 96), tres grupos examinaron por electroforesis la cromatina de tejidos irradiados y encontraron que se rompía en fragmentos que producían un patrón en escalera típico, sugiriendo que los fragmentos eran múltiplos de nucleosomas. Wyllie y cols. (94) asociaron este patrón electroforético con el fenómeno de apoptosis y esto permitió añadir un marcador bioquímico específico a los cambios morfológicos distintivos de las células apoptóticas. Este descubrimiento produjo un enorme interés en la comunidad científica, lo que condujo a un incremento enorme en trabajos sobre apoptosis. Actualmente, el interés está enfocado a los genes involucrados en este suicidio celular y a la posibilidad de usar a la apoptosis como un medio para el diagnóstico y tratamiento de tumores (93).

1.6.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE LA APOPTOSIS.

Morfológicamente, la célula se encoge y se hace mas densa. La cromatina se vuelve picnótica y se empaqueta en masas que se aplican contra la membrana nuclear (marginación de la cromatina), creando la forma característica de media luna o navicular. El núcleo también se puede desintegrar (cariorrexis) y la célula emite prolongaciones que con frecuencia contienen fragmentos nucleares picnóticos. Estas prolongaciones tienden a separarse convirtiéndose en cuerpos apoptóticos, los cuales pueden ser fagocitados por macrófagos o células vecinas o bien permanecer libres; sin embargo, la célula también puede contraerse para convertirse en una masa densa, redondeada, como un solo cuerpo apoptótico (50).

Se han descrito tres vías que desencadenan la apoptosis (16). La primera se inicia por la ausencia de factores de crecimiento y se regula por la familia de proteínas Bcl-2. Esta vía conduce a la salida de citocromo c de la mitocondria. La segunda vía involucra la señalización por medio de

receptores en la superficie celular tales como TNF o Fas. La tercera vía, y la menos caracterizada, es iniciada a partir de daño al DNA. Todas estas vías conducen a la activación de unas cistein-proteasas genéricamente llamadas *caspasas*. Recibieron este nombre porque todas ellas rompen el sustrato peptídico después de residuos de ácido aspártico. (1). Estas enzimas se encuentran presentes normalmente en las células como proenzimas que requieren de proteólisis limitada para su activación (58). Una vez activadas, estas proteasas degradan selectivamente sustratos celulares vitales, lo que resulta en la morfología apoptótica y en la fragmentación internucleosomal del DNA por DNAsas selectivamente activadas. Miembros de la familia de oncoproteínas Bcl-2 controlan los eventos mitocondriales y son capaces de prevenir, o inducir, tanto la apoptosis como otros tipos de muerte celular. Esto sugiere que diferentes tipos de muerte celular comparten mecanismos comunes en las fases tempranas, mientras que la activación de caspasas determina el fenotipo de muerte celular (73).

1.7 PAPEL DEL SURFACTANTE EN LA FIBROSIS PULMONAR.

Como ya se mencionó, en condiciones fisiológicas los fibroblastos no tienen contacto con el surfactante pulmonar, pero en numerosos procesos patológicos estas células mesenquimatosas atraviesan la membrana basal del epitelio alveolar, poniéndose en contacto directo con la células epiteliales y la sustancia tensoactiva, lo que al menos teóricamente podría modificar el comportamiento de ambos tipos celulares de manera bidireccional, así como la funcionalidad del surfactante.

Algunos datos que apoyan este concepto, incluyen el reciente hallazgo de que los fibroblastos derivados de pulmones fibróticos secretan angiotensinógeno, el cual induce apoptosis de las células del epitelio alveolar (86, 91, 92). En otro estudio (53), se cuantificó la proteína A del surfactante (SP-A) y los fosfolípidos totales (FT) en el líquido bronquiolo-alveolar de 44 enfermos con fibrosis pulmonar idiopática, para determinar si sus niveles

correlacionaban con la sobrevida. Se encontró que la relación SP-A/FT estaba muy disminuida en los enfermos en comparación con la observada en sujetos sanos. Pero el hallazgo más importante consistió en que la relación se encontraba significativamente disminuida en los enfermos que fallecieron en los primeros dos años después del diagnóstico, en comparación con los que sobrevivieron.

Asimismo, un trabajo reciente (85) sugiere que el surfactante inhibe la síntesis de DNA y la producción de algunos mediadores de la inflamación, como IL-6 y prostaglandina E2, por parte de fibroblastos pulmonares. Es importante destacar que en este estudio no se estableció si los cambios en la síntesis de DNA, determinada con timidina tritiada, se debían a una disminución real en la proliferación de fibroblastos o a la inducción de muerte celular programada. Además, también se desconoce el posible papel de este complejo lipoproteico sobre la producción de las moléculas de matriz intersticial, así como de las enzimas responsables de su degradación.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo a diferentes estudios recientes, el desarrollo de las lesiones fibrosantes se relaciona con un aumento transitorio en la síntesis de colágenas intersticiales y una *disminución progresiva en la actividad colagenolítica*, aunque los mecanismos que operan en estos procesos no se conocen con exactitud. Diversas citocinas y factores de crecimiento pueden desempeñar un papel, *favoreciendo o evitando la respuesta fibrosante*. Por ejemplo, TGF- β se considera el prototipo de moléculas profibrosantes, ya que aumenta la expresión del mRNA de colágena I, disminuye la del mRNA de la colagenasa-1, e incrementa la secreción de TIMP-1. En cambio el FGF-ácido muestra efectos antifibrosantes ejerciendo el efecto contrario, esto es, *inhibe la síntesis de colágena y aumenta la expresión del mRNA y actividad de las metaloproteinasas de matriz*, en especial incrementando la producción de colagenasa intersticial y disminuyendo al TIMP-1 (7).

Dado que durante el desarrollo del componente intraalveolar de las enfermedades fibrosantes del pulmón los fibroblastos se ponen en contacto con el surfactante pulmonar, es de interés averiguar la influencia que podría tener este complejo lipoproteico sobre algunas actividades de los fibroblastos pulmonares.

Se planteó la hipótesis de que la sustancia tensoactiva podría tener un efecto antifibrosante en el pulmón y por ello, el problema quedó planteado en las siguientes preguntas:

¿La sustancia tensoactiva pulmonar tiene algún efecto sobre la tasa de crecimiento de los fibroblastos pulmonares y en la inducción de apoptosis?

¿El SP tiene algún efecto sobre la expresión de los mRNAs de colágena tipo I, colagenasa-1 y TIMP-1?

¿Es este un efecto “anti o profibrosante”?

3 OBJETIVOS.

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Conocer el efecto del surfactante pulmonar y de las apoproteínas A y D sobre la tasa de crecimiento celular, inducción de apoptosis y el comportamiento en relación al metabolismo de la matriz extracelular, de cultivos de fibroblastos pulmonares humanos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Determinar la tasa de crecimiento celular en cultivos de fibroblastos de pulmón humano normal incubados en presencia de diversas concentraciones de Survanta, SP-A y SP-D.

Determinar la presencia de muerte celular programada en cultivos de fibroblastos de pulmón humano normal incubados en presencia de diversas concentraciones de Survanta, SP-A y SP-D.

Determinar la expresión de mRNA para colágena tipo I, MMP-1 y TIMP-1 en cultivos de fibroblastos de pulmón humano normal incubados en presencia de diversas concentraciones de Survanta, SP-A y SP-D.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS

Se utilizaron fibroblastos primarios de pulmones humanos macroscópica y microscópicamente normales obtenidos de lobectomía por la presencia de lóbulo pulmonar solitario (7). Las células se aislaron por dispersión con tripsina de fragmentos pulmonares múltiples. Los fibroblastos y las líneas celulares se establecieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB); se añadió penicilina (200 U/ml) y estreptomycin (200 mg/L). Para los experimentos de este estudio sólo se usaron cultivos tempranos (pasajes 4 a 8). Las células se crecieron en cajas T-25 a 37° en una atmósfera con 95% de aire y 5% de bióxido de carbono hasta alcanzar confluencia temprana.

4.2 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN LÍPIDA DEL SURFACTANTE.

Como fuente de lípidos del surfactante se utilizó Survanta, una preparación comercial para administración exógena. Survanta (Abbot Laboratories, Columbus, OH), se ha utilizado ampliamente en clínica y tiene varias ventajas sobre la utilización de lípidos de otras fuentes. Survanta ofrece una preparación estéril, libre de endotoxinas y con una composición química y características físicas consistentes. Survanta se prepara por extracción con solventes de pulmones de bovino. Además de contener lípidos derivados del tensoactivo pulmonar natural, Survanta también contiene las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C, pero no contiene SP-A ni SP-D.

4.3 OBTENCIÓN DE LA SP-A Y LA SP-D.

La apoproteína A de surfactante fue preparada en el laboratorio del Dr. David. S. Phelps (Universidad Estatal de Pensilvania). Se obtuvo de material de lavado broncoalveolar de pacientes con proteinosis alveolar. La fracción insoluble, que contiene la SP-A, fue disuelta en urea 3 M, 20% de glicerol y se

sujetó a enfoque isoeléctrico preparativo. Al final del electroenfoco, las fracciones que contienen a la SP-A fueron colocadas en una bolsa de diálisis con 1 M de NaCl y dializadas contra agua. La sal fue incluida en la diálisis inicial para ayudar a disociar las anfófilas de la proteína. La diálisis se continuó contra múltiples cambios de agua a 4 °C, por al menos 4 días. Después de la diálisis, la preparación de SP-A fue caracterizada por determinación de proteína, análisis electroforético, ELISA para SP-A, y determinación de endotoxina bacteriana (y eliminación en caso de que fuera necesario). La pureza del preparado de SP-A se estima mayor del 98%.

La SP-D humana se obtuvo a través de una amable donación por parte del Dr. Robert Mason (National Jewish Medical and Research Center, Denver, CO). Esta proteína se aisló del sobrenadante de lavados broncoalveolares de pacientes con proteinosis alveolar al centrifugarlos a 10,000 x g. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad en maltosil-agarosa y filtración en gel de agarosa al 4%. La pureza del preparado se estima mayor al 98% y libre de endotoxina bacteriana.

4.4 EVALUACIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO CELULAR.

Cuando los cultivos alcanzaron confluencia temprana, se tripsinizaron, se resuspendieron en medio F-12K con 10% de SFB, se contaron y se distribuyeron en placas de cultivo de 96 pozos a una concentración de 15×10^3 células/pozo. Después de 24 horas de incubación a 37 °C en atmósfera de 95% de aire y 5% de bióxido de carbono, el medio se reemplazó con medio sin suero, se agregó Survanta, o SP-A, o SP-D a diferentes concentraciones y las placas se incubaron por 48 horas. En algunos experimentos, se hicieron curvas de crecimiento durante varios días. En estos casos, se empleó medio con SFB al 1% y se cambió cada 48 horas por medio fresco equivalente.

El número de células se determinó con el reactivo de proliferación celular WST-1 (Boehringer Mannheim) como se ha descrito previamente (86). WST-1 es una sal de tetrazolio que las mitocondrias de células viables

convierten en el cromóforo soluble formazan. En el momento de la medición, el medio de los correspondientes pozos fue reemplazado con medio fresco equivalente, y la solución colorante se añadió a cada pozo (10 μ l/0.1 ml). La incubación se continuó por 4 horas más, y el medio de cada pozo a medir se transfirió a otra placa. La absorbancia se leyó en un lector de placas para ELISA a una longitud de onda de 450 nm, usando de referencia una longitud de onda de 620 nm. Cada punto se midió por triplicado.

4.5 EXPRESIÓN DE LOS mRNAs DE COLÁGENA α 1(I), MMP-1 Y TIMP-1

Cuando los fibroblastos alcanzaron confluencia temprana, el medio fue reemplazado con medio sin suero que contenía ya sea: 10, 50 o 100 μ g/ml de SP-A, 3 μ g/ml de SP-D, 500 μ g/ml de Survanta o una combinación de 50 μ g/ml de SP-A mas 500 μ g/ml de Survanta. En todos los casos, las células se incubaron 48 horas. Los controles consistieron en cultivos de fibroblastos con medio sin suero.

4.6 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD APOPTÓTICA

La morfología nuclear y la condensación de cromatina fueron evaluadas a través de imágenes de fluorescencia de fibroblastos teñidos con bromuro de etidio y mediante marcado distal del DNA (*deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling*; TUNEL).

La tinción nuclear con bromuro de etidio se llevó a cabo como se ha descrito previamente (51). Las células se expusieron a Survanta y/o SP-A por 36 y 48 horas, se fijaron en etanol al 70% a -20°C por 10 minutos, se trataron 30 minutos con RNAsa A (50 μ g/ml) a 37°C , y se incubaron por 10 minutos con bromuro de etidio (50 μ g/ml). Después de lavar 3 veces con amortiguador de fosfatos salino, las células fueron observadas bajo el microscopio con epifluorescencia (Zeiss) y fotografiadas usando una película Kodak Plus X-Pan.

Para la técnica de TUNEL (86), las células fueron fijadas en paraformaldehído frío al 4% preparado en el momento, por 15 minutos a temperatura ambiente, y se lavaron posteriormente tres veces con amortiguador de fosfatos salino. Las células se permeabilizaron con 2 ml de triton X-100 al 0.1% en citrato de sodio al 0.1% por 2 minutos en hielo. Las células apoptóticas fueron detectadas utilizando un kit comercial (*In situ Cell Death Detection Kit*, Boehringer, Mannheim). Se vertieron 50 μ l de la mezcla de reacción TUNEL sobre los portaobjetos que contenían los fibroblastos fijados, y se incubaron en una cámara con ambiente húmedo a 37°C por una hora. Los portaobjetos se montaron con 50 μ l de glicerol al 50% en amortiguador de fosfatos salino y se visualizaron mediante un microscopio Olympus con filtros para fluoresceína. Los controles negativos incluyeron preparaciones sin la enzima. Las imágenes se capturaron usando una cámara CCD (JVC), se importaron al programa de computadora Adobe Photoshop y se imprimieron sobre papel fotográfico estándar.

La fragmentación del DNA celular se midió con un ELISA fotométrico diseñado para la detección de fragmentos de DNA marcados con 5'-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en microplacas de 96 pozos con fondo plano, siguiendo las instrucciones del fabricante (Boehringer, Mannheim). Este método se basa en la salida temprana de fragmentos de DNA de tamaño nucleosomal al citosol de células en apoptosis. Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar de dos experimentos independientes con 4 réplicas cada uno. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando T de Student.

4.7 AISLAMIENTO DE RNA TOTAL Y ANÁLISIS DE NORTHERN BLOT

Se aisló el RNA total por el método de extracción con ácido guanidílico tiocianato/fenol cloroformo (13). Se fraccionó el RNA total (10 μ g/carril) en un gel de agarosa al 1% con 0.66 M de formaldehído. Se visualizó el RNA ribosomal con bromuro de etidio y el RNA fraccionado se transfirió sobre membranas de nylon (Nytran) mediante capilaridad. Las membranas se

secaron en aire y se calentaron a 80 °C por 2 h. Las membranas se prehibridaron a 42°C por 16 h en 5 x SSC, formamida al 50%, solución de Denhardt 5 x y SDS al 5%, con 100 µg/ml de DNA desnaturalizado de espermatozoos de salmón. La hibridación se llevó a cabo a 42°C por 16 h en el amortiguador de hibridación que contiene sulfato de dextrán mas la sonda marcada con ³²P y desnaturalizada con calor. Las membranas se lavaron con SSC 2x y SDS al 1% a temperatura ambiente tres veces por 5 minutos, posteriormente 2 veces por 15 minutos y posteriormente con SSC 0.1x y SDS al 0.1%. Después de secadas, las membranas se expusieron a una película Kodak X-AR a -70°C con una pantalla intensificadora. Para “normalizar” la cantidad de RNA entre las diferentes muestras, se midió el nivel de mRNA de la enzima gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y el RNA ribosomal 18s. Las sondas de colagenasa-1, procolágena α1 tipo I, TIMP-1, GAPDH y rRNA 18s se marcaron radioactivamente con [³²P]dCTP a una actividad específica de 200 x 10⁶ dpm/µg. Las imágenes autoradiográficas se midieron por densitometría (Hoefer Scientific Instruments; GS365W Electrophoresis Data System).

4.8 SONDAS DE DNA COMPLEMENTARIO

Las sondas de DNA complementario (cDNA) para procolágena α 1(I), colagenasa-1 humana (MMP-1), TIMP-1, GAPDH y RNA ribosomal (rRNA) 18S se obtuvieron de la *American Type Culture Collection*.

4.9 EVALUACION DE LA ESTABILIDAD DE RNA m DE COLAGENA TIPO I

Con el objeto de determinar si los cambios observados en la expresión del mRNA de procolágena α 1(I) son debidos a desestabilización del mRNA, en experimentos paralelos, se añadió actinomicina D (concentración final de 12.5 µg/ml) a cultivos subclonfluentes de fibroblastos en medio sin suero para detener la transcripción génica (7). El control (tiempo cero) se tomó obteniendo los fibroblastos antes de la adición de actinomicina D. A las células

tratadas con actinomicina, con o sin exposición a Survanta, se les extrajo el RNA total a las 6, 12 y 24 horas después de iniciado el tratamiento. El RNA total de los fibroblastos expuestos a Survanta sin actinomicina se aisló en los mismos tiempos. El análisis para evaluar la expresión del mRNA de colágena se llevó a cabo con Northern Blot utilizando la sonda para colágena. α 1(I) Las diferencias en la carga de RNA se normalizaron utilizando una sonda de cDNA para rRNA 18S. La señal de colágena se midió por densitometría, se dividió entre la señal del rRNA 18S, y se expresó como el porcentaje del control al tiempo cero.

5 RESULTADOS

5.1 EFECTO DEL SURFACTANTE PULMONAR, SP-A Y SP-D SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO CELULAR.

Para investigar si la presencia de Survanta o las apoproteínas afectan el crecimiento celular, se efectuaron inicialmente curvas de crecimiento en presencia de suero fetal bovino al 1%. La figura 1 muestra el efecto a 10 días de incubación en fibroblastos pulmonares tratados con 500 μg de Survanta. Se puede observar que la presencia de Survanta, cuando el medio está enriquecido con SFB al 1%, *no modifica la curva en relación al control*. Resultados similares se obtuvieron cuando las células se incubaron con SP-A 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o SP-D 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 6 días. Como se aprecia en la figura 2, estas apoproteínas específicas del surfactante no modificaron la curva de crecimiento de fibroblastos en presencia de SFB al 1%.

Para evaluar el efecto del Survanta y la SP-A en fibroblastos pulmonares cultivados en medio libre de suero, en otro grupo de experimentos, los fibroblastos fueron expuestos a 100, 500 o 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Survanta, o 10, 50 o 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de SP-A por 48 horas. Como se muestra en la figura 3, Survanta indujo un pérdida de la densidad celular dosis-dependiente, medido con el ensayo de WST-1. La disminución en el número de células fue estadísticamente significativa cuando los fibroblastos pulmonares se expusieron a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($P < 0.0002$ y <0.0001 respectivamente). Por el contrario, cuando las células se incubaron 48 horas en presencia de SP-A en medio sin suero, la tasa de crecimiento fue similar a la observada en las células controles (figura 4).

En otra serie de experimentos, los fibroblastos fueron incubados con 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Survanta, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de SP-A o ambos. Como puede apreciarse en la figura 5, la presencia de SP-A inhibió casi completamente el efecto que el Survanta ejerce sobre la tasa de crecimiento de estas células.

5.2 EFECTO DE SURVANTA Y SP-A SOBRE LA APOPTOSIS DE FIBROBLASTOS.

Los resultados arriba mencionados hicieron surgir la posibilidad de que el Survanta pudiera inducir la apoptosis en los fibroblastos. Para investigar este posible efecto, se realizaron 3 tipos independientes de experimentos. La figura 6 muestra un cultivo de fibroblastos teñidos con bromuro de etidio incubados con 500 $\mu\text{g/ml}$ de Survanta por 36 horas. La microscopía de células adherentes reveló que la exposición a Survanta aumentó el número de núcleos típicamente apoptóticos, es decir, condensados y con morfología fragmentada (fig. 6B y 6C). En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos cuando se empleó TUNEL. Pueden apreciarse algunas células incubadas que después de 48 horas en presencia de Survanta muestran el DNA cortado dentro de fragmentos nucleares discretos en una variedad de tamaños (figura 7B). La presencia de SP-A (50 $\mu\text{g/ml}$) en el mismo medio que Survanta, pareció producir una disminución del número de células apoptóticas (figura 7C). Para evaluar cuantitativamente estos cambios, se incubaron las células en presencia de BrdU, el cual se incorpora al DNA genómico. En presencia de apoptosis, el DNA fragmentado se libera al citoplasma. La técnica empleada, permite detectar el DNA marcado con BrdU en el citoplasma de las células afectadas, usando un anticuerpo monoclonal contra este agente en un ensayo de ELISA.

Como se observa en la figura 8, la exposición de fibroblastos de pulmón humano a 500 $\mu\text{g/ml}$ de Survanta indujo un aumento significativo en la fragmentación del DNA en relación con las células controles ($p < 0.01$). Asimismo, la incubación simultánea con Survanta y SP-A mostró que la apoproteína neutralizó casi completamente este efecto.

5.3 EFECTO DEL SURVANTA Y LA SP-A SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE PRO COLÁGENA $\alpha 1(I)$.

Se incubaron cultivos de fibroblastos crecidos a confluencia temprana por 48 horas en medio sin suero, conteniendo ya sea 50 $\mu\text{g/ml}$ de SP-A, 500 $\mu\text{g/ml}$ de Survanta o ambos.

Como se muestra en la figura 9, la incubación de fibroblastos en presencia de Survanta produjo una marcada disminución de la expresión del mRNA de procolágena $\alpha 1(I)$, mientras que la SP-A aumentó moderadamente los niveles de este transcrito. El análisis cuantitativo de la expresión de este mensaje se muestra en la figura 10. Para este propósito, la señal de procolágena $\alpha 1(I)$ se normalizó con los niveles del rRNA 18S y se midió por densitometría. Los resultados revelaron una disminución de 10 veces cuando Survanta estuvo presente en el medio, mientras que la SP-A causó un incremento del 80% del transcrito. Cuando los fibroblastos se expusieron a ambas sustancias (Survanta y SP-A), la expresión del mRNA de la pro $\alpha 1(I)$ colágena también reveló una disminución significativa en la señal, pero se apreció una ligera atenuación del efecto producido por Survanta.

Para determinar si el efecto del Survanta sobre la expresión génica de procolágena $\alpha 1(I)$ se debiera a modificaciones en la estabilidad del mRNA, se analizó la expresión del transcrito después de tratar a los fibroblastos pulmonares con actinomicina D en presencia o ausencia de Survanta. Como se observa en la figura 11, la vida media del mRNA de la procolágena $\alpha 1(I)$ en fibroblastos control expuestos a la actinomicina D fue de aproximadamente 18-20 h, y se obtuvieron resultados similares con los fibroblastos que fueron incubados en presencia de Survanta. Cuando la actinomicina D y Survanta se emplearon en el mismo cultivo, la vida media se redujo a 12 horas.

5.4 EFECTO DEL SURVANTA Y LA SP-A SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MMP-1 Y TIMP-1.

Mediante el análisis de Northern Blot, no se detectó el transcrito de MMP-1 en fibroblastos pulmonares control incubados en medio sin suero. Como se muestra en la figura 9 y en la figura 12, Survanta indujo pronunciadamente la expresión del mRNA de la colagenasa-1, mientras que la SP-A no tuvo un efecto apreciable en este transcrito. Otras concentraciones de SP-A probadas (10 y 100 $\mu\text{g/ml}$) tampoco mostraron efectos sobre este transcrito. Cuando ambas sustancias estuvieron presentes en el mismo cultivo, la expresión de mRNA de la MMP-1 también mostró un aumento, pero a un grado levemente menor que cuando se empleó solamente Survanta. El análisis cuantitativo mediante densitometría nos muestra que el efecto de atenuación de la SP-A fue de 16% por ciento comparado con el efecto observado con Survanta.

En condiciones basales, los fibroblastos normales de pulmón humano expresaron el transcrito de 0.9 kb de TIMP-1. No se observó ningún efecto apreciable mediante análisis de Northern Blot sobre la expresión de mRNA de TIMP-1 cuando las células fueron estimuladas con Survanta, SP-A o ambos (figura 9).

5.5 EFECTO DE LA SP-D SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS mRNAs DE PRO α 1(I) COLÁGENA Y MMP-1.

Para este estudio, se incubaron cultivos de fibroblastos crecidos a confluencia temprana por 48 horas en medio sin suero, conteniendo 3 $\mu\text{g/ml}$ de SP-D.

La figura 13 muestra el efecto de esta apoproteína del surfactante sobre los niveles de mRNA de la procolágena α 1(I) y la MMP-1 evaluados con el análisis de Northern Blot. La SP-D produjo un aumento significativo en la señal

de procolágena $\alpha 1(I)$ colágena, que medida por densitometría, reveló un aumento de aproximadamente 6 veces sobre el control.

Por otro lado, no se observó ningún efecto apreciable mediante análisis de Northern Blot sobre la expresión de mRNA de MMP-1 cuando las células fueron estimuladas con 3 $\mu\text{g/ml}$ de SP-D.

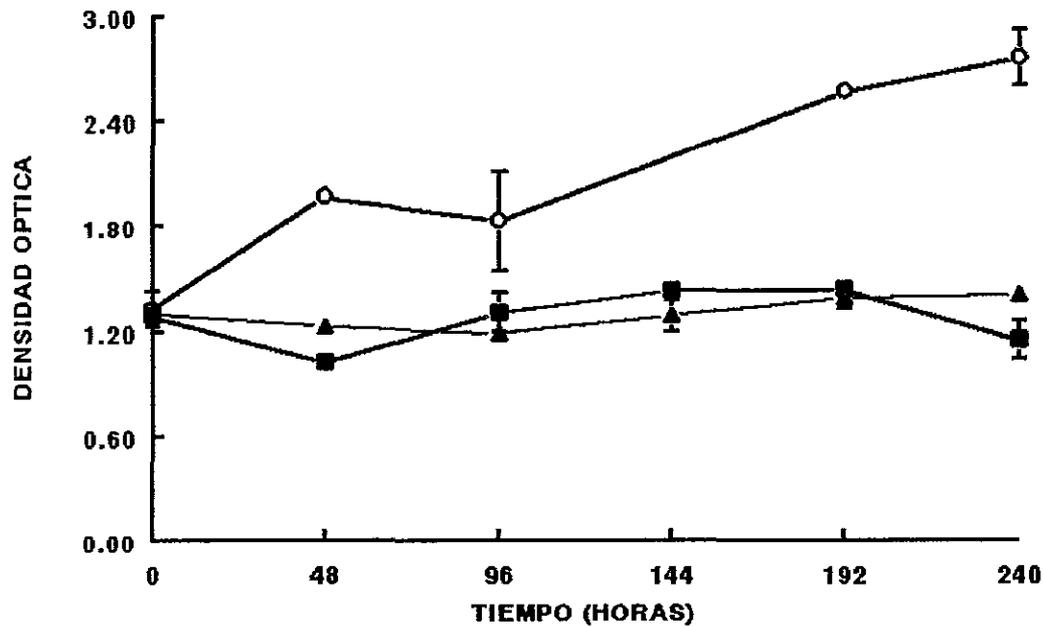


Figura 1.- Efecto de Surfactante sobre la tasa de crecimiento de cultivos de fibroblastos en medio con SFB al 1%. Se cultivaron fibroblastos de pulmón humano en placas de cultivo de 96 pozos a una concentración de 15×10^3 células por pozo. Cada 48 horas se estimó el número de células mediante el ensayo de WST-1 (ver Material y Métodos). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Los círculos abiertos representan el crecimiento de fibroblastos crecidos con medio enriquecido con SFB al 10%. Los cuadrados a cultivos con medio con SFB al 1%. Los triángulos al cultivo crecido con medio enriquecido con SFB al 1% + Surfactante 500 $\mu\text{g/ml}$.

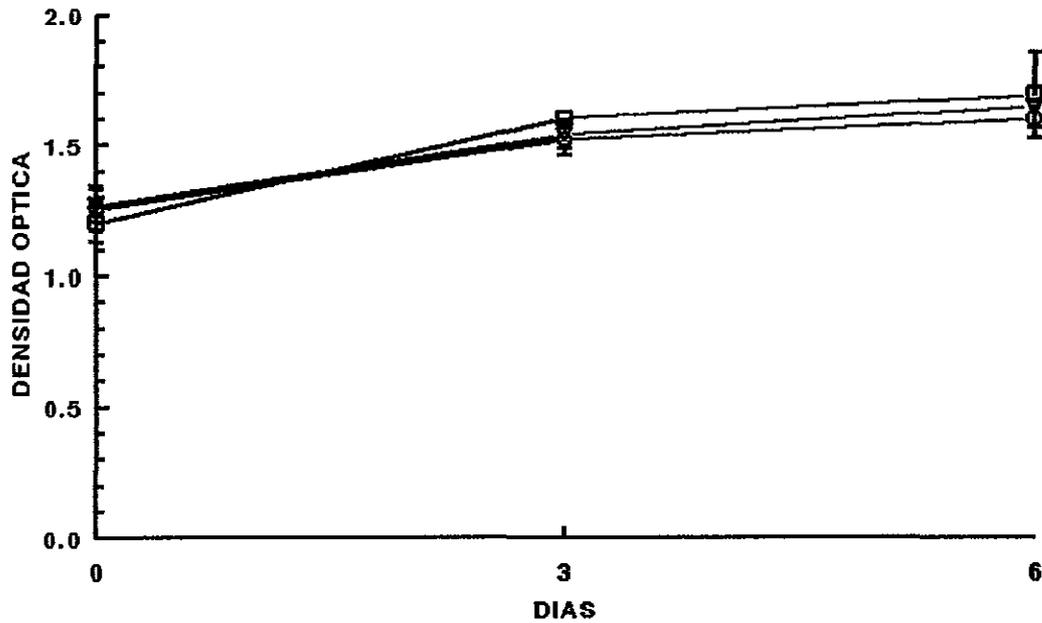


Figura 2.- Efecto de SP-A y SP-D sobre la tasa de crecimiento de cultivos de fibroblastos en medio con SFB al 1%. Se cultivaron fibroblastos de pulmón humano en placas de cultivo de 96 pozos a una concentración de 15×10^3 células por pozo. Cada 36 horas, se estimó el número de células mediante el ensayo de WST-1 (ver Material y Métodos). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Los cuadrados representan el crecimiento de fibroblastos crecidos con medio enriquecido con SFB al 1% (control). Los círculos a cultivos con medio con SFB al 1% + SP-A a 50 $\mu\text{g/ml}$. Los triángulos invertidos a cultivos crecidos con medio enriquecido con SFB al 1% + SP-D a 3 $\mu\text{g/ml}$.

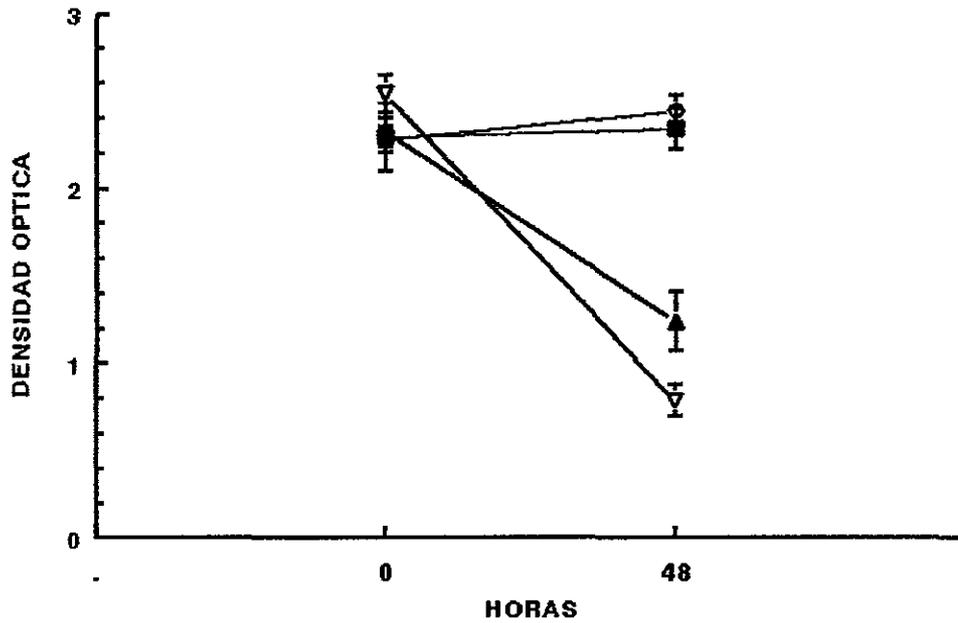


Figura 3.- Efecto de Surfacta a diferentes concentraciones sobre la tasa de crecimiento de cultivos de fibroblastos en medio sin suero. Se cultivaron fibroblastos de pulmón humano en placas de cultivo de 96 pozos a una concentración de 15×10^3 células por pozo. A las 48 h. se estimó el número de células mediante el ensayo de WST-1 (ver Material y Métodos). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Cuadrados cerrados: fibroblastos cultivados con medio sin suero (control). Círculos abiertos: fibroblastos incubados con 100 $\mu\text{g/ml}$ de Surfacta. Triángulos cerrados: fibroblastos incubados con 500 $\mu\text{g/ml}$ de Surfacta. Triángulos abiertos: incubación con 1000 $\mu\text{g/ml}$ de Surfacta.

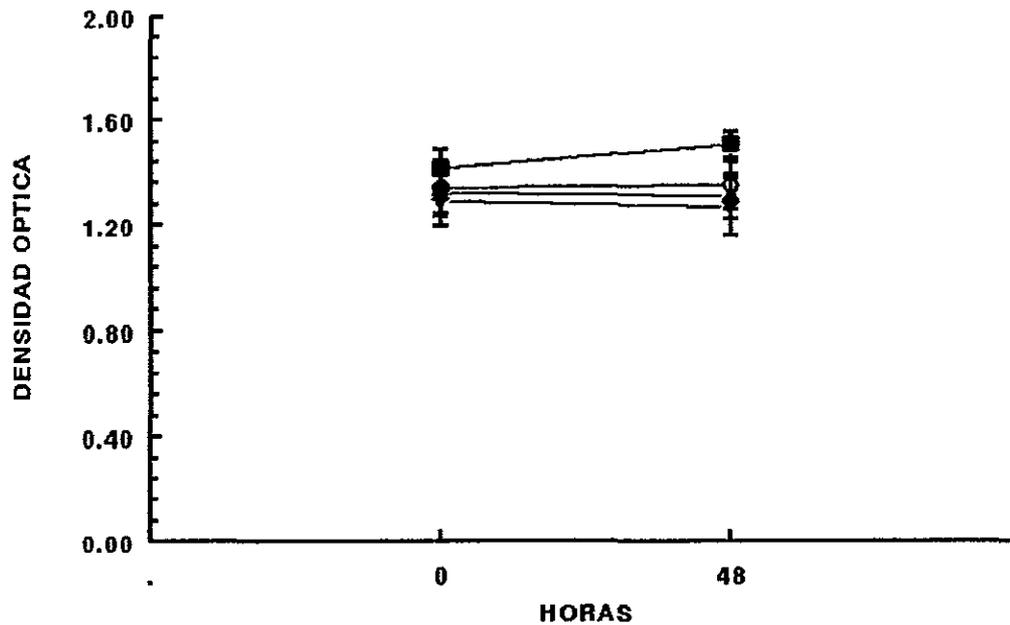


Figura 4.- Efecto de la SP-A sobre la tasa de crecimiento de cultivos de fibroblastos en medio sin suero. Se cultivaron fibroblastos de pulmón humano en placas de cultivo de 96 pozos a una concentración de 15×10^3 células por pozo. A las 48 h. se estimó el número de células mediante el ensayo de WST-1 (ver Material y Métodos). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Cuadrados cerrados: fibroblastos cultivados con medio sin suero (control). Círculos abiertos: fibroblastos estimulados con $10 \mu\text{g/ml}$ de SP-A. Triángulos cerrados: fibroblastos incubados con $50 \mu\text{g/ml}$ de SP-A. Triángulos abiertos: incubación con $100 \mu\text{g/ml}$ de SP-A.

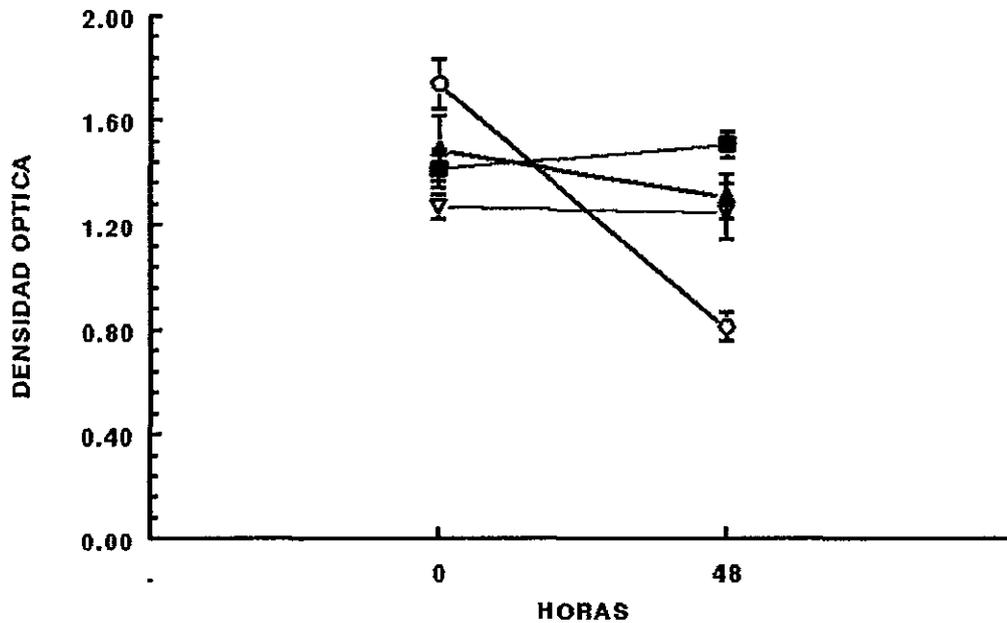


Figura 5.- Efecto de Surfactante y la SP-A sobre la tasa de crecimiento de cultivos de fibroblastos en medio sin suero. Se cultivaron fibroblastos de pulmón humano en placas de cultivo de 96 pozos a una concentración de 15×10^3 células por pozo. A las 48 h. se estimó el número de células mediante el ensayo de WST-1 (ver Material y Métodos). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Cuadrados cerrados: fibroblastos cultivados con medio sin suero (control). Círculos abiertos: fibroblastos expuestos a 500 $\mu\text{g/ml}$ de Surfactante. Triángulos abiertos: fibroblastos incubados con 50 $\mu\text{g/ml}$ de SP-A. Triángulos cerrados: incubación con 500 $\mu\text{g/ml}$ de Surfactante mas 50 $\mu\text{g/ml}$ de SP-A.

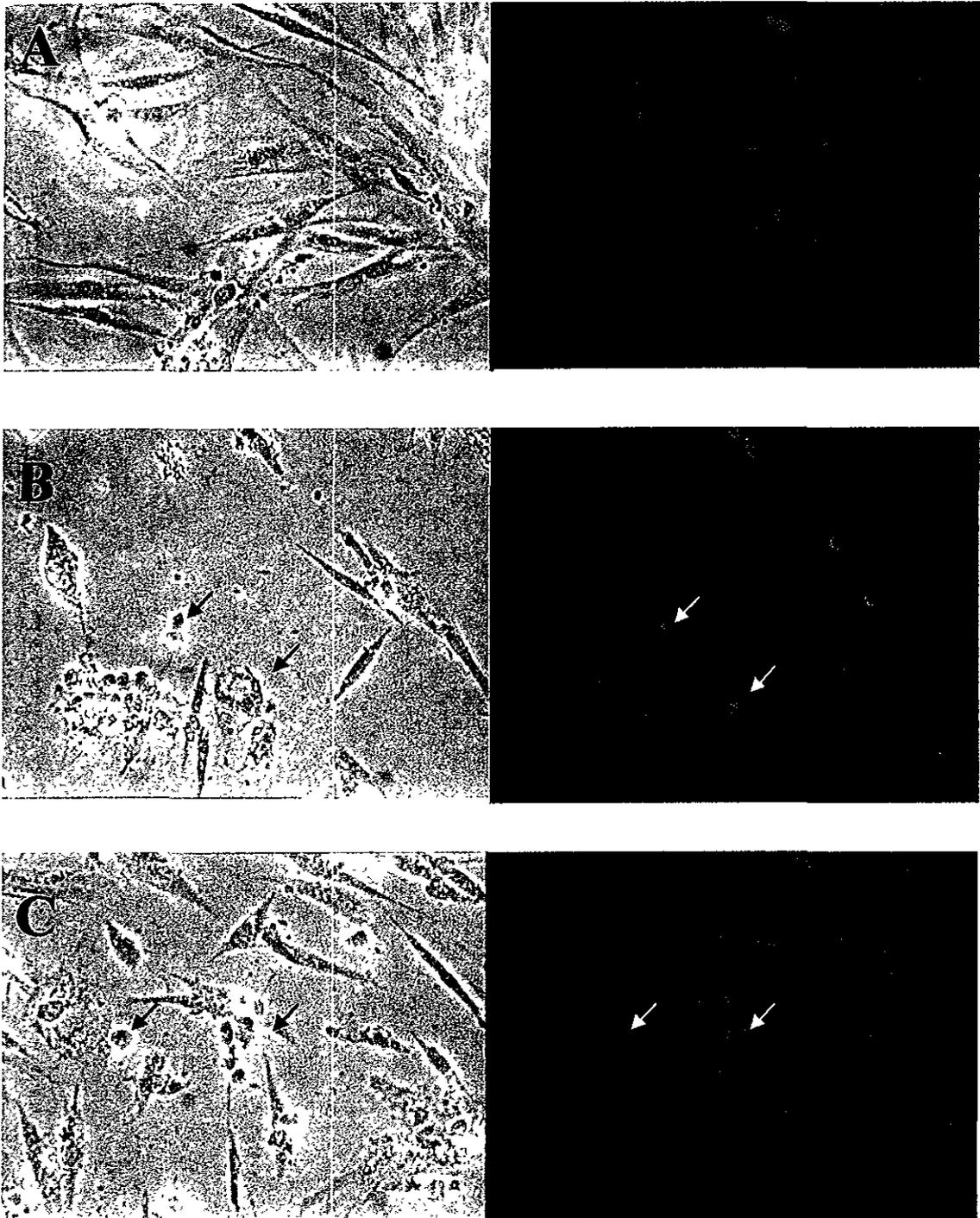


Figura 6.- Tinción nuclear con bromuro de etidio. Se incubaron fibroblastos de pulmón humano en cultivo a medio sin suero (A), medio sin suero mas 500 $\mu\text{g/ml}$ de Survanta (B) o medio sin suero mas 500 $\mu\text{g/ml}$ de Survanta y 50 $\mu\text{g/ml}$ de SP-A (C). Páneles derechos: núcleos teñidos con bromuro de etidio. Páneles izquierdos: microscopía con contraste de fases de los mismos campos. Las flechas indican las células apoptóticas.

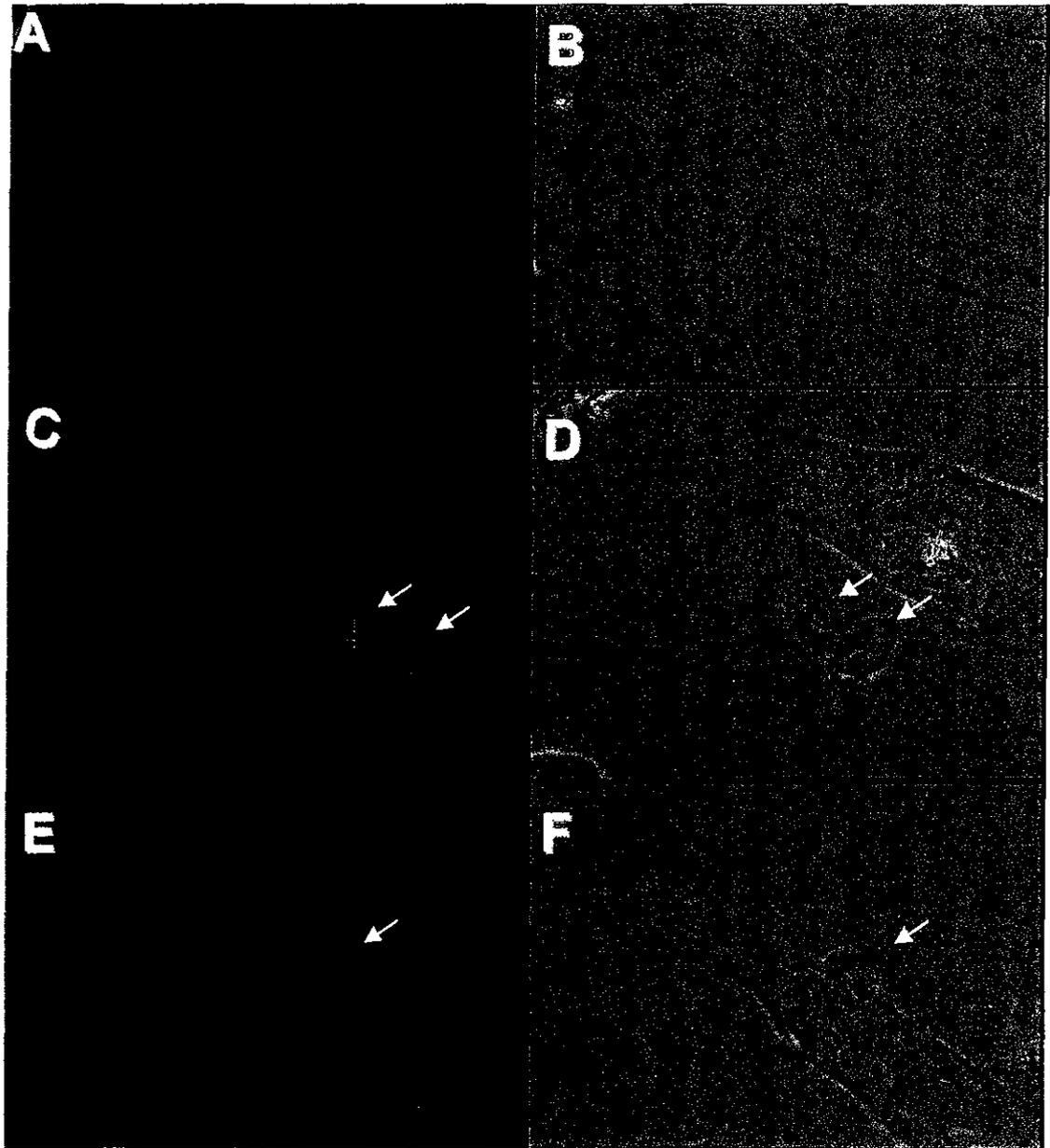


Figura 7.- Marcado distal de DNA (DNA end-labeling) mediante TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling*). A: Células control. C: fibroblastos expuestos a 500 µg/ml de Survanta. E: Fibroblastos expuestos a 500 µg/ml de Survanta mas 50 µg/ml de SP-A. Las células apoptóticas están indicadas con las flechas. Los paneles B, D y F representan la visión con contraste de fases de los mismos campos.

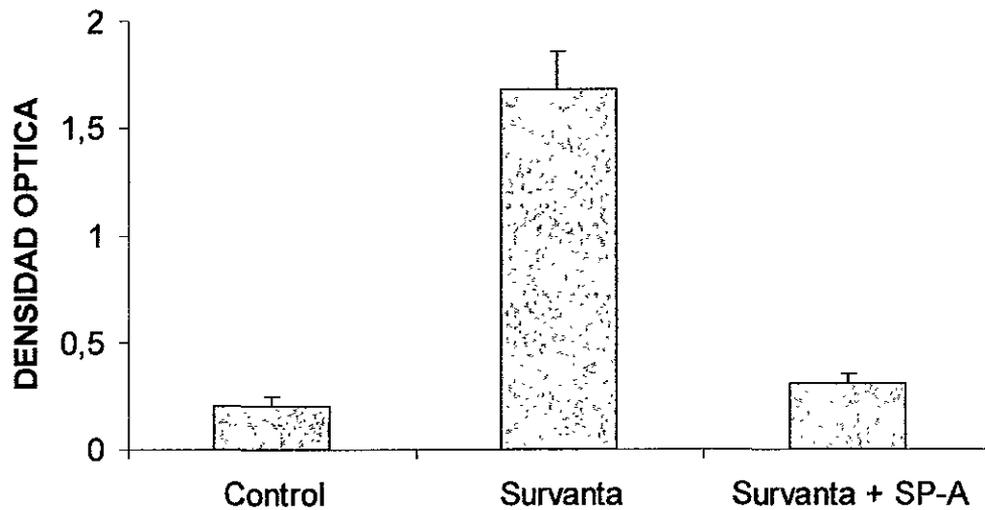


Figura 8.- Ensayo de ELISA para fragmentación de DNA en fibroblastos normales de pulmón humano. Los resultados están expresados como la absorbancia promedio \pm desviación estándar de células expuestas a medio sin suero (control), 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Survanta, y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Survanta mas 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de SP-A por 36 horas. Los procedimientos para este experimento están descritos en Material y Métodos. * $p < 0.01$.

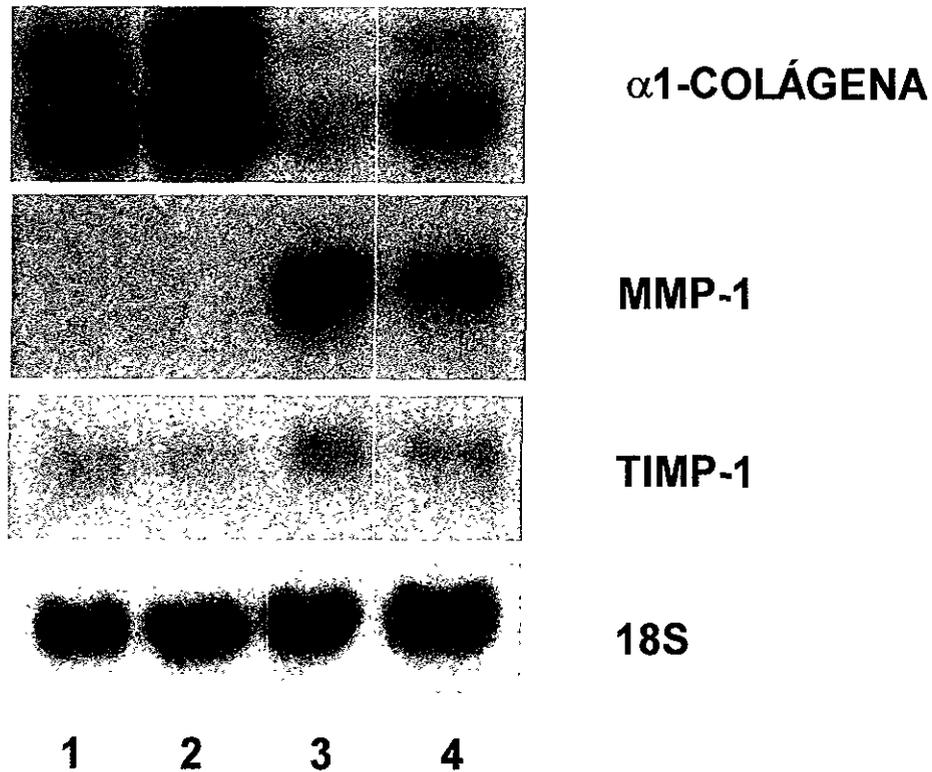


Figura 9.- Efecto de Surfactante, SP-A y Surfactante mas SP-A sobre la expresión génica de pro $\alpha 1(I)$ colágena, MMP-1 y TIMP-1. La imagen muestra un Northern blot representativo de 15 μg de RNA celular total extraídos de cultivos control (carril 1) y de fibroblastos estimulados. Los fibroblastos de pulmón humano normales subconfluentes fueron cultivados en medio sin suero y tratados con 50 $\mu\text{g/ml}$ de SP-A (carril 2), 500 $\mu\text{g/ml}$ de Surfactante (carril 3), o 50 $\mu\text{g/ml}$ de SP-A mas 500 $\mu\text{g/ml}$ de Surfactante (carril 4) por 48 horas.

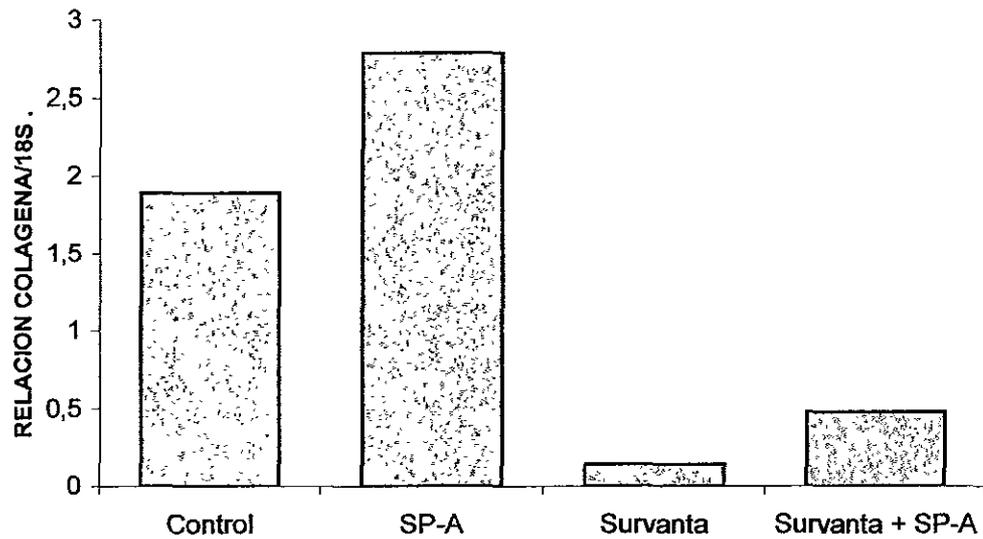


Figura 10.- Densitometría de la autorradiografía del Northern blot de la figura 9 para el transcrito de pro $\alpha 1(I)$ colágena. La longitud de las barras representan las relaciones entre las absorbancias de las señales de los transcritos de colágena y las señales de los transcritos del rRNA 18S de cada carril. Surfactante indujo una disminución en la expresión del mRNA de pro $\alpha 1(I)$ colágena de 10 veces. La SP-A aumento en 80% la expresión de colágena, y parcialmente revirtió los efectos de Surfactante.

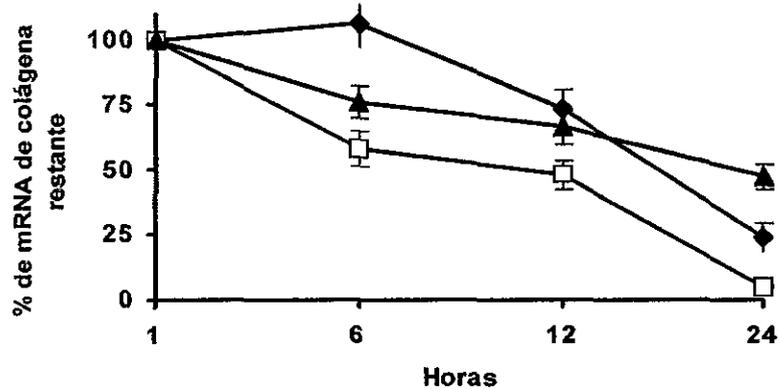


Figura 11.- Efecto de Survanta sobre la estabilidad del mRNA de pro $\alpha 1(1)$ colágena. Se mantuvieron cultivos subconfluentes de fibroblastos de pulmón humano normal en medio sin suero, y fueron tratados con actinomicina D (triángulos), Survanta (diamantes), y Survanta mas actinomicina D (cuadrados). Los resultados están mostrados como el porcentaje de mRNA de pro $\alpha 1(1)$ colágena restante contra tiempo y fueron derivados del análisis densitométrico de películas expuestas a los respectivos Northern blots. La relación $\alpha 1$ collagen/18S de células recolectadas antes del tratamiento con actinomicina D (tiempo cero) se tomó como el 100%, y los puntos subsecuentes después del tratamiento están expresados como porcentajes de ese valor. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de tres diferentes experimentos.

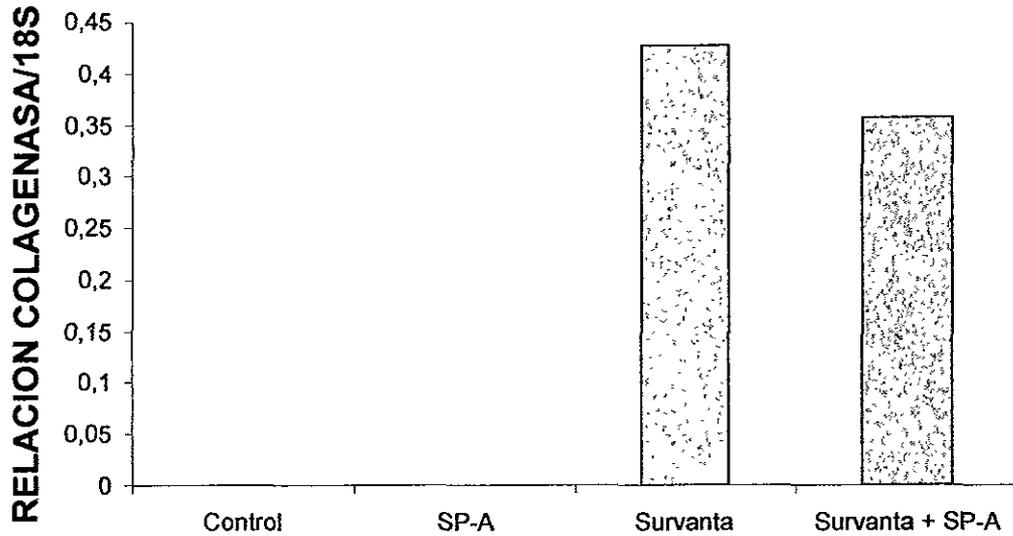


Figura 12.- Densitometría de la autorradiografía del Northern blot de la figura 9 para el transcrito de MMP-1. La longitud de las barras representan las relaciones entre las absorbancias de las señales de los transcritos de colagenasa y las señales de los transcritos del rRNA 18S de cada carril. Survanta estimuló fuertemente la expresión del mRNA de la MMP-1. La SP-A atenuó levemente los efectos de Survanta.

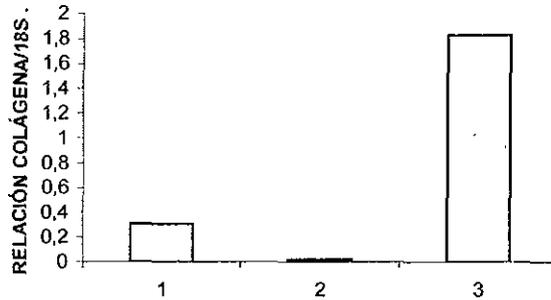
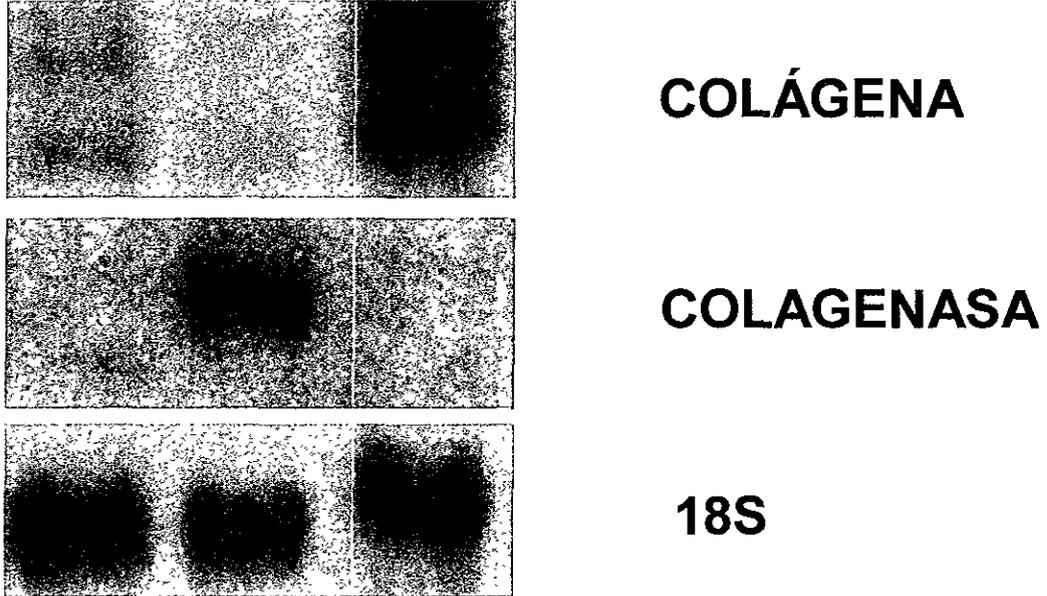


Figura 13.- Efecto de la SP-D sobre la expresión génica de pro α 1(I) colágena y MMP-1. La imagen muestra un Northern blot representativo de 15 μ g de RNA celular total extraídos de cultivos control (carril 1) y de fibroblastos estimulados. Los fibroblastos de pulmón humano normales subconfluentes fueron cultivados en medio sin suero y tratados con 3 μ g/ml de SP-D (carril 3) por 48 horas. Como control positivo para la expresión de colagenasa, se emplearon fibroblastos estimulados con FGF- α /heparina (carril 2) por 48 horas. La gráfica muestra la densitometría para el mRNA de pro α 1(I) colágena.

6 DISCUSIÓN

Durante mucho tiempo se consideró que el remodelamiento estructural de los pulmones en las neumopatías intersticiales difusas consistía básicamente en el engrosamiento de las paredes alveolares por fibrosis intersticial. Sin embargo, numerosas pruebas han mostrado que tanto en las NID como en las lesiones pulmonares agudas difusas, la fibrosis intraalveolar, caracterizada por proliferación de fibroblastos y acumulación de tejido conjuntivo intraluminal desempeña un papel muy importante (22, 23, 36, 46, 84). La fibrosis intraalveolar oblitera de manera irreversible los espacios aéreos y contribuye en forma importante al desarrollo de insuficiencia respiratoria. En este contexto, la búsqueda de factores intraalveolares que modulen la actividad de los fibroblastos y que tengan eventualmente un efecto antifibrosante ha cobrado importancia.

Se han identificado una variedad de citocinas que promueven la respuesta fibroproliferativa. Estas incluyen entre otras, al factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento parecido a la insulina y al factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Estas citocinas fibrogénicas favorecen la migración y proliferación de fibroblastos, y la acumulación de matriz extracelular (2, 3, 39, 52, 54,). Por el contrario, otras citocinas como el interferón γ y el factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-1), son capaces de inducir en fibroblastos un fenotipo antifibrogénico. Esto es, estos factores reducen la capacidad de proliferación o de síntesis de colágenas o incrementan la producción de enzimas que degradan el tejido conjuntivo (7, 33), y de este modo inhiben la respuesta fibrosante (27), aún cuando sus efectos parecen ser sobrepasados durante el desarrollo de la fibrosis.

Por otro lado, es posible que otros factores además de las citocinas estén involucrados en la regulación del remodelamiento de la matriz en el

pulmón, y los resultados de este trabajo sugieren que la sustancia tensioactiva pulmonar puede ser uno de ellos. Este hallazgo es muy importante porque aún cuando en condiciones normales los fibroblastos están confinados al intersticio, estas células pueden entrar en contacto con los componentes del surfactante cuando durante el proceso fibrogénico migran e invaden los espacios aéreos .

Previamente se había observado que preparaciones exógenas de surfactante, ya sea sintéticas o derivadas de fuentes naturales, inhiben la síntesis de DNA y la secreción de algunos mediadores de la inflamación de fibroblastos derivados de pulmón humano (85). Estas observaciones condujeron a establecer la hipótesis acerca del posible papel antifibrogénico del surfactante, y para explorar esta posibilidad se usó Survanta, un extracto natural de bovino enriquecido con tripalmitina y ácidos grasos, que ha demostrado ser eficaz en el campo clínico.

Nuestros resultados muestran que Survanta induce importantemente la expresión del mRNA de MMP-1, disminuye la expresión del mRNA de procolágena $\alpha 1(I)$ e induce la muerte celular programada en fibroblastos de pulmón humano normal *in vitro*. Estos hallazgos sugieren que el tensioactivo pulmonar induce un fenotipo antifibrogénico en fibroblastos pulmonares de humano y consecuentemente, es posible que este complejo lipoproteico pueda desempeñar algún papel en cuanto a prevenir la acumulación de colágenas fibrilares, el principal componente de la matriz extracelular en la remodelación fibrótica, en los espacios aéreos del parénquima pulmonar.

Por otro lado, tanto la SP-A como la SP-D inducen un aumento moderado en la expresión del mRNA de procolágena $\alpha 1(I)$ sin algún efecto aparente sobre la expresión génica de colagenasa (y TIMP-1 para el caso de la SP-A) como se observó con la técnica de hibridación empleada.

No obstante, cuando se mezclaron Survanta y la SP-A en el mismo cultivo, la presencia de la apoproteína atenuó parcialmente los efectos

inducidos por Survanta sobre la expresión del mRNA de procolágena $\alpha 1(I)$, así como en la inducción de apoptosis. Este aparente efecto antagónico entre las dos sustancias ha sido descrito en otros sistemas celulares, como linfocitos y macrófagos (43). El efecto contrario ejercido por SP-A pudiera ser debido a la interacción entre esta colectina y los lípidos del surfactante. En términos generales, estos resultados sugieren que el balance entre los componentes del surfactante pudiera desempeñar un papel importante en la respuesta integral a este complejo lipoproteico. En los casos en donde las cantidades de SP-A y/o SP-D estuvieran aumentadas en relación a los lípidos, se esperaría un estado que pudiera favorecer un fenotipo profibrosante.

En este sentido, es interesante destacar que en algunas neumopatías intersticiales difusas y en pacientes con insuficiencia respiratoria progresiva del adulto (SIRPA), se ha demostrado que existen cambios cuantitativos y cualitativos en la composición química y en la actividad de superficie del surfactante pulmonar (25, 71). Así por ejemplo, en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, se observaron niveles bajos de fosfolípidos totales en lavados broncoalveolares, y la gravedad de estos cambios correlacionaron con una fibrosis mas avanzada evaluada histopatológicamente (71). Además, en este mismo padecimiento se encontró que la relación SP-A/fosfolípidos totales estaba reducida en comparación con la observada en sujetos sanos. Pero el hallazgo más importante consistió en que la relación se encontraba *significativamente disminuida* en los enfermos que fallecieron en los primeros dos años después del diagnóstico, en comparación con los que sobrevivieron (53).

En el caso del SIRPA, las proteínas séricas presentes en el líquido de edema, especialmente el fibrinógeno, producen un deterioro en la actividad del agente tensioactivo en estos pacientes (74). Si, como se demostró *in vitro*, el surfactante tiene un efecto antifibrosante *in vivo*, las alteraciones fisicoquímicas producidas en la monocapa de este complejo lipoproteico pueden eventualmente contribuir al desarrollo de la fibrosis intraalveolar. En

este contexto, se puede especular que, además de reducir la tensión superficial de los alvéolos, el uso de surfactante en la clínica puede ser benéfico en cuanto a evitar la formación de fibrosis intraluminal.

Los mecanismos responsables de los cambios inducidos por Survanta en la expresión génica de la colágena y la colagenasa permanecen por explicarse. En relación a la colágena, los resultados obtenidos después de inhibir la transcripción *de novo* con actinomicina D, sugieren que Survanta regula al gene de pro α 1(I) colágena parcialmente a través de mecanismos postranscripcionales desestabilizando el mRNA. Así, los niveles pre-existentes de mRNA para la pro α 1(I) colágena parecen afectarse por un aumento en su recambio, disminuyendo su expresión.

Se han descrito una serie de factores que influyen sobre la estabilidad del mRNA mensajero para colágena y colagenasa. Algunas citocinas afectan la producción de colágena y colagenasa al alterar la estabilidad de los transcritos (8, 90). Los resultados de experimentos en donde la colagenasa se produjo constitutivamente con el promotor temprano del virus de simio 40, permiten concluir que la interleucina 1 β (IL-1 β) aumenta la estabilidad del transcrito al revertir los efectos desestabilizantes de algunas secuencias en la región 3' no traducida (89). También se han descrito factores nutricionales que afectan la estabilidad del mRNA para la colágena tipo I, específicamente alteraciones en la cantidad de aminoácidos intracelulares. En experimentos llevados a cabo en cultivos de fibroblastos humanos privados de aminoácidos, se observó una disminución de los niveles de mRNA de α 1(I) colágena; este efecto está mediado tanto por una disminución en la estabilidad del mRNA, como por disminución de la transcripción (45).

Los efectos producidos por Survanta se pueden deber a varios mecanismos. Los lípidos con frecuencia actúan influyendo sobre la fluidez de las membranas celulares. Alternativamente, otras moléculas que pueden formar parte en la composición de Survanta, pero que aún no se han

caracterizado, pueden tener algún papel. Por ejemplo, se ha demostrado recientemente que el preparado empleado en este trabajo contiene factor activador plaquetario (PAF) en cantidades farmacológicas (56). El PAF tiene efecto sobre el metabolismo de tejido conjuntivo, ya que se ha demostrado que es capaz de aumentar de manera dosis dependiente la expresión génica de fibronectina y colágena tipo IV en células mesangiales de rata y humano (72). Quizá algunas otras moléculas hidrofóbicas aún no descritas pudieran estar presentes en la preparación de fosfolípidos, y las prostaglandinas son buenos candidatos, pero no hay todavía estudios al respecto.

Aún cuando no se ha descrito el efecto del surfactante en fibroblastos humanos, en la literatura aparecen datos sobre el efecto de algunos lípidos sobre otros sistemas celulares. La dilinoleilfosfatidilcolina disminuye la activación de las células estrelladas hepáticas, como se deduce por la disminución en la actividad proliferativa, en la expresión de los mRNAs de actina y procolágena, y en la síntesis de colágena (65). En lipocitos de rata, la lecitina poliinsaturada impidió el aumento en la acumulación de colágena inducido por acetaldehído, no modificó el aumento en los niveles de mRNA de procolágena $\alpha 1(I)$ mediado por acetaldehído, pero aumentó la actividad de colagenasa (49). En un modelo de aterosclerosis en conejos, una dieta rica en colesterol produjo un aumento de la colágena tipo VIII, colágenas fibrilares, TGF- 1β , y de la MMP-1 en la adventicia (63).

Otra posibilidad es que los efectos observados pudieran estar mediados por citocinas producidas por los mismos fibroblastos después de ser estimuladas con Survanta o las apoproteínas. Así por ejemplo, se ha demostrado que la exposición de células mononucleares de sangre periférica a SP-A induce la secreción de TNF- α , IL- 1α , IL- 1β , e IL-6, sin mostrar ningún efecto sobre la producción de IFN- γ (42). Interesantemente, TNF- α e IL-6 son consideradas citocinas “profibrogénicas”, y al IFN γ como “antifibrogénico” (8, 15). Recientemente, un ensayo clínico preliminar mostró mejoría clínica

substancial en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática cuando el IFN γ -1b se utilizó en combinación con prednisona (97). Hasta el momento, no existen estudios sobre el papel de los componentes del surfactante sobre la secreción de citocinas por parte de los fibroblastos.

La inducción de apoptosis de los fibroblastos por Survanta es de particular interés. La recuperación de la lesión pulmonar depende de una reparación pronta, ordenada y efectiva de la barrera alvéolo-capilar, y del restablecimiento de la interfase aire-epitelio alveolar a través de la eliminación de las células mesenquimatosas intraalveolares. Hay observaciones recientes que sugieren que la muerte celular programada es el principal mecanismo responsable de la eliminación de los fibroblastos intraalveolares en pacientes cuya recuperación de una lesión pulmonar aguda fue satisfactoria, aún cuando los mecanismos mediante los cuales se induce la apoptosis permanecen desconocidos (64).

los resultados de este trabajo apoyan la posibilidad de que el surfactante pueda participar en este proceso. Cuando los experimentos se efectuaron con medio enriquecido con SFB al 1%, no se observaron cambios en la densidad celular en relación a los controles. Esto se puede interpretar como que la presencia de los factores de crecimiento presentes en el suero "compiten" con los factores responsables de la disminución en la densidad celular, pero con los datos presentados no es posible sacar ninguna conclusión a este respecto. Sin embargo, en ausencia de suero, se observó claramente un disminución en el número de células a las 48 horas, proceso que pareció ligado a un incremento en la apoptosis de fibroblastos.

En resumen, los hallazgos muestran que, por un lado, Survanta promueve la apoptosis de fibroblastos normales de pulmón humano e induce un aumento en la expresión génica de colagenasa intersticial y una disminución en la de la colágena tipo I, y por el otro, la SP-A y la SP-D tienen efectos opuestos al tensioactivo en algunas de estas actividades. Estos

resultados sugieren que los lípidos del surfactante proveen un medio hostil para los fibroblastos en la luz alveolar, induciendo apoptosis y llevando a estas células hacia un fenotipo antifibrogénico. La observación de un efecto contrario en las apoproteínas probadas sugiere que debe existir un balance crítico entre los componentes del surfactante en el microambiente alveolar, y que cambios en este balance pueden modificar el destino de estas señales químicas. Si alteraciones en este balance promueve la fibrosis y si la administración de surfactante exógeno puede ser útil para prevenir a aminorar la fibrosis *in vivo* son situaciones que no se conocen hasta la fecha.

7 CONCLUSIONES

- 1) El tensioactivo exógeno Survanta a las concentraciones probadas *in vitro* sobre fibroblastos normales de pulmón humano:
 - a) Induce la apoptosis en cultivos sin suero.
 - b) Disminuye la expresión génica de pro $\alpha 1(I)$ colágena.
 - c) Aumenta la expresión génica de colagenasa intersticial.
 - d) No produce cambios apreciables en la expresión génica de TIMP-1.
- 2) La SP-A a las concentraciones probadas *in vitro* sobre fibroblastos normales de pulmón humano:
 - a) Aumenta la expresión génica de pro $\alpha 1(I)$ colágena.
 - b) No produce cambios apreciables en la expresión génica de colagenasa intersticial en cepas no productoras de MMP-1.
 - c) No produce cambios apreciables en la expresión génica de TIMP-1
 - d) No afecta la tasa de crecimiento celular en cultivos sin suero.
- 3) La SP-D a las concentraciones probadas *in vitro* sobre fibroblastos normales de pulmón humano:
 - a) Aumenta la expresión génica de pro $\alpha 1(I)$ colágena.
 - b) No produce cambios apreciables en la expresión génica de colagenasa intersticial en cepas no productoras de MMP-1.
- 4) Cuando Survanta y la SP-A se encuentran mezcladas en los cultivos, a las concentraciones probadas *in vitro*, la apoproteína atenúa los efectos de Survanta sobre la apoptosis y la expresión génica de pro $\alpha 1(I)$ colágena y la colagenasa intersticial.

En conjunto, estos resultados sugieren que el Survanta puede tener un efecto antifibrosante *In vivo*

8 BIBLIOGRAFÍA.

1. Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 87:171, 1996.
2. Antoniadis, N.H., Bravo, M., Avila, R., Galanopoulos, T., Neville, J., M. Selman, M. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 86:1055-1064, 1990.
3. Aston, C., Jagirdar, J., Lee, T.C., Hur, T., Hintz, R.L., Rom, W.N. Enhanced insulin-like growth factor molecules in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151:1597-1603, 1995.
4. Avery, M.E., Mead, J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am. J. Dis. Child.* 97:517, 1959.
5. Basset, F., Ferrans, V.J., Takemura, T., Fukuda, Y., Crystal, R.G. Intraluminal fibrosis in interstitial lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. *Am. J. Physiol.* 269 (Lung Cell Mol Physiol 13):819-828, 1995.
6. Batenburg, J.J. Surfactant phospholipids: synthesis and storage. *Am. J. Physiol.* 262:L367-L385, 1992.
7. Becerril, C., Pardo, A., Montaña, M., Ramos, C., Ramírez, R., Selman, M. Acidic fibroblast growth factor (FGF-1) induces an antifibrogenic phenotype in human lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell. Molec. Biol.* 20:1020-1027, 1999.
8. Bienkowski, R.S., Gotklin, M.G. Control of collagen deposition in mammalian lung. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 209:118-140, 1995.
9. Birkedal-Hansen, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology* 7:728-735, 1995.

10. Bourbon J.R. Pulmonary surfactant – an overview. In: Bourbon J. R. Pulmonary Surfactant: Biochemical, Functional, Regulatory, and Clinical concept. CRS Press, Boston MA. 1991, pp. 2-10
11. Brown, J.C., Timpl, R. The collagen superfamily. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107:484, 1995.
12. Catanzaro, A., Richman, P. Batcher, S., Hallman, M. Immunomodulation by pulmonary surfactant. *J. Lab. Clin. Med.* 112:727-734, 1988.
13. Chomczynski, P., Sacchi, N. Single-step method or RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.. *Ann. Biochem.* 162:156-159, 1987.
14. Clements, J.A. Surface tension of lung extracts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 95:170-172, 1957.
15. Coker, R.K., Laurent, G.J. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. *Eur. Respir. J.* 11:1218-1221, 1998.
16. Dragovich, T., Rudin, C.M., Thompson, C.B. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene.* 17:3207-3213, 1998.
17. Dunsmore, S.E., Rannels, D.E. Extracellular matrix biology in the lung. *Am. J. Physiol* 270:L3-L27, 1996.
18. Farber, E. Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Mod. Pathol.* 7:605-609, 1994.
19. Floros, J., Kala, P. Surfactant proteins: molecular genetics of neonatal pulmonary disease. *Annu. Rev. Physiol.* 60:365-384, 1998.
20. Floros, J., Karinch, A.M. Human SP-A: then and now. *Am. J. Physiol* 268 (Lung Cell. Mol. Physiol. 12):L162-L165, 1995.
21. Freije, J.M.P., Díez-Itza, I., Balbín, M., Sánchez, L.M., Blasco, R., Tilivia, J., López-Otín, C. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel

- human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J. Biol. Chem.* 269:16766-16773, 1994.
22. Fukuda, Y., F. Basset, F., Ferrans, V.J., Yamanaka, N. Significance of early intra-alveolar fibrotic lesions and integrin expression in lung biopsy specimens from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum. Pathol.* 26:53-61, 1995.
23. Fukuda, Y., Ishizaki, M., Masuda, Y., Kimura, G., Kawanami, O., Masugi, Y. The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. *Am. J. Pathol.* 126:171-182, 1987.
24. Goldberg, G.I., Wilhem, S.M., Kromberger, A., Bauer, E.A., Grant, G. A., Eisen, A.Z. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation induced rat protein. *J. Biol. Chem.* 261:6600-6605, 1986.
25. Gregory, T.J., Longmore, W.J., Moxley, M.A., Whittset, J.A., Reed, C.R., Fowler, A. A., Hudson, L.D., Maunder, R.J., Crim, C., Hyers, T.M. Surfactant chemical composition and activity in acute respiratory distress syndrome. *J. Clin. Invest.* 88:1976-1981, 1991.
26. Griese, M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur. Respir. J.* 13:1455-1476, 1999.
27. Gurujeyalakshmi, G., Giri, S.N. Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: downregulation of TGF- β and procollagen I and III gene expression. *Exp. Lung Res.* 21:791-808, 1995.
28. Häfner, D., Germann P-G., Hauschke, D. Effects of rSP-C surfactant on oxygenation and histology in a rat-lung-lavage model of acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158:270-278, 1998.

29. Hamm, H., Kroegel, C., Hohlfeld, J. Surfactant: a review of its functions and relevance in adult respiratory disorders. *Respiratory Medicine* 90:251-270, 1996.
30. Hasty, K. A., Proudfoot, T.F., Goldberg, G.I., Thompson, J.P., Spinella, D.G., Stevens, R.M. Mainardi, C.L. Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 265:11421-11424, 1990.
31. Herbert Y. R. Interstitial lung diseases. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Mc Graw Hill companies. NY. 14th Edition. 1998, pp. 1082-1087.
32. Hills B.A. Physiological mechanisms for the action of pulmonary surfactant. In: *Bourbon J. R. Pulmonary Surfactant: Biochemical, Functional, Regulatory, and clinical concept*. Boston: CRS Press, 1991, pp. 185-224.
33. Jaffe, H.A., Gao, Z., Mori, Y., Li, L., Varga, J. Selective inhibition of collagen gene expression in fibroblasts by an interferon-gamma transgene. *Exp. Lung Res.* 25:199-215, 1999.
34. Johansson, J., Curstedt, T., Robertson, B. The proteins of the surfactant system. *Eur. Respir. J.* 7:372-391, 1994.
35. Karsenty, G., Park, R.W. Regulation of type I collagen genes expression. *Int. Rev. Immunol.* 12:177-185, 1995.
36. Katzenstein, A.L.A., Myers, J.L. Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical relevance of pathologic classification. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:1301-1315, 1998.
37. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-257, 1972.
38. Kerr, J.F.R. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* 105:13-20, 1971.

39. Khalil, N., O'Connor, R.N., Unruh, H.W., Warren, P.W., Flanders, K.C., Kemp, A., Berezney, O.H., Greenberg, A.H. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-TGF- β in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5:155-162, 1991.
40. Kivirikko, K.I. Collagen biosynthesis: a mini-review cluster. *Matrix Biol.* 16:355-356, 1998.
41. Klaus, M.H., Clements, J.A., Havel, R.J. Composition of surface active material isolated from beef lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47:1858, 1961.
42. Kremlev, S.G., Phelps, D.S. Surfactant protein A stimulation of inflammatory cytokine and immunoglobulin production.. *Am. J. Physiol.* 267 (Lung Mol. Cell. Biol. 11):L712-L719, 1994.
43. Kremlev, S.G., Umstead, T.M., Phelps, D.S. Effects of surfactant protein A and surfactant lipids on lymphocyte proliferation in vitro. *Am. J. Physiol.* 267:L357-L364, 1994.
44. Kremlev, S.G., Umstead, T.M., Phelps, D.S. Surfactant protein A regulates cytokine production in the monocytic cell line THP-1. *Am. J. Physiol.* 272 (Lung Mol. Cell. Biol. 16):L996-L1004, 1997.
45. Krupsky, M., Kuang, P., Goldstein, R.H. Regulation of type I collagen mRNA by amino acid deprivation in human lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272:13864-13868, 1997.
46. Kuhn III, C., Boldt, J., King, T.E., Crouch, E., Vartio, T., McDonald, J.A. An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140:1693-1703, 1989.
47. Kuroki, Y., Voelker, D.R. Pulmonary surfactant proteins. *J. Biol. Chem.* 269:25943-25946, 1994.
48. Laurent, G.J. Lung collagen: More than scaffolding. *Thorax* 41:418, 1986.

49. Li, J., Kim, C.I., Leo, M.A., Mak, K.M., Rojkind, M., Lieber, C.S. Polyunsaturated lecithin prevents acetaldehyde-mediated hepatic collagen accumulation by stimulating collagenase activity in cultured lipocytes. *Hepatology*. 15:373-381, 1992.
50. Majno, G., Joris, I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146:3-15, 1995.
51. Maldonado, V., Melendez, J., Gonzalez, H., Ortega, A. Internucleosomal DNA cleavage in HeLa cells exposed to cisplatin. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37:691-696, 1995.
52. Marinelli, W.A., Henke, C.A., Harmon, K.R., Hertz, M.I., Bitterman, P.B. Mechanisms of alveolar fibrosis after acute lung injury. *Clin. Chest Med.* 11:657-672, 1990.
53. McCormac, F.X., King, T.E., Bucher, B.L., Nielsen, L., Mason, R.J. Surfactant protein A predicts survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152:751, 1995.
54. Miyazaki, Y., Araki, K., Vesin, C., Garcia, I., Kapanci, Y., Whitsett, J.A., Pigué, P.F., Vassalli, P. Expression of a tumor necrosis factor-TGF- β transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis. *J. Clin. Invest.* 96:250-259, 1995.
55. Montaña, M., Ramos, C., González, G., Vadillo, F., Pardo, A., Selman, M. Lung collagenase inhibitors and spontaneous and latent collagenase activity in idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 96:1115-1119, 1989.
56. Moya, F.R., Hoffman, D.R., Zhao, B. Johnston, J.M. Platelet-activating factor in surfactant preparations. *Lancet* 341:858-860, 1993.
57. Murphy, G. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Acta Orthopedic Scandinavian (Suppl 266)* 66:55-60, 1995.

58. Nuñez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., Inohara, N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 17:3237-3245, 1998.
59. Pardo, A., Selman, M. Matrix metalloproteinases and lung injury. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:1109-1115, 1996.
60. Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteinases in the pathogenesis of lung injury. In: *Collagenases*. Hoeffler W, ed. R.G. Landes Co., Georgetown TX EUA, pp. 221-239, 1999.
61. Pardo, A., Selman, M., Ramírez, R., Ramos, C., Montaña, M., Stricklin, G., Raghu, G. Production of collagenase and fibrotic human lungs. *Chest* 102:1085-1089, 1992.
62. Pattle, R.E. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature*. 175:1125-1126, 1955.
63. Plenz, G., Dorszewski, A., Breithardt, G., Robenek, H. Expression of type VIII collagen after cholesterol diet and injury in the rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 12:1201-1209, 1999.
64. Polunovsky, V.A., Chen, B., Henke, C., Snover, D., Wendt, C., Ingbar, D.H., Bitterman, P.B. Role of mesenchymal cell death in lung remodeling after injury. *J. Clin. Invest.* 92:388-397, 1993.
65. Ponjachik, J., Baraona, E., Zhao, J., Lieber, C.S. Dilinoleoylphosphatidylcholine decreases hepatic stellate cell activation. *J. Lab. Clin. Med.* 133:342-348, 1999.
66. Possmayer, F. A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138:990-998, 1988.
67. Postlethwaite, A.E., Kang, A.H. Fibroblasts and matrix proteins. In: Gallin, J.I., Goldstein, I.M., Snyderman, R. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. 2^a Ed. Raven Press, Ltd. New York. 1992, pp. 747-773.

ESTA
SALIR
TRABAJE
NO
DEBE
PROTECTOR

68. Pramanik, A.K., Holtzman R.B., Merrit, T.A. Tratamiento de reposición del agente tensioactivo en caso de enfermedades pulmonares. Clin. Ped. Nort. 4:1011-1033, 1993.
69. Radford, E.P. Jr. Method for estimating respiratory surface area of mammalian lungs from their physical characteristics. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 87:58, 1954.
70. Raghu, G., Striker, L.J., Hudson, L.D., Striker, G.E. Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. Am. Rev. Respir. Dis. 131:281-289, 1985.
71. Robinson, P.C., Watters, L.C., King, T.E., Mason, R.J. Idiopathic pulmonary fibrosis abnormalities in bronchoalveolar lavage fluid. Am. Rev. Respir. Dis. 137:585-591, 1988.
72. Ruiz-Ortega, M., Largo, R., Bustos, C., Gomez-Garre, D., Egido, J. Platelet-activating factor stimulates gene expression and synthesis of matrix proteins in cultured rat and human mesangial cells: role of TGF-beta. J. Am. Soc. Nephrol. 8:1266-1275, 1997.
73. Saraste, A., Pulkki, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovasc Res 45:528-537, 2000.
74. Seeger, W.N., Elssner, A., Gunther, A., Kramer, H.J., O. Kalinowski, H.O. Lung surfactant phospholipids associate with polymerizing fibrin: loss of surface activity. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 9:213-220, 1993.
75. Selman M. Pulmonary Fibrosis: Human and experimental disease. In: Focus on Connective Tissue in Health and disease. M. Rojkind de. Vol. I, CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida, 1989, pp123-188.
76. Selman M. Neumopatías intersticiales difusas. Editorial Médica Panamericana, México, 1996, pp. 11-33.
77. Selman, M., Montaña, M, Ramos, C, Barrios, R, Pérez-Tamayo, R. Experimental pulmonary fibrosis induced by paraquat plus oxygen in rats: a

- morphological and biochemical sequential study. *Exp. Molec. Pathol.* 50:147-166, 1989.
78. Selman, M., Montaña, M., Ramos, C., Chapela, R. Concentration, biosynthesis and degradation of collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 41:355-359, 1986.
79. Selman M. Pardo A. Pathogenic mechanisms in pulmonary fibrosis. Inc: *Internacional Asbestos Medical Research; Vol 6 of the Sourcebook on asbestos Diseases.* Peters and Peters, eds., Butterworth Legal Publishers, EUA., pp 3-34, 1991.
80. Selman, M., Pardo, A. Potential role of proteases in pulmonary fibrosis. *Annals New York Acad. Of Sci.* 624:297-306, 1991.
81. Skalka, M., Matyasova, J., Cejkova, M. DNA in chromatin or irradiated lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments. *FEBS Lett.* 72:271-274, 1976.
82. Snyder, L.S., Hertz, M.I., Peterson, M.S., Harmon, K.R., Marinelli, W.A., Henke, C.A., Greenheck, J.R., Chen, B. Bitterman, P.B. Acute lung injury. Pathogenesis of intraalveolar fibrosis. *J. Clin. Invest.* 88:663-673, 1991.
83. Spear, F.G., Glücksman, A. The effect of gamma radiation of cells in vivo: single exposures of the normal tadpole at room temperature. *Br.J. Radiol.* 11:533-553, 1938.
84. Svec, K., White, J., Vaillant, P., Jessurun, J., Roongta, U., Krumwiede, M., Johnson, D. Acute lung injury fibroblast migration and invasion of a fibrin matrix is mediated by CD44. *J. Clin. Invest.* 98:1713-1727, 1996.
85. Thomassen, M.J., Antal, J.M., Barna, B.P., Divis, L.T., Meeker, D.P., Wiedemann, H.P. Surfactant downregulates synthesis of DNA and inflammatory mediators in normal human lung fibroblasts. *Am. J. Physiol.* 270 (Lung Cell Mol Physiol 14):159-163, 1996.

86. Uhal, B.D., Joshi, I., Mundle, S., Raza, A., Pardo, A., Selman, M. Fibroblasts isolated after fibrotic injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. *Am. J. Physiol.* 269 (Lung Cell Mol Physiol 13):819-828, 1995.
87. van Iwaarden, J.F., Shimizu, H., van Golde P.H.M., Voelker, D.R., van Golde, L.M.G. Rat surfactant protein D enhances the production of oxygen radicals by rat alveolar macrophages. *Biochem. J.* 286:5-8, 1992.
88. Vidyasagar, D., Raju, T.N., Shimada, S., Maeta, H. Surfactant replacement therapy: clinical and experimental studies. *Clin. Perinatol.* 14:713-736, 1987.
89. Vincenti, M.P., Coon, C.I., Lee, O., Brinckerhoff, C.E. Regulation of collagenase gene expression by IL-1 beta requires transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 22:4818-27, 1994.
90. Vincenti, M.P., White, L.A., Schroen, D.J., Benbow, U., Brinckerhoff, C.E. Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene. Expr.* 6:391-411, 1996.
91. Wang, R., Ramos, C., Joshi, I., Zagariya, A., Pardo, A., Selman, M., Uhal, B.D. Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *Am. J. Physiol.* 277(6 Pt 1):L1158-L1164, 1999.
92. Wang, R., Zagariya, A., Ang, E., Ibarra-Sunga, O., Uhal, B.D. Fas-induced apoptosis of alveolar epithelial cells requires ANG II generation and receptor interaction. *Am. J. Physiol.* 277(6 Pt 1):L1245-L1250, 1999.
93. Webb, S.J., Harrison, D.J., Wyllie, A.H. Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. *Adv. Pharmacol.* 41:1-34, 1997.

94. Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142:67-77, 1984.
95. Yamada, T., Ohyama, H., Kinjo, Y., Watanabe, M. Evidence for the internucleosomal breakage of chromatin in rat thymocytes irradiated in vitro. *Radiat. Res.* 85:544-553, 1981.
96. Zhivotovsky, B.D., Zvonareva, N.B., Hanson, K.P. Characteristics of rat thymus chromatin degradation products after whole body X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 39:437-440, 1981.
97. Ziesche, R., Hofbauer, E., Wittmann, K., Petkov, V., Block, L. A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *New Eng. J. Med.* 341:1264-1269, 1999.