



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**INFLUENCIA DE LA OBESIDAD SOBRE EL DESARROLLO DE  
FIBROSIS PULMONAR EXPERIMENTAL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

**PRESENTA**

**BIÓL. ABIGAIL MORALES SÁNCHEZ**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO SEMO**

**MEXICO, D.F.**

**ENERO 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/002/10

ASUNTO: Oficio de Jurado

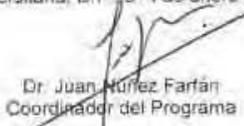
Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 29 de junio de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **MORALES SANCHEZ ABIGAIL** con número de cuenta **99196556** con la tesis titulada **"Influencia de la obesidad sobre el desarrollo de fibrosis pulmonar experimental,"** realizada bajo la dirección del (la) **DRA. ANNIE PARDO SEMO**:

Presidente:	DRA. TERESA I. FORTOUL VAN DER GOES
Vocal:	DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA
Secretario:	DRA. ANNIE PARDO SEMO
Suplente:	DR. MOISES EDUARDO SELMÁN LAMA
Suplente:	DR. GUILLERMO ROBLES DÍAZ

Sin otro particular, me es grato enviarte un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 4 de enero de 2010.

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa



JNF/DCRV/ASR/mnm

## ***Agradecimientos***

**Agradezco a las siguientes instituciones por su apoyo en la realización de este trabajo:**

- ❖ Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme la oportunidad de pertenecer a su distinguido programa.**
- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (No. de registro 210493).**
- ❖ A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el financiamiento al macroproyecto SDI.PTID.05.6 con el cual fue apoyado este trabajo.**
- ❖ Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) por la aportación de reactivos y material biológico.**
- ❖ A la Coordinación de Estudios de Posgrado-UNAM y al Posgrado en Ciencias Biológicas por el Apoyo Económico del Programa de Fomento a la Graduación.**

**Por su invaluable apoyo agradezco de manera muy especial a mi Tutora:**

**Dra. Annie Pardo Semo**

**A los miembros de mi Comité tutorial:**

**Dra. Marcia Hiriart Urdanivia**

**Dr. David Kershenobich Stalinikowitz**

**Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo del Dr. Moisés Selman Lama**

## ***Agradecimientos***

*A la UNAM por darme la oportunidad de pertenecer a esta prestigiada institución, no terminaría de escribir todo lo que me ha dado mi querida universidad y por lo cual le estoy profundamente agradecida.*

*A mi tutora la Dra. Annie Pardo porque siempre me apoyó en todos los sentidos, “gracias por enseñarme que todo se aprende y que todo esfuerzo es al final recompensa, la aprecio y la respeto mucho”.*

*Al Dr. Selman por su interés en mi trabajo y su buena disposición, “siempre será un gran ejemplo para mí”.*

*A mis compañeros de laboratorio del INER: Marco, Lalo, Ery, Alfredo, Hilda, Caro, Anita, Nacho, Rafa, Diana, Dra. Martha, Dr. Carlos, Paty, Iliana, Karina, Miguel Angel, Miguel Cid, Arnoldo y Gustavo por su apoyo en el laboratorio y su amistad.*

*De manera especial quiero agradecer a Víctor y a Pepe porque a pesar de todas sus ocupaciones siempre tuvieron tiempo para explicarme y enseñarme las técnicas como si fueran mis tutores, gracias también por la bella amistad que me brindaron.*

*A Lupita y Ery por su gran ayuda y su paciencia con mis trabajos de morfología. Gracias al Dr. Arreola por todas sus enseñanzas y su tiempo para operar mis ratas. Gracias al personal del bioterio por estar siempre en la mejor disposición de ayudarme, especialmente a Isra, a Poncho y al Dr. Pizaña.*

*A mis siempre amigos y maestros del Laboratorio de Bioquímica: Reme y Jorgito. Gracias también a mis compañeros Adrián, Luis, Paul, Isabel, pero sobre todo gracias a David por toda su ayuda en mis experimentos.*

*A Víctor Navarro, Félix, Myrian, Charly y Carmen del Instituto de Fisiología; a Gaby y Lety del Hospital General, por su valiosa contribución a mi proyecto.*

## ***Agradecimientos***

*A mi mamá “porque has estado conmigo en todo momento y durante la maestría disfrutaste mis alegrías y compartiste mis tristezas y preocupaciones como si fueran tuyas, por eso este logro definitivamente es de las dos. Gracias ma por todo tu amor, tus oraciones y tu apoyo incondicional, eres sin duda la mejor mamá del mundo”.*

*A mi papá, “lo intenté muchas veces pero no encontré las palabras adecuadas para expresarte mi agradecimiento. Te amo pa”.*

*A Mar, René, Yova, Sandy y Mary “porque me han apoyado siempre y han estado conmigo a pesar de mí, ustedes son la familia que todos desearían tener, soy muy afortunada por tenerlos a mi lado, esto no hubiera sido posible sin su apoyo, los quiero mucho, mucho, mucho”.*

*Gracias también a Raulito, “por todo tu apoyo, sabes que tienes un lugar muy especial en nuestros corazones”. A Laura, Isra y Luis por su cariño y amistad.*

*A Andresito, Arleth, Oswa, Marianita, Mariel, Mony e Iván por darme mucha alegría y mucha lata. Gracias a Verito “por tu agradable compañía y tus ocurrencias”.*

*Quiero agradecer de manera muy especial a mi abuelita Luz, “porque siempre tuviste para mí una tierna caricia, una palabra de aliento, un sabio consejo, una fervorosa oración y sobre todo un profundo amor, abue sé que me sigues cuidando desde algún lugar, siempre vas a vivir en mi corazón”.*

*A Marina “por tu cariño y tu apoyo desde que inicié la carrera, te queremos mucho Mary, eres un miembro más de nuestra familia”. A Artur, “por tu ayuda técnica, tu buena disposición y tu cariño”.*

*A mi tías Cristina y Julia por su cariño y sus oraciones.*

## ***Agradecimientos***

*A mi Jona, “por ser sobre todo un verdadero amigo, por escucharme, por tus palabras de aliento, por tu apoyo incondicional en todos mis proyectos, por darle mucho amor y sabor a mi vida, TAMYAMTF”.*

*A Pau, “gracias por tu cariño, por tu tiempo para escucharme, por tus consejos y por tu apoyo en momentos difíciles”.*

*A mis amigos Román y Carlos, “por nuestra valiosa amistad que a lo largo de los años ha ido creciendo y madurando”.*

Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,  
la electricidad y la energía atómica: la voluntad.

Albert Einstein (1879-1955) *Científico alemán nacionalizado estadounidense*

Aprendí que no se puede dar marcha atrás, que la esencia de la vida es ir hacia adelante. La vida, en realidad, es una calle de sentido único.

Agatha Christie (1891-1976) *Novelista inglesa.*

*Esta tesis está dedicada a la porción de cielo y fuente de sabiduría  
Que me dio la vida y fue un verdadero oasis de amor.  
“Sigues viviendo en mi corazón”.*

# ÍNDICE

	<i>Pág.</i>
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	3
<b>Introducción</b> .....	5
Fibrosis pulmonar.....	5
Fibrosis pulmonar experimental.....	12
La obesidad.....	14
Obesidad y enfermedades respiratorias.....	21
<b>Planteamiento del problema</b> .....	25
<b>Objetivo</b> .....	27
<b>Hipótesis</b> .....	27
<b>Materiales y métodos</b> .....	28
Animales.....	28
Dieta alta en carbohidratos.....	28
Obtención de plasma periférico.....	28
Determinación de glucosa.....	29
Ensayo de ELISA para insulina.....	29
Cuantificación de triglicéridos.....	30

Inducción de fibrosis pulmonar experimental.....	30
Sacrificio y obtención de tejidos .....	31
Cuantificación de hidroxiprolina.....	31
Análisis estadísticos.....	32
<b>Resultados.....</b>	<b>33</b>
Dieta alta en sacarosa, registro del peso.....	33
Determinación de glucosa, insulina y triglicéridos .....	33
Medición de la grasa abdominal.....	36
Cuantificación de hidroxiprolina.....	36
<b>Discusión y conclusiones.....</b>	<b>38</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>43</b>
<b>Apéndice... ..</b>	<b>58</b>

## RESUMEN

La fibrosis pulmonar es el resultado final de una serie de alteraciones intersticiales y se caracteriza por la activación y la proliferación de fibroblastos/miofibroblastos, una acumulación exagerada de matriz extracelular y una desorganización de la arquitectura pulmonar que interfiere con la función del órgano.

La obesidad por otro lado, representa un importante problema de morbilidad que ha ido incrementando en todo el mundo y que se define en términos de índice de masa corporal mayor a  $30 \text{ Kg/m}^2$ . Los mecanismos que contribuyen a la obesidad son complejos, en ellos interactúan componentes conductuales y procesos hormonales, genéticos y metabólicos.

La diabetes mellitus puede presentarse como consecuencia de la obesidad ya que la ingesta de ácidos grasos saturados y monoinsaturados incrementa la posibilidad de desarrollar este padecimiento. Se ha sugerido que, la diabetes mellitus puede ser un factor de riesgo para fibrosis pulmonar idiopática (FPI), sin embargo, hay escasa información en relación a la asociación entre ellas.

El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia de la obesidad en el desarrollo de fibrosis pulmonar experimental inducida por bleomicina en ratas Wistar.

Ratas de 8 semanas de edad se sometieron a la ingesta a libre demanda de sacarosa al 20% en el agua para beber durante 4 meses (SAC) y el grupo control (C) recibió agua normal. El peso corporal fue registrado al inicio y luego cada mes. Al tercer mes de tratamiento se cuantificaron los niveles de glucosa,

insulina y triglicéridos en el plasma y se realizó la inducción de fibrosis pulmonar mediante la instilación intratraqueal de bleomicina. Un conjunto de animales de ambos grupos recibió solución salina como control de instilación. Un mes después de la instilación los animales fueron sacrificados, se determinó la grasa abdominal y se aisló el pulmón izquierdo para la cuantificación de hidroxiprolina.

Los resultados mostraron que los niveles de triglicéridos (TG) y grasa fueron significativamente más altos en ratas que consumieron sacarosa en comparación con las controles (TG:  $115 \pm 24$  vs  $259 \pm 70$  mg/dl;  $p < 0.05$ ; grasa:  $4.9 \pm 1.6$  vs  $8.0 \pm 3.3$  g,  $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias en el peso, glucosa e insulina entre ratas normales y con sacarosa. Las ratas expuestas a bleomicina presentaron aumento en la concentración de colágena medida por los niveles de hidroxiprolina que fue significativamente mayor que las ratas control ( $1358 \pm 207$  vs  $2366 \pm 302$   $\mu$ g/pulmón izquierdo,  $p < 0.01$ ). Las ratas que recibieron sacarosa y bleomicina mostraron una menor acumulación de hidroxiprolina que su respectivo grupo control ( $2366 \pm 302$  vs  $2085 \pm 319$   $\mu$ g/pulmón izquierdo,  $p < 0.05$ ), esto sugirió que un aumento en la cantidad de grasa y/o niveles elevados de TG podrían estar participando en la protección contra la fibrosis pulmonar. Más estudios en relación con los mecanismos involucrados son necesarios.

## ABSTRACT

Lung fibrosis is the final result of a diverse group of interstitial lung diseases, characterized by the activation and proliferation of fibroblast/myofibroblast cells, exaggerated accumulation of extracellular matrix and disorganization of lung architecture interfering with the organ function.

On other hand, obesity is an important morbidity problem that has been increasing worldwide and it is defined as an BMI (body mass index) greater than 30 kg/m<sup>2</sup>. The mechanisms that contribute to obesity are complex and involve behavioral, hormonal, genetic, and metabolic components.

Diabetes mellitus may occur as a consequence of obesity since the intake of saturated and monounsaturated fatty acids increases the possibility of developing this condition. It has been suggested that diabetes mellitus may be a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) however, there is little information regarding the association between them.

The aim of this work was to evaluate the influence of obesity on the development of experimental pulmonary fibrosis induced by bleomycin in Wistar rats.

Male rats (8 weeks old) were supplied *ad libitum* with a solution of 20% sucrose for four months (SUC). Control group (C) received water. Body weight was recorded at baseline and then monthly. At the end of the third month of treatment, glucose, insulin and triglyceride levels were quantified in plasma, and pulmonary fibrosis was induced by intratracheal instillation of bleomycin. Control groups were exposed to saline instillation. Animals were sacrificed one month

after instillation, abdominal fat was measured and the left lung was isolated for hydroxyproline determination.

The result showed that levels of triglycerides (TG) and fat were significantly higher in rats that consumed sucrose in comparison with the controls (TG:  $115 \pm 24$  vs  $259 \pm 70$  mg/dl;  $p < 0.05$ ; fat:  $4.9 \pm 1.6$  vs  $8.0 \pm 3.3$  g,  $p < 0.05$ ). No significant differences were found in weight, glucose and insulin. Rats exposed to bleomycin showed increased concentrations of collagen measured by hydroxyproline levels, which were significantly higher than in control rats ( $1358 \pm 207$  vs  $2366 \pm 302$   $\mu$ g/left lung,  $p < 0.01$ ). Animals that received sucrose and bleomycin showed significantly less accumulation of hydroxyproline than the respective control group  $2366 \pm 302$  vs  $2085 \pm 319$   $\mu$ g/left lung,  $p < 0.05$ ). These results suggest that an increase in the amount of fat and/or high levels of triglycerides may be involved in the protection against pulmonary fibrosis. Further studies to analyze the possible mechanisms are needed.

## INTRODUCCIÓN

### *Fibrosis pulmonar*

La fibrosis pulmonar es el resultado final común de una serie de enfermedades pulmonares intersticiales, que abarcan muchos tipos de daño pulmonar incluyendo los que resultan de la inhalación de polvo, partículas orgánicas (neumonitis por hipersensibilidad), inorgánicas (asbestosis), el uso de radiación y de algunos medicamentos quimioterapéuticos como la bleomicina, o bien asociada a enfermedades colágeno vasculares como la esclerosis sistémica y la artritis reumatoide y de las enfermedades pulmonares intersticiales de la infancia (1, 2).

Por otro lado, alrededor del 50% de los desórdenes pulmonares intersticiales son de etiología desconocida y son clasificados como neumonías intersticiales idiopáticas (3). Entre ellas, la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la forma más agresiva, afecta predominantemente a individuos mayores de 50 años, es irreversible y habitualmente letal en un plazo corto de tiempo (4). De hecho se estima que la mitad de los pacientes con esta enfermedad mueren en dos a tres años después del diagnóstico (5).

En términos simples, la fibrosis pulmonar puede describirse como una forma de cicatrización aberrante que compromete el intercambio gaseoso en las unidades alveolo-capilares del pulmón. Sin embargo, la investigación de los últimos años ha mostrado que durante la fibrosis ocurren en el pulmón un conjunto complejo de trastornos morfofisiológicos, que involucran la participación de una gran variedad de moléculas, las cuales dirigen la

alteración de procesos biológicos en diferentes tipos celulares con la consecuente pérdida de la homeostasis celular, tisular y sistémica.

Los eventos moleculares que ocurren en la patogénesis de la fibrosis pulmonar, no se conocen con precisión. La visión clásica considera que en los desórdenes fibroproliferativos las alteraciones en los tejidos y órganos son consecuencia de la acción inespecífica de mediadores inflamatorios en respuesta a un daño inicial. Sin embargo, nuestro grupo de trabajo ha propuesto que existen al menos dos rutas patogénicas para el desarrollo de fibrosis pulmonar (6).

La *ruta inflamatoria* representada por enfermedades como la neumonitis por hipersensibilidad o la sarcoidosis en las cuales las moléculas profibrosantes son principalmente producidas por células inflamatorias y las células epiteliales son víctimas del microambiente proinflamatorio dañino crónico.

Por otro lado, la *ruta epitelial* representada por la fibrosis pulmonar idiopática donde son las células del epitelio alveolar aberrantemente activadas las que sintetizan los principales mediadores que provocan y sostienen la reacción fibrótica probablemente a través de una comunicación aberrante entre células epiteliales y mesénquimales (6, 7).

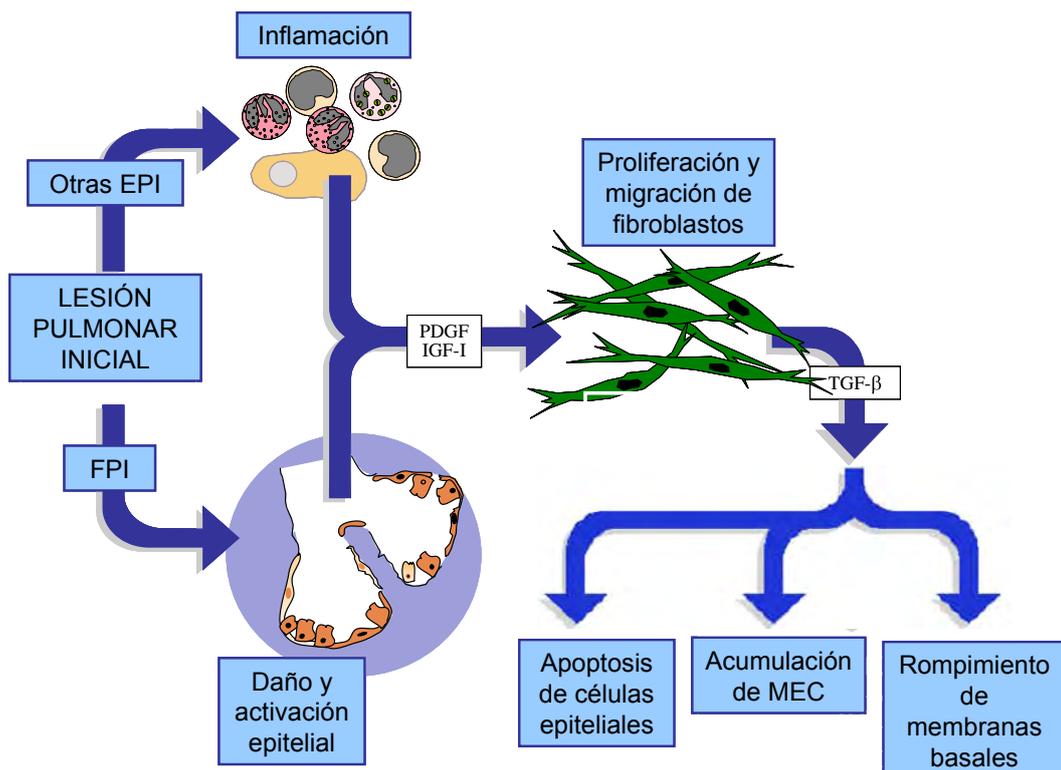
Se ha propuesto que a través de varios ciclos de agresión y activación de las células epiteliales se induce la migración, proliferación y activación de células mesenquimales, que conduce a la formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos y una exagerada acumulación de matriz extracelular (8).

Las células epiteliales son la fuente primaria de mediadores capaces de inducir la migración, activación y proliferación de fibroblastos y la acumulación de matriz extracelular (MEC) que se presenta en la FPI, dichos mediadores incluyen factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$  por sus siglas en inglés), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), endotelina 1, factor de crecimiento de tejido conectivo (CGF) y osteopontina (9, 10), hay otros estudios en los que se destaca la participación de las células epiteliales en la producción de varias citocinas relevantes en la fibrosis pulmonar tales como factores angiostáticos (11), proteínas que participan en las cascadas de coagulación y fibrinólisis (12), y algunas que promueven la respuesta inmune tipo TH2 considerada fibrogénica debido a que involucra la secreción de al menos 2 citocinas profibrogénicas (IL-4, IL-13) (13). Adicionalmente, se sabe que las células epiteliales aberrantemente activadas en la fibrosis pierden su capacidad natural de suprimir la migración, proliferación y activación de fibroblastos, lo que en condiciones fisiológicas promueve la homeostasis, hay varios estudios que han contribuido a este respecto (14-19).

El TGF- $\beta$  es el mediador profibrogénico más potente caracterizado a la fecha y tiene un rol principal en varias enfermedades que implican remodelación tisular (20-23). Estudios *in vivo* muestran niveles elevados de TGF- $\beta$  en tejidos pulmonares de modelos animales y en pacientes con FPI (24-26) y la sobreexpresión de esta citocina en el pulmón de ratón y rata promueve fibrosis irreversible con poca inflamación (27). El TGF- $\beta$  promueve la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, éstas últimas constituyen células efectoras muy importantes en FP, de hecho, es a través de la diferenciación de fibroblastos a

miofibroblastos que el TGF- $\beta$  ejecuta muchos de sus efectos en el proceso fibrótico (28-30), Sobre esta base es que varias estrategias terapéuticas se han centrado en bloquear las acciones de esta citocina (31).

Como ya se mencionó, en el tejido fibrótico ocurre una alteración importante de la matriz extracelular, esto se manifiesta a través del depósito exagerado de moléculas como colágenas I, III, V, VI y VII, fibronectina, elastina y proteoglicanos y de la degradación de las membranas basales (32). En condiciones normales el pulmón sintetiza componentes de la MEC en una forma finamente regulada.



**Esquema hipotético de las dos rutas que conducen a la fibrosis pulmonar.** Una lesión inicial de etiología conocida o desconocida provoca una inflamación que no se resuelve o activación de células epiteliales. Las células inflamatorias y epiteliales liberan citocinas y factores de crecimiento que inducen la migración y proliferación de fibroblastos y su transformación a miofibroblastos. En el microambiente del pulmón dañado los miofibroblastos pueden inducir apoptosis epitelial, rompimiento de membranas basales y un remodelado aberrante de matriz extracelular (Simplificado de Pardo & Selman, 2002).

En la fibrosis hay un desajuste en el balance homeostático, y el pulmón fibrótico en etapas avanzadas puede contener aproximadamente dos o tres veces más MEC que uno normal (33). En este sentido, la participación de las proteasas que controlan la cantidad y composición de la matriz es central. Las metaloproteasas de matriz, MMPs (del inglés matrix metalloproteases) son una familia de enzimas que colectivamente son capaces de degradar todos los componentes de MEC y de la membrana basal (34). La potente actividad proteolítica de las MMPs está principalmente regulada por el balance de sus inhibidores tisulares específicos, los TIMPs (por sus siglas en inglés tissue inhibitors of matrix metalloproteases), la excesiva o inapropiada expresión de MMPs contribuye a la patogénesis y al proceso destructivo del pulmón.

La participación individual de algunas MMPs ha sido especialmente relevante desde hace algunos años. La MMP-1 o colagenasa 1 ha recibido particular atención, ella degrada colágenas tipo I y III, proteínas estructurales principales en la MEC (35), MMP-1 está fuertemente sobre-expresada en FPI, ello parecería controversial, sin embargo, su alta expresión se ha localizado en células epiteliales alveolares y bronquiolares (36), *ie*, fuera de los compartimientos intersticiales en los que la colágena es acumulada.

Otras metaloproteasas como la MMP-2 y MMP-9 (también llamadas gelatinasa A y B respectivamente) participan de manera importante en la degradación de colágena tipo IV, principal constituyente de las membranas basales, ha sido ampliamente reportada la sobreexpresión de estas proteínas en muchas enfermedades pulmonares incluyendo fibrosis pulmonar (37-41).

Adicionalmente, las MMPs generan fragmentos bioactivos y procesan mediadores químicos como factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y receptores de superficie, modulan su actividad e inician cascadas de proteasas importantes en varios procesos celulares, además de los ya mencionados en relación a la MEC también destacan por su importancia en FP la migración celular, la angiogénesis y la apoptosis de células epiteliales (32).

Por su parte, como resulta obvio, los fibroblastos juegan un papel central en la fibrosis, son por definición las células efectoras principales, de su nombre deriva el término *fibrosis* (1), en el tejido conectivo son las más abundantes y aún en condiciones normales producen grandes cantidades de matriz extracelular en respuesta a factores de crecimiento o estímulos mecánicos (20), los fibroblastos de pulmones con fibrosis activa presentan una tasa de proliferación anormalmente alta, crecimiento celular independiente del anclaje y son morfológicamente distintos (42-45).

Las lesiones histopatológicas denominadas focos de fibroblastos/miofibroblastos se refieren a aglomerados de células tipo fibroblasto en los cuales algunas de estas han adquirido un fenotipo distinto, exhiben propiedades contráctiles y expresan marcadores de células musculares como  $\alpha$ -actina de musculo liso, de ahí que sean llamados miofibroblastos, son los principales sintetizadores de colágena tipo I (46), por lo que en gran medida son responsables del depósito de tejido fibrótico y se consideran elementos clave en la patogénesis de la FP.

En el campo de la fibrosis pulmonar idiopática, una buena parte de la investigación actual se ha enfocado en el estudio del origen y la permanencia

de los fibroblastos/miofibroblastos en los focos. Existe evidencia de que en FP los fibroblastos son resistentes a la apoptosis (47) y las células epiteliales son susceptibles a este proceso (48), esta “paradoja de la apoptosis” sugiere que la muerte celular programada podría estar participando de manera importante en el sostenimiento de la fibrosis.

En cuanto al origen o procedencia de los fibroblastos lo que primeramente se ha mostrado es que provienen de precursores mesenquimales intrapulmonares preexistentes (49). Recientes estudios han sugerido que también podrían derivar de fuentes extrapulmonares a partir de células progenitoras derivadas de médula ósea (50) o bien de los recientemente descritos fibrocitos circulantes, hay varios estudios al respecto, entre ellos, el trabajo de Andersson-Sjöland *et al* identificó la presencia de fibrocitos en 8/9 pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (51), este resultado sugiere que muy probablemente estas células precursoras circulantes estén contribuyendo a expandir las poblaciones de fibroblastos/miofibroblastos en FPI.

Adicionalmente, ha sido demostrado también un proceso de diferenciación de células epiteliales a células mesenquimales ocurriendo durante el desarrollo de la fibrosis, dicho proceso se denomina transición epitelio-mesénquima (TEM), ocurre de manera particularmente importante y de forma normal durante el desarrollo embrionario, en el cual la formación de los diferentes tejidos “requiere” de esta plasticidad celular. Durante este proceso las células epiteliales pierden muchas de sus características y adquieren propiedades que son distintivas de las células mesenquimales (52), se convierten en células migratorias, se presenta una baja expresión de moléculas de adhesión celular principalmente E-caderina, pierden su polaridad y expresan moléculas

mesénquimales tales como fibronectina y N-caderina (53, 54). Hay algunos trabajos recientes en los que se han identificado células con la ocurrencia simultánea de marcadores epiteliales y mesenquimales en fibrosis pulmonar (55, 56). Estudios de expresión génica global en tejidos pulmonares con FPI han reportado alta expresión de genes relacionados a la TEM tales como TGF- $\beta$ 3, LEF-1 (del inglés lymphoid enhancer factor-1) y *Slug*, un gen blanco de TGF- $\beta$  requerido en la transición epitelio-mesénquima (57-59). En este contexto como lo ha sugerido el trabajo reciente de Selman, Pardo & Kaminski (60), la fibrosis pulmonar tal vez no debería conceptualizarse sólo como una respuesta cicatrizal anormal sino como una recapitulación aberrante de programas de desarrollo.

### ***Fibrosis pulmonar experimental***

En los últimos años se han presentado avances importantes en lo referente al entendimiento de los mecanismos moleculares que subyacen la progresión de la fibrosis pulmonar. Una parte importante de dicho entendimiento se debe al uso de las estrategias experimentales que tanto *in vivo* como *in vitro* reproducen una o varias de las características que conforman el repertorio fisiopatológico celular y molecular de la fibrosis.

Los acercamientos experimentales realizados *in vivo* permiten observar en tiempo real los efectos de agentes ambientales, bioquímicos y genéticos sobre la aparición y progresión de la fibrosis. Destaca el uso de animales murinos, las ratas y ratones son los más ampliamente usados debido a que son relativamente más fáciles de manipular y de bajo costo de manutención en comparación con otros animales. El uso de estos modelos ha permitido

investigar un amplio rango de eventos como: la proliferación, diferenciación, apoptosis y senescencia en diferentes tipos celulares; la síntesis y vías de síntesis de moléculas que conforman el depósito de tejido fibrótico; los mecanismos de acción de mediadores profibrogénicos y antifibrogénicos, sea a través de manipulación genética o bien a partir de inducción externa.

Los métodos convencionales utilizados para inducir reacciones fibróticas en el pulmón incluyen la inyección directa de agentes fibrogénicos y la irradiación torácica (61-63). La bleomicina administrada vía intraperitoneal o través de instilación intratraqueal es la forma de inducción más ampliamente utilizada (64-66). Bleomicina es el término utilizado para referir una familia de glicopéptidos aislados del hongo *Strptomyces verticillus*. Es un agente antineoplásico potente, sin embargo, su eficacia terapéutica se ve limitada por su toxicidad pulmonar ya que induce neumonitis que progresa a fibrosis en forma dosis-dependiente (67).

La administración intratraqueal de bleomicina afecta muchas rutas celulares, induce la activación de células epiteliales, las cuales, pueden liberar citocinas y factores de crecimiento que participan como quimioatrayentes de células inflamatorias (principalmente neutrófilos y macrófagos) e inducen la proliferación de fibroblastos y la síntesis exagerada de colágena. Su efecto citotóxico sobre el epitelio alveolar y bronquiolar se relaciona con la producción de especies reactivas de oxígeno, ya que estas alteran el estado redox de las células e inducen la muerte celular por apoptosis, se sabe que además la bleomicina produce daño directo al DNA ya que tiene la habilidad de unirse a él e inducir su corte, lo cual, eventualmente inhibe la progresión del ciclo celular y

consecuentemente evita la reparación del material genético produciendo aberraciones cromosómicas (revisado en 68-70).

El modelo de fibrosis inducido por instilación intratraqueal de bleomicina está limitado espacial y temporalmente en el tejido pulmonar. El daño al DNA, la apoptosis de células epiteliales y bronquiolares y el depósito de fibras de colágena no se observan de manera uniforme en el pulmón, sólo en algunas áreas ya que las lesiones producidas son focales. Además de esto, debido a que generalmente se administra una sola dosis, la fibrosis se produce sólo durante un corto periodo, aproximadamente después de uno o dos meses de la instilación la fibrosis producida por esta ruta inflamatoria se resuelve (71, 72).

Debe considerarse que ningún acercamiento experimental animal incluyendo el modelo de bleomicina representan el patrón progresivo y destructivo de la fibrosis pulmonar idiopática, además, las respuestas inflamatoria y fibrosante puede diferir significativamente entre humanos y otros animales. No obstante, representan una valiosísima herramienta para mejorar el entendimiento de la enfermedad, gran parte del conocimiento actual de la fibrosis pulmonar proviene de la investigación en modelos animales.

### ***La obesidad***

La obesidad (OB) representa otro importante problema de morbilidad que ha ido incrementando en todo el mundo desde la década de 1970 (73-75) tanto en países industrializados como en naciones en vías de desarrollo, ocurre en personas de diversos niveles sociales y económicos. A menudo descrita como la epidemia de los tiempos modernos, más de un billón de personas alrededor del mundo tiene sobrepeso y 300 millones de adultos son obesos (76),

representa una causa prevenible común de muerte, y está siendo asociada con una reducción en la esperanza de vida de aproximadamente 8 años (revisado en 77, 78).

En nuestro país la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (2006) mostró que 30% de la población mexicana es obesa con ligero predominio de las mujeres sobre los hombres (79). La organización Mundial de la Salud (OMS) la describe como “la acumulación de grasa de manera anormal o excesiva que perjudica la salud” (80). En términos de índice de masa corporal (IMC, el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros) se define como un IMC mayor a  $30\text{Kg/m}^2$ , mientras que un IMC  $>25$  y  $<30\text{ Kg/m}^2$  se considera sobrepeso.

Este problema ha sido principalmente atribuido a los cambios en el estilo de vida de la población, el mayor consumo de comida rápida y menor actividad física. Sin embargo, los mecanismos que contribuyen a la obesidad son complejos, actualmente se reconoce que es una enfermedad multifactorial que involucran una interacción entre componentes conductuales y procesos hormonales, genéticos y metabólicos (81-83).

En lo que se refiere a las causas genéticas ya se han descrito varios genes involucrados, entre ellos destaca el gen *ob* que codifica la síntesis de la leptina, una hormona sintetizada principalmente por el tejido adiposo, aunque también puede ser expresada en otros tejidos como la placenta, ovarios, músculo esquelético, estómago, células epiteliales de las glándulas mamarias, médula ósea, glándula pituitaria e hígado, pero en niveles más bajos (84, 85). En estudios hechos en roedores se ha observado que, la leptina, actuando sobre

sus receptores en el hipotálamo regula el peso corporal de una manera central, a través del control del apetito y el balance energético (86).

Se sabe también que la leptina aumenta el metabolismo basal y estimula la oxidación de ácidos grasos, por ello se pensó que un déficit en esta hormona podría ser la causa de la obesidad, sin embargo, se ha observado que sólo alrededor del 5% de los individuos obesos puede ser considerado como relativamente deficientes en leptina (87), la mayor parte de las personas con obesidad severa presenta niveles elevados, ello ocurre debido a una falla en el transporte de hormona hacia el sistema nervioso central y/o una resistencia periférica (88). La regulación de la secreción de leptina es a largo plazo, principalmente por variación del nivel de masa corporal y efectos estimulantes de la insulina.

Los efectos de esta proteína fueron observados por primera vez en los años 50's en los ratones mutantes denominados *ob/ob* (obesos e hiperglicémicos), estos animales son excesivamente voraces y obesos, el defecto molecular en relación a su deficiencia en leptina fue descubierta por Friedman en 1994 (89), desde entonces se hizo evidente la importancia crucial de la hormona en la regulación del peso corporal. La identificación de la leptina cambió drásticamente la perspectiva del rol fisiológico del tejido adiposo blanco (TAB), hasta hace relativamente poco tiempo el TAB había sido considerado como un reservorio inerte, se sabía de su rol mecánico y como aislante térmico y aunque también se reconocía su papel en el metabolismo de los lípidos, era más bien concebido como un tejido casi inactivo. Debe mencionarse que otros descubrimientos significativos en relación al rol secretor del tejido adiposo fueron realizados anteriormente al de la leptina.

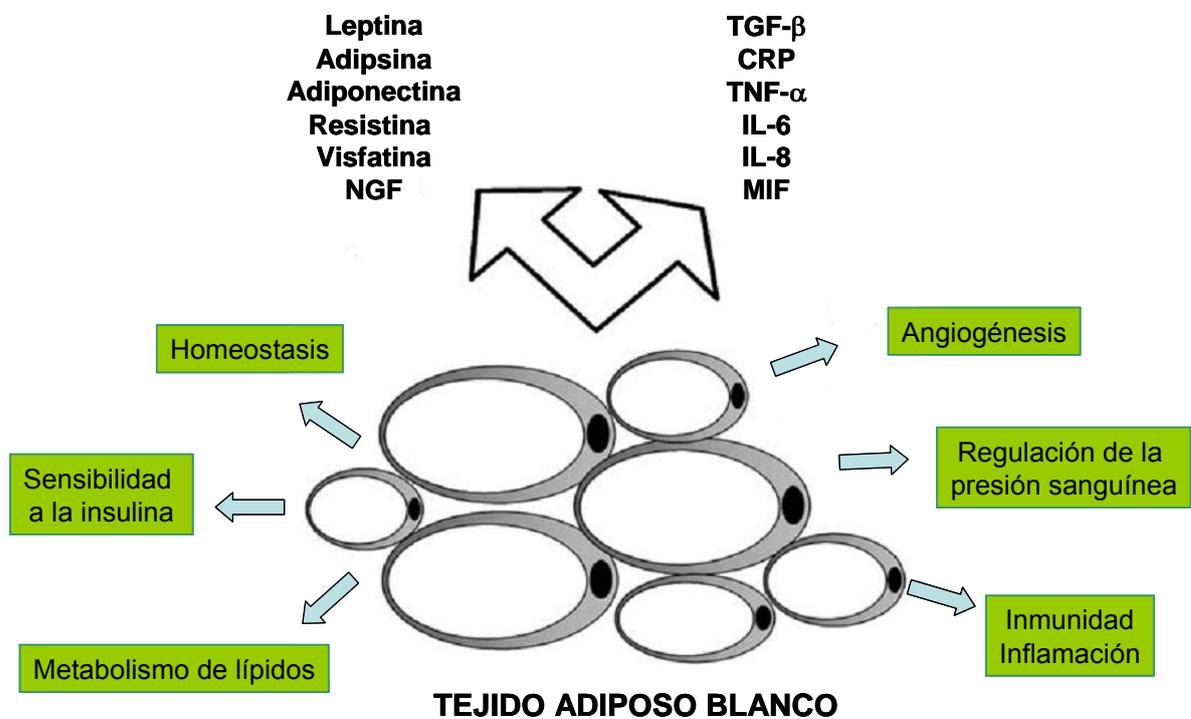
A finales de la década de los 80's fue identificado que los adipocitos secretaban una proteína hoy denominada adiposina (90, 91). Inicialmente sólo le fueron atribuidas funciones relacionadas al control del balance energético, a la fecha se reconoce su papel potenciador de la respuesta inflamatoria como componente del sistema de complemento.

Otro hallazgo importante se realizó a principios de los años 90's con el descubrimiento de que la citocina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ) es sintetizada y liberada por los adipocitos (92). La expresión de TNF- $\alpha$  se incrementa en obesidad y ha sido propuesto que juega un rol importante en la inducción de resistencia a la insulina (93, 94). Se han mostrado otros efectos metabólicos en tejido adiposo incluyendo la estimulación de la lipólisis y la apoptosis (95, 96).

Seguidas de la adiposina, TNF- $\alpha$  y leptina se ha identificado un amplio rango de sustancias bioactivas secretadas por el tejido adiposo, más de 50 entidades moleculares han sido referidas como adipocinas (\*), ellas incluyen: adiponectina, resistina, visfatina, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento neural, factor de crecimiento transformante- $\beta$ , interleucina-1 $\beta$ , -6 y -10, angiotensinógeno, proteína C reactiva, entre muchas otras (97).

(\*) Adipocina es un término preferido al que fue inicialmente usado: adipocitocina. En sentido estricto la palabra adipocina debería incluir moléculas liberadas sólo por los adipocitos, sin embargo su uso se ha extendido de manera tal que el término se emplea para referir a las moléculas secretadas por cualquier tipo celular que forme parte del tejido adiposo como son: **adipocitos, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y leucocitos (revisado en 107).**

Se sabe que éstas participan en una compleja red de señales autócrinas, parácrinas y neuroendócrinas (98) y parecen estar involucradas en una amplio rango de procesos fisiológicos que incluyen la homeostásis, metabolismo de los lípidos, regulación de la presión sanguínea, sensibilidad a la insulina, angiogénesis y remodelación de la matriz extracelular (99-103). Además, muchas de ellas han sido ligadas a la inmunidad e inflamación (104,105).



**Esquema hipotético del tejido adiposo blanco.** Se muestran algunas de las citocinas y factores de crecimiento que el TAB expresa y secreta, así como algunos de los procesos fisiológicos en que se ha mostrado estar involucrado (*Modificado de Canello & Clément, 2006*)

**Así,** el TAB ha llegado a ser objeto de considerable atención en el campo de la investigación biomédica debido al creciente número de evidencias que lo describen como un órgano endócrino extremadamente activo.

Recientemente se ha mostrado que durante la obesidad ocurre un estado de inflamación crónica mayor (106), se han identificado varias moléculas relacionadas con la respuesta inflamatoria presentes en niveles considerablemente altos en individuos obesos, tanto en el tejido adiposo como a nivel sistémico, el TAB es el principal sitio de inflamación en obesidad, sin embargo, no está claro si es el que contribuye cuantitativamente a los niveles elevados circulantes de los marcadores inflamatorios (100).

Dichos marcadores incluyen la proteína C reactiva CRP (del inglés C-reactive protein), TNF- $\alpha$  (tumour necrosis factor  $\alpha$ ), las interleucinas IL-6, IL-18 (interleukin -6, -18), el factor inhibidor de macrófagos MIF (macrophage migration inhibitory factor), haptoglobina, y otros (100,102). Por otro lado, la adiponectina presenta niveles bajos durante la obesidad. Se conoce la función antiinflamatoria de esta citocina, por lo que esta observación refuerza la idea del estado inflamatorio en la obesidad.

La expresión y liberación de adipocinas relacionadas con la inflamación generalmente ocurre cuando el tejido adiposo crece, ha sido propuesto que la respuesta inflamatoria se inicia y sostiene debido a los bajos niveles de oxígeno y otras moléculas que se presentan en algunas áreas del tejido adiposo cuando este se expande, la tasa de formación de vasos sanguíneos no alcanza niveles adecuados para compensar el crecimiento en exceso del tejido adiposo, los adipocitos distantes de la vasculatura sufren hipoxia (100), ello conduce a la liberación de citocinas inflamatorias, quimiocinas y factores angiogénicos.

Algunas de las citocinas asociadas a la hipoxia como la leptina, factor de crecimiento endotelial vascular y factor inducible por hipoxia han sido identificadas en adipocitos cultivados en condiciones bajas de oxígeno (108), lo anterior, sumando al hecho de que en general el tejido adiposo no es altamente vascularizado apoyan la hipótesis de la hipoxia como una posible causa de la inflamación en obesidad. Sin embargo, el hecho de que en otras condiciones como las etapas de embarazo, prehibernación y premigración la acumulación en exceso del tejido adiposo no promueva la expresión alterada de citocinas, sino favorezca la homeostasis hace evidente que más estudios en relación a la etiología de la inflamación durante la obesidad son necesarios.

Independientemente de los agentes causales, la secreción alterada de ciertas adipocinas en individuos obesos puede contribuir activamente a la patogénesis de comorbilidades relacionadas con la obesidad. Destacan diabetes tipo 2 y síndrome metabólico, el cual se caracteriza por la ocurrencia simultánea de anomalías metabólicas que incluyen resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hiperglucemia, dislipidemia e hipertensión, los individuos obesos presentan mayor susceptibilidad a padecer infecciones y algunos tipos de cáncer (mamario, endometrial, de colon, etc.), tienen mayor riesgo de bacteriemia y mayor tiempo de cicatrización de las heridas tras una intervención quirúrgica (109).

Otros padecimientos asociados al sobrepeso y la obesidad incluyen: dislipidemias, hipertensión, enfermedad coronaria y cerebro vascular, colelitiasis, osteoartritis, insuficiencia cardíaca, alteraciones menstruales, esterilidad, alteraciones psicológicas (110), síndrome de apnea del sueño y problemas respiratorios (111).

## ***Obesidad y enfermedades respiratorias***

Es bien reconocido que la obesidad es un importante factor de riesgo en el desarrollo de una variedad de enfermedades respiratorias, de manera particular la obesidad central caracterizada por la acumulación de grasa en la zona abdominal (adiposidad subcutánea y visceral) está asociada a la morbilidad y mortalidad a través de procesos mecánicos y endócrinos (112).

La restricción torácica asociada con obesidad usualmente es leve y es atribuida a los efectos mecánicos de la grasa sobre el diafragma y las paredes del tórax, sin embargo, en casos de obesidad severa y obesidad mórbida (IMC mayor a 35 Kg/m<sup>2</sup> y 40 Kg/m<sup>2</sup> respectivamente) los efectos pueden ser mayores, típicamente se presenta una reducción en el volumen espiratorio forzado y la capacidad pulmonar total (113). Los casos de disnea ocurren cuando debido al efecto anatómico restrictivo, la capacidad de los músculos que participan en el proceso de la ventilación se ven comprometidos, un desajuste entre la demanda de fuerza a los músculos respiratorios y la capacidad para generar tensión conduce a un incremento en el esfuerzo durante la respiración.

La obesidad también es un importante factor de riesgo del síndrome de apnea obstructiva del sueño, esta patología se caracteriza por la interrupción completa o parcial del flujo aéreo, su prevalencia entre personas obesas es del 40% aproximadamente (114). El incremento en el depósito del tejido graso en la región faríngea y la disminución del volumen pulmonar actúan juntos para reducir el calibre de las vías aéreas superiores, predisponiendo a que se colapsen y sufran cierres repetidos durante el sueño (revisado en 115).

El síndrome de apnea del sueño frecuentemente acompaña otra alteración pulmonar denominada síndrome de hipoventilación por obesidad, se sabe que en personas obesas la respiración deficiente lleva a bajos niveles de oxígeno y niveles más altos de dióxido de carbono en sangre. Hipoxemia severa, hipercapnia e hipertensión pulmonar representan los síntomas más comunes de este síndrome (116), a falta de otras causas de falla respiratoria conocidas, ha sido atribuida a la obesidad. La mayoría de las personas con apnea obstructiva del sueño presentan síndrome de hipoventilación por obesidad pero no todas (117), esto sugiere que la obesidad por sí misma puede conducir a la hipoventilación crónica.

El asma es quizá la patología asociada a obesidad que más ha sido documentada, desde que fueron asociadas desde la epidemiología. Los estudios en países occidentales han reportado un incremento paralelo en la prevalencia de ambas (118). Hoy sabemos que la obesidad puede incrementar la prevalencia, incidencia y severidad del asma y que la pérdida de peso mejora esta condición (119,120). Varios mecanismos de asociación han sido propuestos. El desorden que produce el asma involucra hipersensibilidad a una variedad de estímulos, un estado inflamatorio crónico y obstrucción reversible de las vías aéreas. Se sabe que el tejido graso produce una plétora de mediadores inflamatorios, ello sugiere una relación inmunológica entre las dos patologías, algunos de los mediadores inflamatorios identificados en obesidad tales como leptina, proteína C reactiva y TNF- $\alpha$  podrían inducir o contribuir en el estado inflamatorio de las vías aéreas (revisado en 121).

Otros trabajos han mostrado que niveles elevados de hormonas sexuales femeninas podrían desempeñar un papel importante en el aumento en la prevalencia de asma entre mujeres obesas, esta hipótesis ha sido planteada a partir de estudios en los que se ha observado que la correlación positiva entre IMC y asma es más fuerte en mujeres que en hombres (revisado en 122). Finalmente, también ha sido sugerido que algunos genes asociados a la obesidad podrían contribuir a la susceptibilidad de algunos pacientes al asma (122).

Por otro lado, de la relación que existe entre la obesidad y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se conoce poco. La EPOC es un desorden progresivo que se caracteriza por la presencia de una obstrucción crónica y poco reversible del flujo aéreo pulmonar, es asociada con una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a partículas o gases tóxicos entre los cuales el humo del tabaco parece ser el más importante (123, 124). El término EPOC incluye dos enfermedades fundamentalmente: el enfisema pulmonar y la bronquitis crónica.

En los países desarrollados, el tabaquismo contribuye al 95% de los casos, siendo el factor de riesgo más prevalente (125). Sin embargo otros factores han sido comúnmente asociados, por ejemplo: atopia e hiperreactividad bronquial; exposición a ciertos contaminantes ambientales, polvo y productos químicos; infecciones virales; predisposición genética; y factores dietéticos (126-133). La EPOC, particularmente en forma de enfisema, es típicamente asociada con pérdida de peso, los enfermos tienen significativamente menos masa muscular que los controles sanos, particularmente aquellos que continúan fumando, este fenómeno usualmente ocurre en etapas avanzadas de

la enfermedad y es asociado con un incremento en la tasa de mortalidad (134), lo anterior denota que el IMC sólo, es un parámetro insuficiente para asegurar el estado nutricional de estos individuos, es posible que presenten malnutrición a pesar de un IMC normal. Adicionalmente, hay evidencia que muestra que los pacientes con EPOC tienen poca tolerancia al ejercicio y por lo tanto una vida más sedentaria, lo cual podría contribuir al desarrollo de obesidad, aún a pesar de la disminución de peso debida a la pérdida de masa muscular.

Se ha sugerido que la obesidad puede modificar el cuadro clínico de la EPOC, los equipos de trabajo de Cabral y Wouters (135, 136) de manera independiente, basados en la observación de que un  $IMC > 24$  está asociado a una mayor sobrevida, han propuesto que la obesidad podría tener un efecto protector en EPOC. Los autores del trabajo "Obesity and the lung, 1 Epidemiology" (137) indican que es importante tener en cuenta que existe una tendencia en la que se observa que la mortalidad aumenta en pacientes con EPOC que presentan bajo peso, resaltando la importancia de mantener un IMC normal. Nótese que bajo estas condiciones un IMC normal forzosamente implicaría sobreacumulación de grasa debido a la inevitable pérdida de masa muscular que ocurre en estos pacientes.

Las propuestas y observaciones anteriores son interesantes, pero en realidad la literatura científica acerca de este tema no es mucha, la noción de que la acumulación de grasa es protectora en EPOC podría ser una sobresimplificación que disfrazaría las consecuencias potenciales de la obesidad sobre esta enfermedad, más investigaciones sobre este tema son necesarias.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que la obesidad y la fibrosis pulmonar son importantes problemas de salud pública, la información en relación a la asociación entre ellas es escasa. En el caso de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) varios factores de riesgo potenciales han sido propuestos, ellos incluyen: tabaquismo, exposición a polvos de metal o madera, reflujo gastroesofágico, uso de antidepresivos, atopia e infección viral (revisado en 138). No obstante, la información epidemiológica referente al papel de los factores dietéticos y metabólicos es escasa e inconsistente.

En poblaciones japonesas se han realizado algunas investigaciones en relación al papel de ciertos nutrientes sobre el riesgo de FPI. Un estudio de casos (n=86) y controles vivos mostró que la ingesta frecuente de pescado fue significativamente relacionada con una disminución en el riesgo de FPI, pero no se encontró ninguna asociación respecto al consumo de carne roja (139). En completo contraste a estos resultados, un trabajo más reciente de Tanaka *et al* (138), que incluyó 104 pacientes con FPI y 56 controles (diagnosticados con neumonía bacteriana aguda o resfriado común) reportó que la ingesta de ácidos grasos saturados, monoinsaturados, n-6 poliinsaturados y carne roja incrementa la posibilidad de desarrollar este padecimiento. Usando los mismos casos y controles, este el grupo de investigación también identificó que el consumo de frutas puede conferir protección contra el desarrollo de FPI (140). En estos trabajos los datos relacionados a los hábitos dietéticos fueron obtenidos a través del uso de cuestionarios autoadministrados.

En lo que se refiere a los factores metabólicos, los estudios epidemiológicos de Kudoh *et al* (141), Smith *et al* (142) y Selman *et al* (143) realizados en tres poblaciones étnicas distintas incluyendo la población mexicana en el último trabajo, han identificado que la diabetes mellitus puede ser un factor de riesgo para FPI.

En este sentido, las enfermedades relacionadas al estilo de vida podrían estar jugando un papel importante en el desarrollo de la fibrosis pulmonar, desafortunadamente para el caso de la obesidad la información en la literatura es prácticamente nula, ello hace evidente que los trabajos de investigación en relación a la obesidad y la fibrosis pulmonar son requeridos.

## **OBJETIVO**

Evaluar la influencia de la obesidad en el desarrollo de fibrosis pulmonar experimental.

## **HIPÓTESIS**

Las ratas con dieta alta en sacarosa desarrollarán fibrosis pulmonar más severa que las ratas con dieta normal.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Animales***

Se utilizaron ratas Wistar macho de 8 semanas de edad (Bioterio Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER) que fueron mantenidas en condiciones estériles y tuvieron libre acceso a alimento y agua durante todo el tratamiento. Los experimentos realizados con los animales fueron aprobados por el Comité de Bioética del INER.

### ***Dieta alta en carbohidratos***

Un grupo de ratas (n=22), fue sometido a una dieta alta en carbohidratos que consistió en la ingesta a libre demanda de sacarosa al 20% en el agua de beber durante 4 meses (SAC) El grupo control (C) (n=22) recibió agua normal, y ambos grupos consumieron alimento sólido estándar (Tekland Global para roedores 18% proteína, 5% grasa cruda, 5% fibra cruda). El peso corporal se registró al inicio del tratamiento y luego cada mes.

### ***Obtención de plasma periférico***

Después de tres meses de haber iniciado el consumo de sacarosa, se tomaron muestras de sangre (al ayuno) de la vena caudal mediante punción con aguja (calibre 18). Aproximadamente 500 µl de sangre fueron recolectados en tubos eppendorf de 1.5 ml que contenían heparina como anticoagulante. Las muestras fueron mantenidas en frío durante la extracción y luego se centrifugaron durante 10 minutos a 10,000 g y 15°C, se obtuvo la fase superior correspondiente al plasma y se mantuvo en refrigeración. A partir de dichas muestras se determinaron los niveles de glucosa, insulina y triglicéridos.

### ***Determinación de glucosa***

La cuantificación de glucosa se realizó mediante determinación colorimétrica usando *QuantiChrom Glucose Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward CA, USA)* como se describe a continuación: Se transfirieron 5  $\mu\text{l}$  de las soluciones estándar (previamente diluidas) o muestras de plasma a tubos eppendorf de 1.5 ml. Se adicionaron 500 $\mu\text{l}$  del buffer del *kit*. Se incubó en baño de agua a 80°C durante 8 minutos y después en hielo durante 4 minutos. De la mezcla anterior, se transfirieron 200  $\mu\text{l}$  por duplicado a una placa de 96 pozos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, se determinó la densidad óptica en espectrofotómetro a 620 nm.

### ***Ensayo de ELISA para insulina***

La determinación de la concentración de insulina en las muestras se realizó con el ensayo *Ultrasensitive Rat Insuline ELISA (Mercodia, Uppsala, Sweden)*, que usa dos anticuerpos monoclonales directos de ratón los cuales se unen a dos determinantes antígenicos en la molécula de insulina, el primero se encuentra unido a la placa y el segundo se adiciona conjugado a peroxidasa. El procedimiento se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor. Brevemente, la reacción de revelado se realizó con el sustrato TMB (3,3',5,5' tetrametil-bencidina) y para la reacción de paro se usó  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M. Las muestras se homogenaron y se transfirieron a la placa 50  $\mu\text{l}$  por duplicado de los estándares y muestras, se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de la solución de la enzima conjugada y se incubó durante 2 horas en oscuridad, con agitación constante a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 450 nm.

### ***Cuantificación de triglicéridos***

La determinación de triglicéridos se llevó a cabo mediante un método enzimático usando *TG Color kit* (*Wiener Lab, Cd. El Rosario, Argentina*). Las muestras fueron homogenadas. Se colocaron 10  $\mu$ l de la solución estándar o muestras a tubos eppendorf de 1.5 ml apropiadamente marcados, se adicionó 1 ml del buffer del *Kit*, se mezcló e incubó durante 5 minutos a 37<sup>0</sup>C, se permitió enfriar y se transfirió a cubetas espectrofotométricas, se determinó la densidad óptica a 505 nm.

### ***Inducción de fibrosis pulmonar experimental***

Al tercer mes de consumo de sacarosa, 11 ratas del grupo que ingirió sacarosa y 11 del grupo control se instilaron con bleomicina para inducir fibrosis pulmonar. A su vez, 11 ratas de ambos grupos se instilaron solución salina como control de instilación. Los cuatro grupos de tratamientos se enlistan a continuación:

- Dieta normal instilado con solución salina: C/SAL (N=11)
- Dieta normal instilado con bleomicina: C/BLEO (N=11)
- Dieta alta en sacarosa instilado con solución salina: SAC/SAL (N=11)
- Dieta alta en sacarosa instilado con bleomicina: SAC/BLEO (N=11)

La bleomicina (Blenoxane, Bristol-Myers Squibb Co) fue instilada por la tráquea a una dosis de 9 U/Kg de peso en 400  $\mu$ l de volumen final seguido de 2 ml de aire para asegurar la distribución de la solución en las áreas más distales del

pulmón. Todos los grupos continuaron con su dieta original durante un mes más.

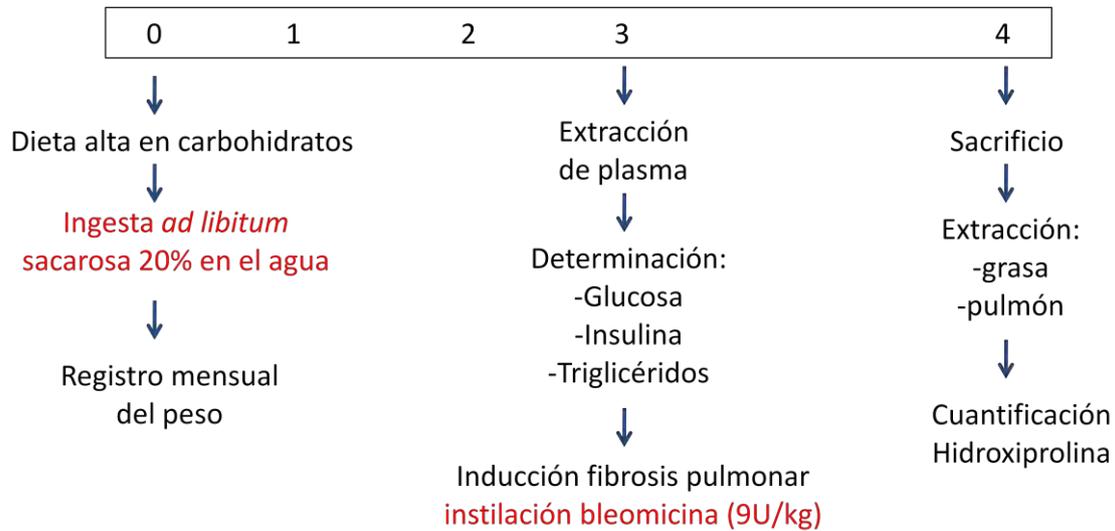
### ***Sacrificio y obtención de tejidos***

Cuatro semanas después de la instilación los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de pentobarbital sódico (6.39%) aplicado vía intraperitoneal. Se extrajo la grasa acumulada en las zonas peripancreática y periepididimal y se registró su peso. Se aisló el pulmón izquierdo para la cuantificación de hidroxiprolina.

### ***Cuantificación de hidroxiprolina***

Inmediatamente después del sacrificio, se extrajo el pulmón izquierdo completo. Se utilizó la técnica colorimétrica de Woessner (144) para medir la hidroxiprolina (OH-P). Brevemente, los pulmones fueron completamente deshidratados incubando a 100<sup>0</sup>C. Cuando se mantuvieron en peso constante se hidrolizaron en ácido clorhídrico 6N. Fue necesario filtrar, evaporar y neutralizar las muestras. Se tomaron alícuotas de 15 µl para determinar la OH-P usando el Reactivo de Ehrlich y una curva patrón generada con 4-trans hidroxil-L-Prolina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Se midió la absorbancia a 557 nm.

meses de tratamiento



**Representación esquemática del procedimiento.** Las ratas Wistar de 8 semanas de edad recibieron agua con sacarosa al 20% (los controles ingirieron agua normal) durante 4 meses (tiempo 0 a 4), el peso fue registrado mensualmente desde el inicio del tratamiento. Al tercer mes se determinaron en plasma la glucosa, la insulina y los triglicéridos y se instiló con bleomicina (o solución salina en los controles de instilación), un mes después los animales fueron sacrificados, se extrajo la grasa de la región abdominal y el pulmón izquierdo para determinar la hidroxiprolina.

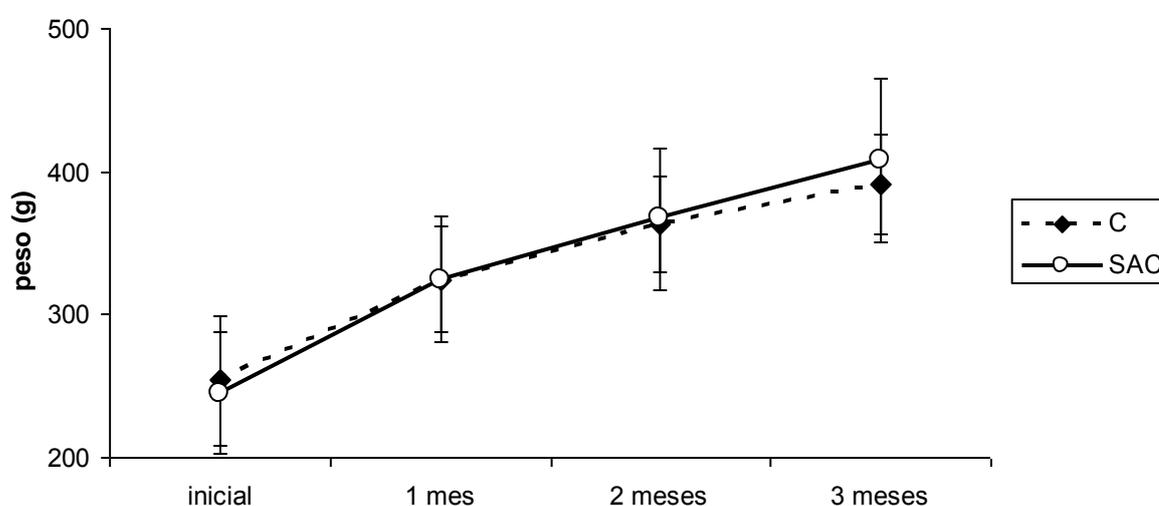
### **Análisis estadísticos**

Los datos mostrados fueron expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el paquete SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versión 10.0. Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas mediante *T Test*. Un valor de  $P < 0.05$  fue considerado significativo.

## RESULTADOS

### ***Dieta alta en sacarosa, registro del peso***

Desde el inicio del consumo de sacarosa y hasta el sacrificio de los animales se registró el peso mensualmente. Como se muestra en la figura 1 no se encontraron diferencias en el peso entre ratas que consumieron sacarosa (SAC) y las del grupo control (C).

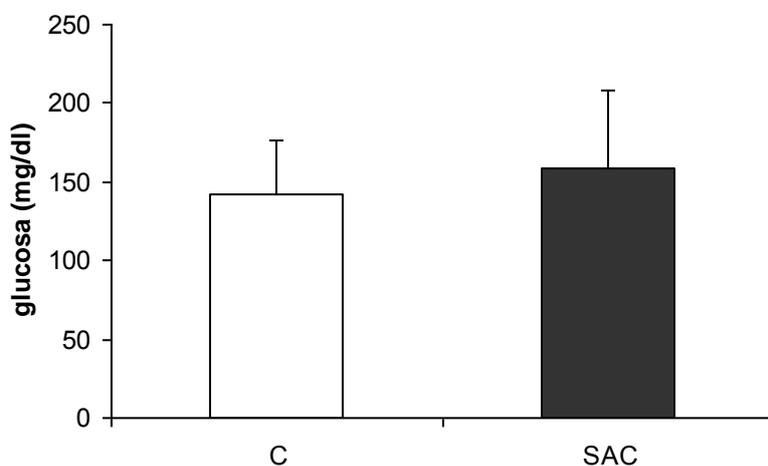


**Figura 1** Peso de ratas con ingesta de sacarosa (línea continua) (SAC) y grupo control (C), línea punteada) n=22.

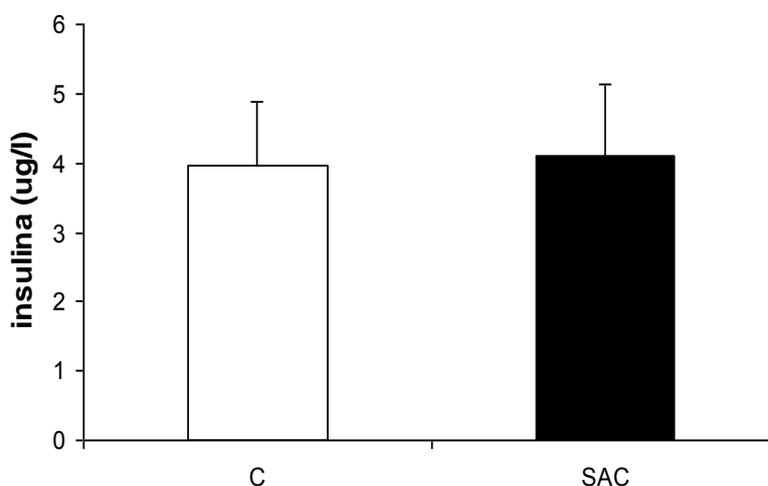
### ***Determinación de glucosa, insulina y triglicéridos.***

Al tercer mes de ingesta de sacarosa se realizó la medición de glucosa e insulina en plasma obtenido de sangre periférica. La glucosa alcanzó valores de  $143 \pm 33$  mg/dl en el control *versus*  $159 \pm 49$  mg/dl en el grupo SAC sin diferencias significativas entre ambos grupos (Figura. 2).

Por lo que se refiere a la insulina tampoco se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (C=3.79 ± 0.36µg/l vs SAC=3.8 ± 0.26 µg/l). (Figura 3).



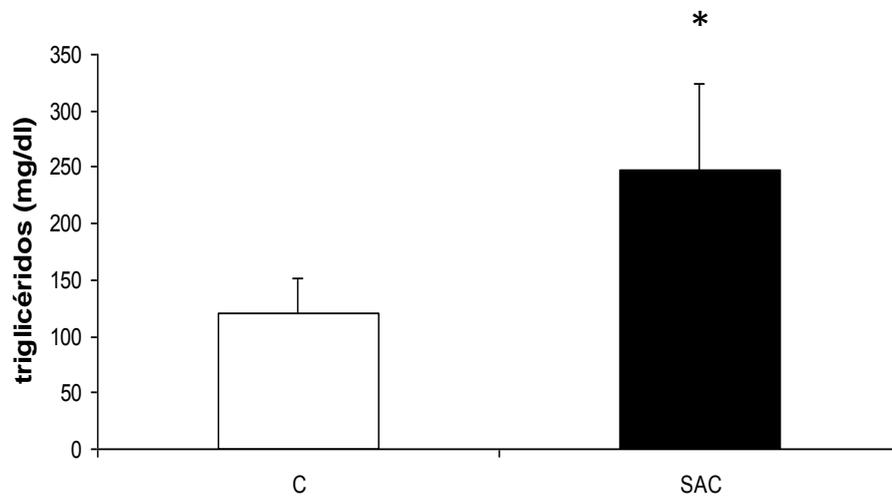
**Figura 2** Determinación de glucosa. Grupo control (C, barra blanca). Grupo sacarosa (SAC, barra negra). n=22



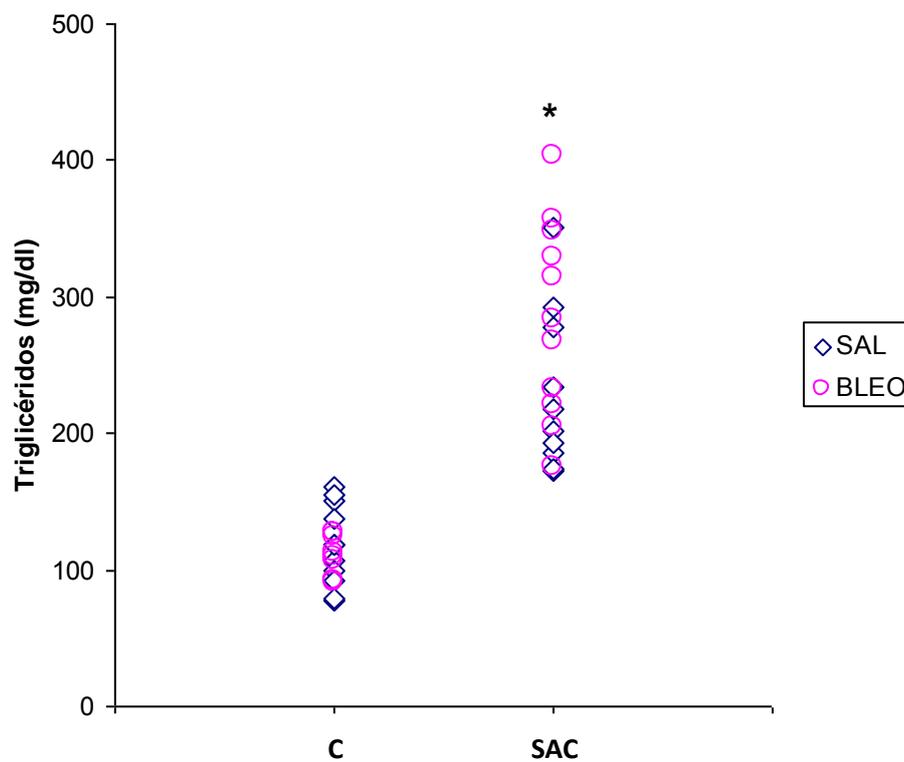
**Figura 3** Determinación de Insulina plasmática. Grupo control (C, barra blanca). Grupo sacarosa (SAC, barra negra) n=22.

En los niveles de triglicéridos se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y las ratas que ingirieron sacarosa (115 ± 24 vs 259 ± 70 mg/dl respectivamente, p<0.05) (Figura 4), en la figura 5 se muestran los valores de

triglicéridos en forma individual mostrando las ratas que recibieron solución salina o bleomicina.



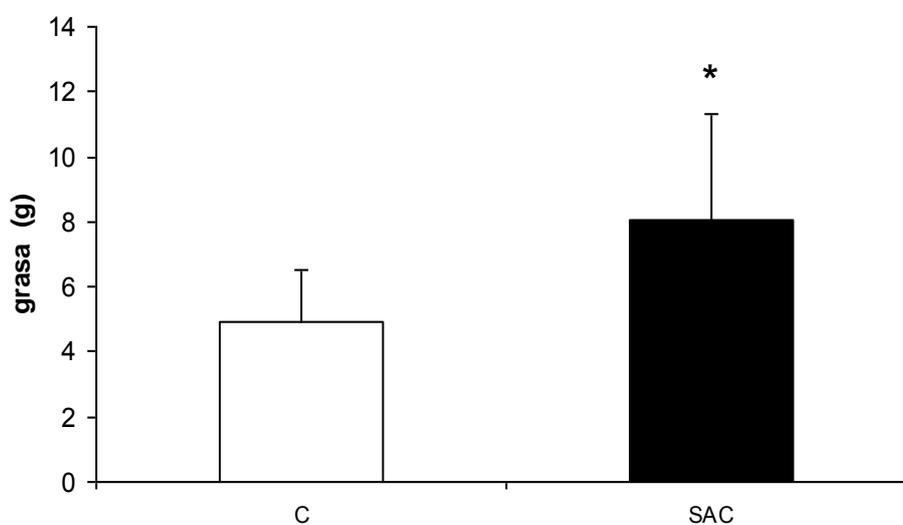
**Figura 4** Niveles de triglicéridos. Grupo control (C, barra blanca) n=22. Grupo sacarosa (SAC, barra negra) n=22. \* p<0.05.



**Figura 5** Valores de triglicéridos presentados en forma individual, en negro ratas que recibieron solución salina, en rosa ratas que recibieron bleomicina. n=22.\* p<0.05

### **Medición de la grasa abdominal**

A las 4 semanas post bleomicina todos los animales se sacrificaron y se obtuvo tejido graso abdominal de las regiones peripancreática y periepididimal y se registró su peso. La grasa de las ratas de los grupos que recibieron sacarosa fue significativamente más alta que las de dieta normal ( $4.9 \pm 1.6\text{g}$  vs  $8.0 \pm 3.3\text{g}$  (Figura 6).



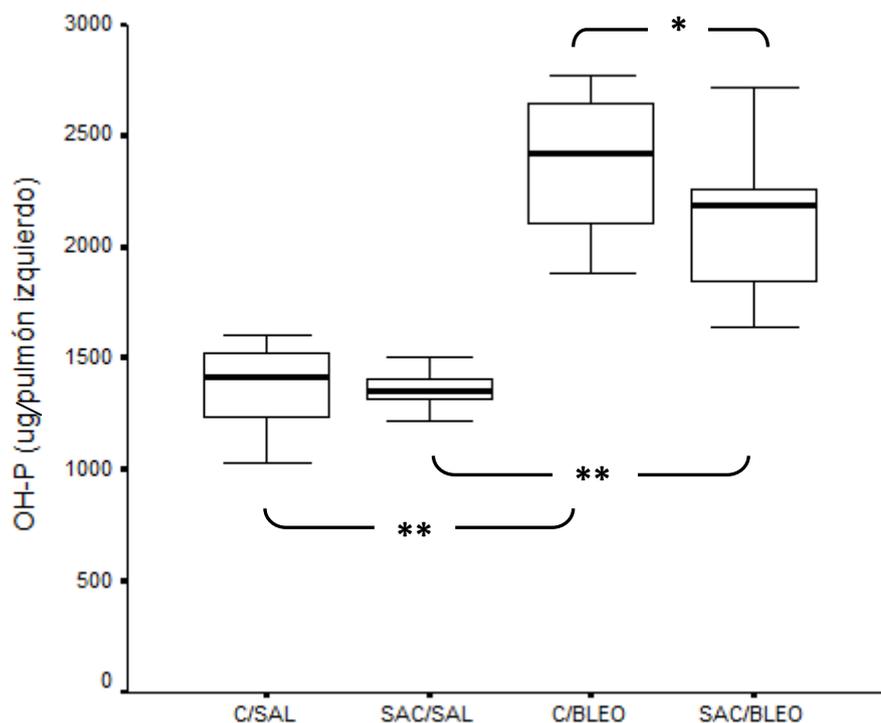
**Figura 6** Grasa abdominal. Grupo control (C, barra blanca) n=22. Grupo sacarosa (SAC, barra negra) n=22.\* p<0.05

### **Cuantificación de hidroxiprolina**

La hidroxiprolina (OH-P) es un iminoácido que se encuentra abundantemente representado en la colágena (10% a 12% dependiendo del tipo de colágena) y por lo tanto su medición se considera un indicador para evaluar la concentración de dicha proteína.

Inmediatamente después del sacrificio se extrajo el pulmón izquierdo para cuantificar la hidroxiprolina (OH-P), la concentración de OH-P en los pulmones de ratas que recibieron bleomicina mostró diferencias significativas en

comparación con sus respectivos controles que recibieron solución salina (1358 ± 207 C/SAL vs 2366 ± 302 µg de OH-P en C/BLEO; p<0.01 y 1352 ± 103 SAC/SAL vs 2085 ± 319 µg de OH-P en SAC/BLEO; p<0.01) (Figura 7).



**Figura 7** Determinación de hidroxiprolina (OH-P). C/SAL=CONTROL/SALINA, SAC/SAL=SACAROSA/SALINA, C/BLEO=CONTROL/BLEOMICINA, SAC/BLEO=SACAROSA/BLEOMICINA. N=11. \*\*p<0.01, \*p<0.05.

Por lo que se refiere a los grupos que recibieron bleomicina, la comparación entre los animales de diferentes dietas (C/BLEO y SAC/BLEO), se observó que las ratas que recibieron sacarosa presentaron niveles de OH-P significativamente menores que las del grupo con dieta normal (C/BLEO= 2366 ± 302 vs SAC/BLEO= 2085 ± 319 µg de OH-P, p<0.05) (Fig. 7).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se usó una dieta alta en sacarosa en un modelo experimental de ratas, para observar su influencia en la respuesta fibrótica del pulmón y compararlo con el efecto que se produce en ratas con una dieta normal.

Las ratas son frecuentemente usadas como modelos animales para estudiar los efectos adversos de la obesidad, tanto humanos como roedores tienden a ganar peso con la alta ingesta de calorías (145). Sin embargo, bajo condiciones de alimentación *ad libitum* la obesidad ocurre en algunas pero no en todas las ratas experimentales (146). Dos tipos de respuestas han sido observadas cuando los animales reciben una dieta alta en grasa o alta en sacarosa: algunas especies y cepas ganan peso, pero otras no (147).

Hay carencia de información en relación con los parámetros antropométricos en roedores de laboratorio y no hay una definición de obesidad en ratas experimentales (148). Cualquier incremento significativo en el peso corporal o el consumo energético relativo a animales controles se considera obesidad (149). No es posible establecer rangos específicos para algunos parámetros como glucosa, insulina, lípidos circulantes, etc., ya que estos varían entre especies, cepas, e incluso dentro de la misma cepa. Cada laboratorio establece sus propios rangos basados en su experiencia y en la mayoría de los casos reportan diferencias estadísticamente significativas (149).

No obstante, algunos intentos han sido hechos para establecer parámetros antropométricos y marcadores de obesidad en animales de laboratorio. Para el caso de las ratas Wistar macho adultas (60 días de edad), el trabajo de Novelli

*et al* (148) propuso que un IMC (Índice de Masa Corporal: peso (g)/talla (cm)<sup>2</sup>) entre 0.45 g/cm<sup>2</sup> y 0.68 g/cm<sup>2</sup> debería considerarse normal ya que un IMC situado por encima de estos valores en su modelo experimental fue asociado con dislipidemia y estrés oxidante.

En el presente estudio usamos un modelo ya reportado (150, 151), que consistió en la ingesta a libre demanda de una solución de sacarosa al 20% en el agua de beber durante 4 meses. Al tercer mes los animales presentaron niveles más altos de triglicéridos plasmáticos que los del grupo control (C), así como una acumulación mayor de grasa medida en la región abdominal, en ambos casos las diferencias fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, no observamos la ganancia de peso, ni la presencia de anomalías metabólicas como hiperglucemia o hiperinsulinemia que fueron reportadas en un trabajo anterior usando este mismo modelo (150, 151).

Los resultados obtenidos indican que la ingesta elevada de sacarosa produjo anomalías metabólicas sobre las ratas que la recibieron. En este sentido el modelo respondió al objetivo de comparar la respuesta fibrótica en ambas dietas.

Se utilizó bleomicina (BLEO) para inducir fibrosis pulmonar, en cada uno de los dos grupos hubo también un conjunto de ratas que recibió solución salina (SAL) como control de instilación. Los animales administrados con BLEO presentaron niveles de hidroxiprolina significativamente más altos que sus contrapartes de solución salina tanto en el grupo SAC como en el grupo C, ello indicó que la instilación de BLEO efectivamente indujo fibrosis pulmonar en las ratas, como ya se ha mostrado en la literatura (152-155).

Un resultado inesperado en este trabajo fue que las ratas que ingirieron sacarosa al ser expuestas a bleomicina desarrollaron menos fibrosis que las ratas con dieta normal expuestas a bleomicina. En este contexto, se hace necesario plantear una posible explicación en relación al significado biológico de este hallazgo.

Hasta hace relativamente poco tiempo la obesidad había sido contemplada de manera muy simplista, la investigación reciente ha mostrado que el tejido adiposo es un órgano endocrino extremadamente activo que secreta una variedad de sustancias bioactivas llamadas adipocinas, las cuales participan en una compleja red de señales autocrinas, paracrinas y neuroendocrinas, entre ellas la leptina, por su participación central durante la obesidad ha merecido particular atención.

En el presente trabajo no se midieron los niveles circulantes de leptina, sin embargo, se sabe que la cantidad en el plasma correlaciona en forma directa con la cantidad de grasa corporal (88), en este sentido sería lógico pensar que las ratas que consumieron sacarosa presenten una cantidad mayor de la hormona en comparación a sus contrapartes de dieta normal considerando que ellas presentaron mayor acumulación de grasa en la región abdominal.

Se sabe que la leptina tiene un papel en la inmunidad, se ha visto que los niños desnutridos tienen niveles bajos de la hormona y que estos correlacionan con una disminución de la respuesta linfoproliferativa ante una agresión (156). Otras observaciones indican que el déficit congénito de leptina se asocia con una mayor incidencia de infecciones y de mortalidad (88), en los pocos individuos que presentan esta deficiencia genética, la administración de leptina

exógena restaura la funcionalidad de sus linfocitos T, lo que demuestra la existencia de un efecto directo sobre las células T (157-159). En relación a los resultados obtenidos en este trabajo, puede estar ocurriendo que los niveles de leptina moderadamente altos participen en la defensa inmunológica, eventualmente esto contribuiría a que nuestras ratas alimentadas con sacarosa sean menos sensibles al daño fibrótico en comparación a las normales.

Adicionalmente, existe una hipótesis que plantea que la activación del sistema inmune en obesidad es un mecanismo homeostático que se enciende para proteger al organismo de los efectos nocivos de la sobreacumulación de grasa (160). Aunque en algunos casos, el efecto negativo potencial de la obesidad sobre el metabolismo global resulta evidente, en otros no es así, el sobrepeso y la obesidad son paradójicamente asociadas con mejores resultados en algunas enfermedades crónicas, como en pacientes con falla cardiaca (161-163), y existen algunos datos que sugieren que tal vez en EPOC también ocurra (135,136), este fenómeno es referido como “epidemiología reversa”. Los casos en los que se ha reportado esta “paradoja de la obesidad”, continúan siendo analizados y han sido objeto de controversia entre la comunidad científica, es evidente que llegar a una conclusión errónea de este tipo traería consecuencias potencialmente graves en el sentido terapéutico, sin embargo, el hecho de que existan observaciones similares en patologías diferentes hace meritorio investigar más sobre la veracidad de esta hipótesis y los mecanismos que estarían interviniendo.

Los resultados obtenidos sugieren que un aumento en la cantidad de grasa y/o niveles elevados de TG podrían estar participando en la protección contra la fibrosis pulmonar, probablemente la activación del sistema inmune y moléculas

como la leptina tengan un papel importante en este proceso. Considero que lo siguiente en este trabajo es explorar los procesos y las moléculas que pudieran estar participando en la respuesta fibrótica disminuida bajo estas condiciones de dieta.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hardie WD, Glasser SW, Hagood JS. Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. *Am J Pathol* 2009; 175:3-16.
2. Pardo A, Selman M, Kaminski N. Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40:1141-1155
3. Katzenstein A LA & Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1301-1315.
4. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: progress in understanding its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001; 134:136-151.
5. Selman M, Thannickal VJ, Pardo A, Zisman DA, Martinez FJ, Lynch JP. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs* 2004; 64:405-430.
6. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. American Thoracic Society; European Respiratory Society; American College of Chest Physicians. *Ann Intern Med* 2001; 16:136-151.
7. Selman M, Pardo A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:364-372.
8. Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res* 2002; 3:3.
9. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becerril C, Yousem S, Herrera I, Ruiz V, Selman M, et al. Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med* 2005; 2:e251.
10. Selman M, Thannickal VJ, Pardo A, Zisman DA, Martinez FJ, Lynch JP III. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs* 2004; 64:405-430.
11. Cosgrove GP, Brown KK, Schiemann WP, Serls AE, Parr JE, Geraci MW, Schwarz MI, Cool CD, Worthen GS. Pigment epithelium-derived factor in idiopathic

- pulmonary fibrosis: a role in aberrant angiogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:242–251.
12. Kotani I, Sato A, Hayakawa H, Urano T, Takada Y, Takada A. Increased procoagulant and antifibrinolytic activities in the lungs with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thromb Res* 1995; 77:493–504.
  13. Wallace WA, Howie SE. Immunoreactive interleukin 4 and interferon gamma expression by type II alveolar epithelial cells in interstitial lung disease. *J Pathol* 1999; 187:475–480
  14. Pan T, Mason RJ, Westcott JY, Shannon JM. Rat alveolar type II cells inhibit lung fibroblast proliferation in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25:353–361.
  15. Lama V, Moore BB, Christensen P, Toews GB, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 synthesis and suppression of fibroblast proliferation by alveolar epithelial cells is cyclooxygenase-2-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27:752–758.
  16. Kohyama T, Ertl R, Valenti V, Spurzem J, Kawamoto M, Nakamura Y, Veys T, Allegra L, Romberger D, Rennard SI. Prostaglandin E2 inhibits fibroblast chemotaxis. *Am J Physiol* 2001; 281:L1257–L1263.
  17. Petkova DK, Clelland CA, Ronan JE, Lewis S, Knox AJ. Reduced expression of cyclooxygenase (COX) in idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Histopathology* 2003; 43:381–386.
  18. Xaubet A, Roca-Ferrer J, Pujols L, Ramirez J, Mullol J, Marin-Arguedas A, Torrego A, Gimferrer JM, Picado C. Cyclooxygenase-2 is upregulated in lung parenchyma of chronic obstructive pulmonary disease and down-regulated in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2004; 21:35–42.
  19. Moore BB, Peters-Golden M, Christensen PJ, Lama V, Kuziel WA, Paine R III, Toews GB. Alveolar epithelial cell inhibition of fibroblast proliferation is regulated by MCP-1/CCR2 and mediated by PGE2. *Am J Physiol* 2003; 284:L342–L349.
  20. Laurent GJ, McAnulty RJ, Hill M, Chambers R. Escape from the matrix: multiple mechanisms for fibroblast activation in pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5:311-315.

21. Bartram U, Speer CP. The role of the transforming growth factor beta in lung development and disease. *Chest* 2004; 125:754-765.
22. Kelly M, Kolb M, Bonniaud P et al. Re-evaluation of cytokines in lung fibrosis. *Curr Pharm Des* 2003; 9:39-42.
23. Zhang HY, Phan SH. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta (1). *Am J Resp Cell Mol Biol* 1999; 21:658-665.
24. Gauldie J, Sime PJ, Xing Z, et al. Transforming growth factor beta-gene transfer to the lung induces myofibroblast presence and pulmonary fibrosis. *Curr Top Pathol* 1999; 93:35-45.
25. Bergeron A, Soler P, Kambouchner M, et al. Cytokine profiles in IPF suggest an important role for TGF- $\beta$  and IL-10. *Eur Resp J* 2003; 22:69-76.
26. Liu JY, Brody AR. Increase TGF- $\beta$ 1 in the lung of asbestos exposed rats and mice: reduced expression in TNF- $\alpha$  receptor knockout mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2001; 20:97-108.
27. Sime PJ, Xing Z, Graham FL, et al. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor- $\beta$ 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest* 1997; 100:768-776.
28. White ES, Lazar MH, Thannikal VJ. Pathogenetic mechanisms in usual interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol* 2003; 201:343-354.
29. Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest* 2002; 122:268S-289S.
30. Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming growth factor beta 1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res* 2000; 258:180-189.
31. Sime PJ. The antifibrogenic potential of PPAR $\gamma$  ligands in pulmonary fibrosis. *J Investig Med* 2008; 56:534-538.
32. Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:383-388.
33. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:207-214.

34. Puente XS, Sanchez LM, Overall CM, Lopez-Otin C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 2003; 4:544–558.
35. Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Aziz N, Kaminski N, Zlotnik A. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:188–198.
36. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramírez R, Barrios R, Pardo A. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279:L562-74.
37. Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, et al. Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1996; 149:1241-1256.
38. Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, Yamanaka N. Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest* 1998; 78:687-698.
39. Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, Gushima Y, Miyakawa H, Akaike T, et al. Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1949- 1956.
40. Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Konttinen YT. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest* 1998; 78:1077-1087.
41. Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000; 117:684-694.
42. Clark RA: The commonality of cutaneous wound repair and lung injury. *Chest* 1991; 99:57S–60S.
43. Rennard SI: Repair mechanisms in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98:S278–S286.
44. Worrall JG, Whiteside TL, Prince RK, Buckingham RB, Stachura I, Rodnan GP: Persistence of scleroderma-like phenotype in normal fibroblasts after

- prolonged exposure to soluble mediators from mononuclear cells. *Arthritis Rheum* 1986; 29:54–64.
45. Torry DJ, Richards CD, Podor TJ, Gauldie J: Anchorage-independent colony growth of pulmonary fibroblasts derived from fibrotic human lung tissue. *J Clin Invest* 1994; 93:1525–1532.
  46. Guo W, Shan B, Klingsberg R, Qin X, Lasky JA. Abrogation of TGF- $\beta$ 1-induced Fibroblast-Myofibroblast Differentiation by Histone Deacetylase (HDAC) Inhibition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009.
  47. Moodley YP, Misso NL, Scaffidi AK, Fogel-Petrovic M, McAnulty RJ, Laurent GJ, Thompson PJ, Knight DA. Inverse effects of interleukin-6 on apoptosis of fibroblasts from pulmonary fibrosis and normal lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29:490–498.
  48. Uhal BD, Joshi I, Hughes WF, Ramos C, Pardo A, Selman M. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol* 1998; 275:L1192–L1199.
  49. Kumar, V.; Abbas, AK.; Fausto, N. Tissue renewal and repair: regeneration, healing, and fibrosis. In: Kumar, V.; Abbas, AK.; Fausto, N., editors. *Pathologic Basis of Disease*. Elsevier Saunders; Philadelphia, PA: 2005; p 87-118.
  50. Lama VN, Phan SH. The extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/progenitor cells and beyond. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:373-376.
  51. Andersson-Sjöland A, de Alba CG, Nihlberg K, Becerril C, Ramírez R, Pardo A, Westergren-Thorsson G, Selman M. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40:2129-2140.
  52. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:131-142.
  53. Moustakas A, Heldin CH. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 2007; 98:1512-1520.
  54. Zavadil J, Bottinger EP. TGF- $\beta$  and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24:5764-5774.

55. Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2005; 166:1321-1332.
56. Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:13180-13185.
57. Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, et al. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6292-6297.
58. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, et al. Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med* 2005; 2:e251.
59. Studer SM, Kaminski N Towards systems biology of human pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4:85-91.
60. Selman M, Pardo A, Kaminski N. Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs? *PLoS Med* 2008. 5:e62.
61. Phan SH, Thrall RS, Ward PA. Bleomycin-induced pulmonary in rats, biochemical demonstration of increased rate of collagen synthesis. *Am Rev Respir Dis* 1980; 121:501-506.
62. Chua F, Gauldie J, Laurent GH. Pulmonary fibrosis: searching for model answers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33:9-13.
63. Antonini JM, Starks K, Roberst JR, Millecchia L, Yang HM, Rao KM. Changes in F-actin organization induced by hard metal particle exposure in rat pulmonary epithelial cells using laser scanning confocal microscopy. *In Vitro Mol Toxicol* 2000; 13:5-16.
64. Aso, Y., K. Yoneda, and Y. Kikkawa. Morphologic and biochemical study of pulmonary changes induced by bleomycin in mice. *Lab Invest* 1976; 35:558-568.

65. Hakkinen, P. J., J. W. Whiteley, and H. H. Witschi. Hyperoxia, but not thoracic X-irradiation, potentiates bleomycin- and cyclophosphamide induced lung damage in mice. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126:281–285.
66. Gabazza EC, Taguchi O, Adachi Y. Bleomycin-induced lung fibrosis: the authors should have used another method to induce pulmonary lesions resembling human idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:845-846.
67. Cabrera S. Bleomicina: un modelo de fibrosis pulmonar. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2006; 19:53-61.
68. Chatterjee, A., and M. Raman. Protective effect of cysteine against X-ray- and bleomycin-induced chromosomal aberrations and cell cycle delay. *Mutat Res* 1993; 290:231–238.
69. MacLoed, R., T. Buchheim, M. Kaufmann, and H. Drexler. Chromosomal breakage correlates with delayed lethality in normal and ataxia telangiectasia cell lines treated with bleomycin. *Mutat Res* 1996; 372:33–42.
70. Usmani, B., J. Lunec, and G. Sherbet. DNA repair and repair fidelity in metastatic variants of the B16 murine melanoma. *J Cell Biochem* 1993; 51:336–344.
71. Gurujeyalakshmi, G., and S. Giri. Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: downregulation of TGF $\beta$  and procollagen I and III gene expression. *Exp Lung Res* 1995; 21:791–808.
72. Cabrera S, Gaxiola M, Arreola JL, Ramírez R, Jara P, D'Armiento J, Richards T, Selman M, Pardo A: Overexpression of MMP9 in macrophages attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin. *Int J Biochem Cell Bio* 2007; 39:2324-2338.
73. Hunninghake GM, Weiss ST, Celedon JC. Asthma in Hispanics. *Respir Med* 2006; 100:648-657.
74. Schaub B, Von Mutius E. Obesity and asthma, what are the links? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5:185-193.
75. Perez R, Rojas R, Torres V, Borja-Aburto V, et al. Obesity among children residing in Mexico City and its impact on lung function: a comparison with Mexican Americans. *Arch Med Res* 2006; 37:165-171.

76. World Health Organization. Global Strategy on diet, physical activity and health. Geneva: World Health Organization 2007.
77. Govindarajan G, Alpert MA, Tejwani L. Endocrine and metabolic effects of fat: cardiovascular implications. *En Am J Med* 2008; 121:366-370.
78. Trayhurn P, Wood IS. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans* 2005; 33:1078-1081.
79. Olaíz Fernández G, Rivera Dommarco J, Shammah-Levy T, Rojas R, Villalpando Hernández S, Hernández-Ávila M et al. Encuesta Nacional de Salud y nutrición 2006. Cuernavaca México: Instituto Nacional de Salud Pública 2006.
80. World Health Organization. Obesity and overweight. Fact Sheet No 311. September 2006.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
81. Westerterp-Plantenga MS, Lejeune MP. Protein intake and body-weight regulation. *Appetite* 2005; 45:187–190.
82. Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, Marette A. Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance. *Annu Rev Nutr* 2007; 27:293–310.
83. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26:1407–1433.
84. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N et al. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997; 3:1029–1033.
85. Bado A, Levasseur S, Attoub S et al. The stomach is a source of leptin. *Nature* 1998; 394:790–793.
86. Frederich RC, Löllmann B, Hamann A et al. Expression of Ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest* 1995; 96:1658–1663.
87. Sinha MK, Caro JF. Clinical aspects of leptin. *Vitam Horm* 1998; 54:1-30.
88. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 22:763-770.

89. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature* 1994; 372:425-432.
90. Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier JS, Hunt CR, Spiegelman BM. Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* 1987; 24:402-405.
91. Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM. Severely impaired adipsin expression in genetic and acquired obesity. *Science* 1987; 24:405-408.
92. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259:87-91.
93. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95:2409-2415.
94. Spiegelman BM, Choy L, Hotamisligil GS, Graves RA, Tontonoz P. Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *J Biol Chem* 1993; 268:6823-6826.
95. Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, Bright NA, Siddle K, O'Rahilly S, Walker NI, Cameron DP. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes* 1997; 46:1939-1944.
96. Gasic S, Tian B, Green A. Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. *J Biol Chem* 1999; 274:6770-6775.
97. Govindarajan G, Alpert MA, Tejwani L. Endocrine and metabolic effects of fat: cardiovascular implications. *En Am J Med* 2008; 121:366-370.
98. Sowers JR. Update on the cardiometabolic syndrome. *Clin Cornerstone* 2001; 4:17-23.
99. Trayhurn, P. and Beattie, J.H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr* 2001; 60:329-339.
100. Trayhurn, P. and Wood, I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92:347-355

101. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280:E827-847.
102. Rajala MW, Scherer PE. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003; 144:3765-3773.
103. Wang P, Mariman E, Renes J, Keijzer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol* 2008; 216: 3–13.
104. Cousin B, Munoz O, Andre M, Fontanilles AM, Dani C, Cousin JL, Laharrague P, Casteilla L, Pénicaud L. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB J* 1999; 13:305-312.
105. Villena JA, Cousin B, Pénicaud L, Casteilla L. Adipose tissues display differential phagocytic and microbicidal activities depending on their localization. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25:1275-1280.
106. Bosello O, Zamboni M. Visceral obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev* 2000; 1:47-56.
107. Bertolani C, Marra F. The role of adipokines in liver fibrosis. *Pathophysiology* 2008; 15:91–101.
108. Lolmède K, Durand de Saint Front V, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumié A. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27:1187-1195.
109. Lamas O, Martí A, Martínez JA. Obesidad e inmunocompetencia. En: Marcos A (ed) Actualización en nutrición, inmunidad e infección. *Madrid Panamericana* 2003; 125-132.
110. Muñoz M, Mazure RA, Culebras JM. Obesidad y sistema immune. *Nutr Hosp* 2004; 19:319-324.
111. Douglas Paddon-Jones, Eric Westman, Richard D Mattes, Robert R Wolfe, Arne Astrup and Margriet Westerterp-Plantenga. Protein, weight management, and satiety. *Am J Clin Nutr* 2008; 87:1558S-1561S.
112. Schelbert KB. Comorbidities of obesity. *Prim Care* 2009; 36:271-285.
113. Lazarus R, Sparrow D, Weiss ST. Effects of obesity and fat distribution on ventilator function: the normative aging study. *Chest* 1997; 111:891-898.

114. Resta O, Foschino-Barbaro MP, Legari G, et al. Sleep-related breathing disorders, loud snoring and excessive daytime sleepiness in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25:669-675.
115. Sériès F. Upper airway muscles awake and asleep. *Sleep Med Rev* 2002; 6:229-242.
116. Bickelmann AG, Burwell CS, Robin ED, et al. Extreme obesity associated with alveolar hypoventilation; a Pickwickian syndrome. *AmJ Med* 1956; 21:811-818.
117. Kessler R, Chaouat A, Schinkewitch P, et al. The obesity-hypoventilation syndrome revisited: a prospective study of 34 consecutive cases. *Chest* 2001; 120:369-376.
118. Chinn S, Rona RJ. Can the increase in body mass index explain the rising trend in asthma in children? *Thorax* 2001; 56:845-850.
119. Shore SA. Obesity and asthma: implications for treatment. *Curr Opin Pulm Med* 2007; 13:56–62.
120. Akerman MJ, Calacanis CM, Madsen MK. Relationship between asthma severity and obesity. *J Asthma* 2004; 41:521–526.
121. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995; 1:1155-1161.
122. Kim S, Camargo CA Jr. Sex-race differences in the relationship between obesity and asthma: the behavioral risk factor surveillance system, 2000. *Ann Epidemiol* 2003; 13:666-673.
123. Devereux G. *ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Definition, epidemiology, and risk factors.* *BMJ* 2006; 332:1142-1144.
124. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Workshop report, Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. September 2005. Available: [www.goldcopd.org/Guidelineitem](http://www.goldcopd.org/Guidelineitem).
125. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica: mecanismos moleculares y celulares. *Eur Respir J* 2004; 5:76-95.

126. Dowson LJ, et al. Longitudinal changes in physiological, radiological, and health status measurement in alpha (1)-antitrypsin deficiency and factors associated with decline. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1805-1809.
127. Britton JR et al Dietary antioxidant vitamin intake and lung function in the general population. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1383-1387.
128. Orie NGM et al. The host factor in bronchitis. In Orie NGM, Sluiter HJ eds. *Bronchitis, an international symposium Assen, Netherland:Royal Vangorcum, 1961.*
129. Hoppers JJ et al. Histamine airways hyper-responsiveness and mortality from chronic obstructive pulmonary disease:a cohort study. *Lancet* 2000; 356:1313-1317.
130. Feinleib M. et al. Trends in COPD morbidity and mortality in the United States. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:S9-18.
131. Abbey DE. et al. Long-term particulate and other air pollutants and lung function in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:289-298.
132. Hendrik DJ. et al. Occupational and chronic obstructive pulmonary disease [COPD]. *Thorax* 1996; 51:947-955.
133. Retamales I. et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Med* 2001; 164:469-473.
134. Wilson DO, Rogers RM, Wright EC, et al. Body weight in chronic obstructive pulmonary disease. The National Institutes of Health Intermittent Positive-Pressure Breathing Trial. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:1435-1438.
135. Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, Pinto Plata V, Cabral HJ. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350:1005-1112.
136. Schols AM, Slangen J, Volovics L, Wouters EF. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1791-1797.
137. McClean KM, Kee F, Young IS, Elborn JS. Obesity and the lung: 1 *Epidemiology. Thorax* 2008; 63:649-654.

138. Miyake Y, Sasaki S, Yokoyama T, Chida K, Azuma A, Suda T, Kudoh S, Sakamoto N, Okamoto K, Kobashi G, Washio M, Inaba Y, Tanaka H. Dietary fat and meat intake and idiopathic pulmonary fibrosis: a case-control study in Japan. Japan Idiopathic Pulmonary Fibrosis Study Group. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10:333-339.
139. Iwai K, Mori T, Yamada N, Yamaguchi M, Hosoda Y. Idiopathic pulmonary fibrosis. Epidemiologic approaches to occupational exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:670-675.
140. Miyake Y, Sasaki S, Yokoyama T, Chida K, Azuma A, Suda T, Kudoh S, Sakamoto N, Okamoto K, Kobashi G, Washio M, Inaba Y, Tanaka H. Vegetable, fruit, and cereal intake and risk of idiopathic pulmonary fibrosis in Japan. *Ann Nutr Metab* 2004; 48:390-397. .
141. Enomoto T, Usuki J, Azuma A, Nakagawa T, Kudoh S. Diabetes mellitus may increase risk for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2003; 123:2007-2120.
142. Gribbin J, Hubbard R, Smith C. Role of diabetes mellitus and gastro-oesophageal reflux in the aetiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2009; 103:927-931.
143. García-Sancho Figueroa MC, Carrillo G, Pérez-Padilla R, Fernández-Plata MR, Buendía-Roldán I, Vargas MH, Selman M. Risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis in a Mexican population. A case-control study. *Respir Med*. 2009.
144. Woessner JF Jr. The determination of hidroxiprolin in tissue and proteins samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 1961; 93:440-447.
145. Chicco A, Bernal C, Soria A, Giangrossi BS, Lombardo Y. Dietary effects of partial or total substitution of sucrose for starch on glucose and lipid metabolism in dyslipidemic rats. *Nutr Res* 1999; 19:281–293.
146. Commerford SR, Pagliassotti MJ, Melby CL, Wei Y, Gayles EC, Hill JO. Fat oxidation, lipolysis and free fatty acid cycling in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279:875–885.
147. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Król E. The contribution of animal models to the study of obesity. *Lab Anim* 2008; 42:413-432.

148. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AA, Cicogna AC, Novelli Filho JL. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* 2007;41:111-119.
149. Rothwell NJ, Stock MJ. Regulation of energy balance. *Annu Rev Nutr.* 1981; 1:235-256.
150. Hiriart M, Navarro-Tableros V, Sánchez-Soto C, Robles G, Aguirre J, Gutierrez G, Vidaltamayo R, Duhne M, Moreno J, Hong E. Obesity, insuline resistance and metabolic síndrome in Wistar rats treated with a sucreose rich diet. American Diabetes Association. 68th scientific sessions, June 6-10, 2008, San Francisco, Ca.
151. Velasco M, Larque CA, Gezginci-Oktayoglu S, Navarro-Tableros V, Duhne M, Moreno J, Hong E, Hiriart M. Long-Term High-Sucrose Diet in Rat Increases Beta Cell Area within Pancreatic Islets, But Impairs Insulin Secretion. American Diabetes Association. 69th scientific sessions, June 5-9, 2009, New Orleans, Louisiana.
152. Vitamin levels in lung tissue of rats with bleomycin induced pulmonary fibrosis. Mert H, Yoruk I, Ertekin A, Dede S, Deger Y, Yur F, Mert N. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2009; 55:186-190.
153. Erden ES, Kirkil G, Deveci F, Ilhan N, Cobanoğlu B, Turgut T, Muz MH. Effects of erdosteine on inflammation and fibrosis in rats with pulmonary fibrosis induced by bleomycin *Tuberk Toraks* 2008; 56:127-138.
154. Pardo A, Ruiz V, Arreola JL, Ramírez R, Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Barrios R, Kala SV, Lieberman MW, Selman M. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:925-932.
155. Hagood JS, Prabhakaran P, Kumbala P, Salazar L, MacEwen MW, Barker TH, Ortiz LA, Schoeb T, Siegal GP, Alexander CB, Pardo A, Selman M. Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am J Pathol* 2005; 167:365-379.
156. Palacio A, Lopez M, Perez-Bravo F, Monkeberg F, Schlesinger L. Leptin levels are associated with immune response in malnourished infants. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3040-3046.

157. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998; 394: 897-901.
158. Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3686-3695.
159. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 2002; 110:1093-1103.
160. Olszanecka-Glinianowicz M, Zahorska-Markiewicz B. Obesity as inflammatory disease. *Postepy Hig Med Dosw* 2008; 27:249-257.
161. Hall JA, French TK, Rasmusson KD, Vestly JC, Roberts CA, Rimmasch HL, Kfoury AG, Renlund DG. The paradox of obesity in patients with heart failure. *J Am Acad Nurse Pract* 2005; 17:542-546.
162. Curtis JP, Selter JG, Wang Y, Rathore SS, Jovin IS, Jadbabaie F, Kosiborod M, Portnay EL, Sokol SI, Bader F, Krumholz HM. The obesity paradox: body mass index and outcomes in patients with heart failure. *Arch Intern Med*. 2005; 10:55-61.
163. Tankó LB, Christiansen C. Can the obesity paradox be explained by the protective effects of peripheral adiposity? *Arch Intern Med* 2005; 165:1796-1797.

## APÉNDICE DE SOLUCIONES

- **Ensayo de ELISA para insulina**

### Buffer de lavado

- 40 ml buffer de lavado 21x (0.01ug/l)
  - 800 ml de H<sub>2</sub>O desionizada
- Mezclar y mantener el sobrante en refrigeración.

### Solución Enzima conjugada

- 600 ul de enzima conjugada 11X
  - 6 ml de buffer de la enzima conjugada
- Mezclar y mantener en oscuridad.

- **Cuantificación de hidroxiprolina**

### Solución de Cloramina T (para 10ml)

- 1.41 g de cloramina T (p-tolueno-sulfonilcloramida de sodio)
  - 20 ml de agua destilada
  - 30 ml de metil celosolve (2-metoxietil acetato)
  - 50 ml de buffer Tris pH 6
- Mezclar. Se prepara antes de usar.

### Ácido perclórico 3.15 M

- 27 ml de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) al 70%
  - 100 ml de agua dde
- Mezclar.

### Reactivo de Erlich al 20%

- 20 g p-dimetil.aminobanzaldehído
  - 100 ml de metil celosolve
- Mezclar. Se prepara antes de usar.

### Buffer Tris pH 6

- 54.63 g de ácido cítrico monohidratado
  - 72.35 g de acetato de sodio anhidro
  - 12 ml de ácido acético glacial
  - 34 g de hidróxido de sodio
- Preparar 1 L de volumen final. Ajustar a pH 6. Mantener en refrigeración.

### Solución de Hidroxiprolina

- 5 mg de hidroxiprolina (4-trans hidroxil-L-Prolina)
- 50 ml HCl 1 mM