EFECTOS DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN EL SISTEMA RESPIRATORIO. PAPEL DE LOS RECEPTORES TRPV1 EN LA FIBROGÉNESIS PULMONAR

P. Moreno Casado[1, 3], I. Cantarero Carmona[2], A. Álvarez Kindelán[1, 3], E. Muñoz Blanco[2], M.A. Calzado Canales[2], A. Salvatierra Velázquez[1, 3].

[1]UGC Cirugía Torácica y Trasplante Pulmonar. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. [2]Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba. [3]Grupo Asociado Neoplasias Torácicas-Trasplante Pulmonar. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

Proyecto financiado con Beca Fundación Neumosur 14/2010.

Resumen:

Objetivos: establecer un modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, investigando el posible papel protector del sistema endocannabinoide (SE) frente a la fibrosis.

Métodos: se emplearon ratones salvajes (C5BL/6 y Balb/c) así como la cepa TRPV1-/-. Tras una única dosis intratraqueal de bleomicina, se analizó la respuesta fibrótica mediante un análisis histológico, la determinación de la expresión de marcadores del proceso profibrótico, el estudio de la actividad mieloperoxidasa y del contenido en hidroxiprolina del pulmón, así como el análisis de la expresión génica de VIP, PACAP, IL-1β, IL-6, TNF-α e IL-11, y el estado de activación de las rutas MAPKs (fosfo-JNK, fosfo-ERK) de la ruta de NF-ϰB (p-IϰBα), la ruta de β-catenina y del TGFβ (GSK-3B), la activación de SMAD (p-SMAD2) y pSTAT3, a nivel proteico.

Resultados: la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en los ratones de la cepa TRPV-/- fue más severa que en la cepa salvaje C5BL/6. El contenido en hidroxiprolina y la actividad mieloperoxidasa fue mayor en los ratones TRPV1-/-. Se detectó un incremento significativo en la expresión génica de citoquinas proinflamatorias *(TNF-a, IL-1b, IL11 e IL-6)*, pero no de VIP o PACAP, en la cepa TRPV1-/-. A nivel proteico, la expresión de pIKBα, pSTAT3, pSMAD2 y pJNK, pero no la de pERK, se vio incrementada en los ratones TRPV1-/-.

Conclusiones: el modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina sigue siendo clave para continuar profundizando los conocimientos acerca de la patogénesis de la FPI. La modulación del SE podría tener un papel protector frente a la fibrosis pulmonar.

Palabras clave: fibrosis pulmonar idiopática (FPI), bleomicina, modelos murinos, sistema endocannabinoide (SE).

ENDOCANNABINOID SYSTEM EFFECTS ON THE RESPIRATORY SYSTEM. THE ROLE OF TRPV1 RECEPTORS IN PULMONARY FIBROSIS

Abstract

Objectives: to establish a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis, analysing the possible protective role of the Endocannabinoid System (ES) against fibrosis.

Methods: wild C5BL/6 and Balb/c mice, as well as the genetically modified strain TRPV1-/- were used. After a single dose of intratracheal bleomycin, the fibrotic response was analysed though histologic studies, the assessment of proinflammatory markers, myeloperoxidase activity, hydroxyproline content, genetic expression of VIP, PACAP, IL-1 β, IL-6, TNF-α and IL-11, as well as MAPK route (phospho-JNK, phospho-ERK), NF-ϰB (p-IϰBα), β-cathenin, TGF-β (GSK-3B), SMAD (p-SMAD2) and pSTAT3, at a protein level.

Results: pulmonary fibrosis was more severe in TRPV1-/- mice compared to C5BL/6 mice. A significant increase in proinflammatory markers such as *TNF-a, IL-1β, IL11 and IL-6*, but not VIP or PACAP, was observed. pIKBα, pSTAT3, pSMAD2 and pJNK, but not pERK, were increased at a protein level in TRPV-/- mice.

Conclusions: the murine model of bleomycin-induced lung fibrosis remains a keystone to pioneer current investigation in lung fibrosis. Modulation of the ES might have a protective role.

Key words: idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), bleomycin, murine models, endocannabinoid system (ES)

Recibido: 16 de noviembre de 2015. Aceptado: 6 de abril de 2017.

Paula Moreno Casado
pmoreno39@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Las neumonías intersticiales idiopáticas engloban un grupo heterogéneo de enfermedades que se incluyen dentro de lo que se denomina enfermedad pulmonar intersticial idiopática (EPID). Bajo el paraguas de la EPID se incluyen entidades clínico-patológicas tan diversas como la Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI), la neumonía intersticial no especificada (NINE), la bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad pulmonar intersticial, la neumonía organizada criptogenética, la neumonía intersticial aguda, la neumonía intersticial descamativa y la neumonía intersticial linfoidea[1]. Estos trastornos pulmonares difusos se caracterizan, típicamente, por la presencia de inflamación en el intersticio pulmonar, diferenciándose unos de otros por la clínica conjuntamente con los hallazgos radiológicos y/o anatomo-patológicos.

La FPI es el paradigma de la patología pulmonar inflamatoria crónica que conduce a una enfermedad pulmonar terminal y constituye, en la actualidad, la principal indicación de trasplante pulmonar. La FPI es la forma de neumonía intersticial idiopática más prevalente y la más agresiva de todas las enfermedades pulmonares intersticiales difusas, de modo que la mediana de supervivencia desde el diagnóstico es de tan sólo de 2 a 5 años[2]. Su afectación se limita al parénquima pulmonar, teniendo una prevalencia estimada de 3 a 20 casos por cada 100.000 habitantes.

El tratamiento empleado en los últimos 50 años, consistente en la administración de corticoides y fármacos citotóxicos, tales como la azatioprina o la ciclofosfamida, no ha demostrado tener un beneficio significativo en términos de supervivencia. Este panorama cambió en el año 2011 con la aprobación de la pirfenidona, el único fármaco específico que ha demostrado frenar la evolución de la enfermedad.

El trasplante pulmonar es una modalidad terapéutica aceptada para los pacientes con EPID progresiva que conduce a un fracaso respiratorio y es refractaria al tratamiento médico estándar a dosis máximas[3]. En 2007, el número de trasplantes pulmonares en pacientes con FPI superó a los realizados por EPOC, convirtiéndose así en la principal indicación de trasplante pulmonar en EEUU.

La investigación de la fibrosis pulmonar se ha basado en la modulación de la enfermedad con el empleo de modelos animales. Entre los agentes externos que pueden administrarse inducir fibrosis pulmonar destacan la bleomicina, partículas inorgánicas (sílice, asbesto), irradiación, transferencia génica (TGF-β, IL-1β, GM-CSF), isocianato de fluoresceína (FITC), pentóxido de vanadio, o agentes hapténicos (ácido trinitrobenceno-sulfónico).

En las 3 últimas décadas, el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina ha liderado la investigación básica en la regulación de la fibrogénesis pulmonar. Se cree que el mecanismo por el cual se produce el daño pulmonar es a través de una rotura directa de la cadena de ADN y la generación de radicales libres, induciendo así estrés oxidativo[4]. El potencial de este agente antineoplásico de inducir fibrosis pulmonar a nivel experimental fue demostrado por primera vez en perros[5]. Más tarde, Snider y cols.[6] popularizaron la administración única intratraqueal en animales de pequeño tamaño.

El Sistema Endocannabinoide (SE) está compuesto por ligandos endógenos, sus enzimas reguladoras y sus receptores (CB1, CB2 y TRPV1) centrales y/o periféricos. Entre las funciones conocidas del SE destacan la de regular la homeostasis del organismo, poseer propiedades antitumorales, la regulación del metabolismo energético, la regulación de la respuesta al estrés, efectos neuromoduladores e inmunomoduladores, analgesia o la termo-regulación. Entre los endocannabinoides identificados hasta la fecha se encuentran la anandamida (N-araquidonil-etanolamida, AEA), el 2-araquidonil-glicerol (2-AG), el éter del 2-araquidonil-glicerol (éter de noladín), el O-araquidonil-etanolamina (virodhamina), y la N-araquidonil-dopamina (NADA). El receptor TRPV1 se expresa ampliamente en el tracto respiratorio.

Puesto que el papel del SE en la fibrosis pulmonar aún no ha sido abordado, el objetivo del presente trabajo fue analizar el papel del sistema endocannabinoide en la fibrosis pulmonar, desarrollando un modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales: se emplearon ratones machos de unos 40 gramos de peso y unas 10 - 14 semanas de edad, de las cepas salvajes C5BL/6 y Balb/c, y ratones modificados genéticamente de las cepas TRPV1-KO. Se mantuvieron en condiciones óptimas de estabulación, establecidas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba y la normativa legal vigente (R.D. 1201/2005). Los animales se mantuvieron en jaulas de plástico rellenas de serrín, manteniendo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y con acceso a agua y pienso ad libitum. Las cepas C5BL/6 y Balb/c fueron adquiridas a *Harlan Sprague-Dawley Inc.* (Indianapolis, IN) (BN), y *Charles River Canada Inc.* (St. Constant, PQ, Canadá), respectivamente. La cepa TRPV1 fue adquirida a *The Jackson Lab* (EEUU).

Modelo experimental de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina: se desarrolló un modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Para ello, se emplearon un total de 60 ratones. Los ratones fueron asignados de forma aleatoria a 6 grupos de experimentación, empleándose 10 animales en cada uno. A los animales del grupo control se les administró suero por vía intratraqueal, mientras que a los del grupo de tratamiento se les administró una sola dosis de bleomicina por intubación endotraqueal. Los grupos de tratamiento fueron, por tanto, los siguientes:

a) C5BL/6 control (n=10) y C5BL/6 bleomicina (n=10).
b) Balb/c control (n=10) y Balb/c bleomicina (n=10).
c) TRPV1-KO control (n=10) y TRPV1-KO bleomicina (n=10).

En el modelo experimental, los animales recibieron administraciones intratraqueales en dosis única de sulfato de bleomicina (0,06 mg en 50µL de suero salino; Bleomicina Mylan 15.000 UI; Mylan Pharmaceuticals, S.L. Barcelona, España) o sólo 50µL de suero salino el primer día de tratamiento (día 0). Para ello, se les anestesió previamente con Ketamina+Diazepam por vía intraperitoneal. Inmediatamente después de la instilación, los animales fueron colocados en sedestación forzada para favorecer la distribución endobronquial del fármaco, por efecto de la gravedad. Los animales fueron sacrificados el día 14 por exanguinación desde la aorta torácica, bajo anestesia general. El pulmón derecho se congeló a -80ºC para realizar extracciones de proteínas, ARN, medición de actividad de mieloperoxidasa (MPO) y cuantificación de contenido en hidroxiprolina; el izquierdo se preservó con formaldehido, administrado a través del bronquio principal para procesarlo en parafina y realizar estudios de histología e inmunohistoquímica.

Desde la administración del tratamiento, se monitorizó diariamente la pérdida de peso y la mortalidad en los grupos. Previamente a la realización de los experimentos definitivos, se desarrolló un entrenamiento en la técnica de la administración intratraqueal de sustancias en suspensión, en el que se comprobó que la administración era correcta, al objetivarse una distribución uniforme por ambos pulmones tras inyectar por vía intratraqueal suero fisiológico con colorante (azul de metileno).

Examen morfológico: se indujo daño pulmonar mediante la administración intratraqueal de una sola dosis de sulfato de bleomicina, y se compararon los hallazgos con los grupos control de las mismas cepas de ratones, a los que se les administró suero exclusivamente. Los cambios fibróticos fueron máximos a los 14 días del tratamiento, momento en que los animales fueron sacrificados.

Tras la inducción anestésica y realizar una esterno-laparotomía media, se extrajo el bloque bipulmonar. Se explantó el pulmón derecho tras ligar y seccionar el bronquio principal a nivel del hilio y se preservó a -80ºC. El pulmón izquierdo de cada ratón fue perfundido con formol, infundido por canalización traqueal y se mantuvo dicha preservación durante las siguientes 24 horas. Después de embeber el pulmón en parafina, se prepararon secciones de 5 µM para ser teñidas con hematoxilina-eosina (para llevar a cabo estudios histológicos de rutina) y tricrómico de Masson (para colágeno maduro). Se empleó la escala de Ashcroft[7] para analizar cuantitativamente los cambios fibróticos inducidos por la administración de bleomicina, desde 0 (no fibrosis) hasta 8 (fibrosis masiva en todos los campos). Se determinó la severidad de los cambios fibróticos en cada sección de pulmón como la puntuación media de todos los campos de aumento observados, analizándose un mínimo de 10 campos de gran aumento en cada sección. Tras analizar la sección histológica en su totalidad, la media de las puntuaciones de todos los campos analizados se catalogó como el índice fibrótico. Cada muestra fue puntuada de forma independiente por 4 observadores. Finalmente, la media de las puntuaciones obtenidas por estos fue considerada como el índice fibrótico final.

Inmunohistoquímica: para estudiar el contenido en macrófagos de los pulmones con fibrosis respecto a los pulmones sanos, se empleó el anticuerpo específico frente a macrófagos F4/80. El anticuerpo monoclonal frente al F4/80 diferencia claramente a los macrófagos de los fibroblastos en los tejidos fibróticos, siendo el marcador de elección en ratones. Se montaron secciones de 5µm de tejido en portas para microscopía y se deshidrataron y rehidrataron en pasos sucesivos. Después de 5 min de exposición al buffer DAKO y de ser tratados con H_2O_2 al 3% durante 5 min, se procesaron para realizar los estudios de inmunohistoquímica. Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de bloquear con suero de cabra durante 10 min, se incubaron con el anticuerpo primario específico F4/80. Tras realizar lavados cortos, se incubaron primero con el anticuerpo secundario biotinilado, y después con el complejo avidina-biotina-peroxidasa. A continuación, tras realizar otros lavados entre incubaciones, se revelaron con 3,3'-diaminobenzadine (DAB; Biomedia, CA), 2 x 5 min. Finalmente, las

tinciones fueron teñidas con hematoxilina, rehidratadas y montadas en un cubre, para cuantificar la tinción al microscopio. Se cuantificó de forma arbitraria la tinción de F4/80 para macrófagos, mediante el contaje del número de células que expresaban el marcador (porcentaje).

Cuantificación del contenido en hidroxiprolina: se determinó la cantidad pulmonar de colágeno mediante la medición del contenido de hidroxiprolina en el pulmón derecho de cada animal, tanto de los grupos de tratamiento como de los controles. Para ello, se emplearon los pulmones derechos de los 6 grupos de tratamiento (congelados a -80ºC). El objetivo fue determinar la expresión total de hidroxiprolina por mg de tejido pulmonar húmedo, como marcador cuantitativo del depósito de colágeno y fibrosis. La hidroxiprolina es un aminoácido que se encuentra específicamente en el colágeno. Se pesó cada pulmón y se preparó un homogenado al 10%, empleando suero salino helado que fue infundido por la arteria pulmonar, congelándolo después a -80ºC. Finalmente, los pulmones congelados fueron disgregados en Ultraturrax con PBS sin Ca^{+2}/Mg^{+2}. Se estimó el depósito de colágeno determinando el contenido total en hidroxiprolina del pulmón por espectrofotometría.

Determinación de la actividad mieloperoxidasa: se determinó la actividad mieloperoxidasa como marcador de la intensidad de la reacción inflamatoria mediante determinación por espectrofotometría. La mieloperoxidasa es la enzima pro-inflamatoria más abundante dentro de los gránulos azurófilos de los neutrófilos, así como en los monocitos/macrófagos. Para ello, se emplearon pulmones enteros congelados a -80ºC. Estos experimentos fueron llevados a cabo en placas de 96 pocillos. Se midió la actividad peroxidasa con 3, 39, 5, 59 - Tetramethylbenzidine (TMB, Sigma): Se mezclaron 10 ml de muestra con 80 ml 0,75 mM de H2O2 (Sigma) y 110 ml de solución TMB (2,9 mM TMB en 14,5% de DMSO [Sigma] y 150 mM buffer Fosfato sódico con pH 5,4), incubándose la placa a 37ºC durante 5 min. La reacción fue detenida añadiendo 50 ml 2 M de H2SO4 (Sigma), y se midió la densidad óptica a 550 nm en un lector de microplacas. Se calculó la actividad mieloperoxidasa como picomoles por miligramo de tejido pulmonar, corregida por ratio húmedo/seco, de pulmón de grupo tratamiento vs pulmón de grupo control. Los valores fueron expresados como unidades arbitrarias (medias ± DE), comparando bleomicina vs control y cada cepa entre sí.

Extracción de ARNm: se obtuvo ARN total partir de los pulmones derechos preservados a -80ºC y empleando el RNeasy Mini Kit (Qiagen). Seguidamente, 1ug de ARN total fue retrotranscrito a cDNA empleando el iSCRIPT cDNA Synthesis Kit (Bio-RAD). La evaluación cuantitativa de la expresión del ARN fue llevada a cabo mediante qPCR, empleando cDNA sin diluir, en un volumen total de 10 uL, usando el Kit Master SYBR Green I mix. Los primers de estudio empleados fueron VIP, PACAP, IL-1β, IL6, TNFα e IL-11, utilizando β-Actina como control interno. La amplificación se llevó a cabo en un iCycler PCR Detection System (Bio-Rad). Se expresaron los niveles de ARNm como números absolutos, después de normalizar con los niveles de β-Actina, comparando los grupos de tratamiento con los controles, para cada cepa. Las secuencias de los primers empleados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de los primers empleados

PRIMER	SECUENCIA
IL-1β	forward 5´-GACCTTCCAGGATGAGGACA-3´
	reverse 5´-AGCTCATATGGGTCCGACAG-3´
TNF-α	forward 5´-ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3´
	reverse 5´-GTGGGTGAGGAGCACGTAGT-3´
IL-6	forward 5´-GTATGAACAACGATGATGCACTTG-3´
	reverse 5´-ATGGTACTCCAGAAGACCAGAGGA-3´
IL-11	forward 5´-CTGCACAGATGAGAGACAAATTCC-3´
	reverse 5´-GAAGCTGCAAAGATCCCAATG-3
VIP	forward 5´-ATGCTGATGGAGTTTTCACCA-3´
	reverse 5´- TGCAGAATCTCCCTCACTGCTC-3´
PACAP	forward 5´-CTGCTGGTGTATGGGATAAT-3´
	reverse 5´- CTACAAGTATGCTATTCGGC-3´
β-Actina	forward 5'-CCAGCCTTCCTTCTTGGGTAT-3´
	reverse 5'-TGGCATAGAGGTCTTTACGGATGT-3

IL-1β: Interleuquina 1β; TNF-α: Factor de necrosis tumoral α; IL-6: Interleuquina 6; IL-11: Interleuquina 11; VIP: vasoactive intestinal peptide (péptido intestinal vasoactivo); PACAP: Pituitaryadenylatecyclase-activatingpolypeptide (Polipéptido hipofisario activador de adenilatociclasa).

Extracción de proteínas y estudios Western-blot: se realizaron extracciones de proteínas a partir de un fragmento de pulmón derecho (congelado a -80ºC) tanto de ratones control como del grupo de tratamiento (bleomicina). A cada fragmento se le añadieron 300 ml del buffer de extracción de proteínas (50mM Tris-HCl pH7,5, 150mM NaCl, 10% Glicerol, 10% NP-40) conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasas. Tras homogenizar las muestras (Ultraturrax T10), fueron incubadas 15 minutos en hielo, siendo centrifugadas a continuación durante otros 15 minutos a 12.000 r.p.m. Las proteínas obtenidas en el sobrenadante fueron cuantificadas mediante espectrofotometría (Genesis 10uv, Thermo Scientific). Seguidamente, se añadió buffer laemli y se incubaron 2 min a 95ºC. Para el análisis de señalización se estudió por western blot el estado de activación de las MAPKs (fosfo-JNK, fosfo-ERK) de la ruta de NF-ϰB (p-IϰBα), la ruta de β-catenina y del TGFβ (GSK-3B), la activación de SMAD (p-SMAD2) y pSTAT3, empleando α-tubulina como control. Para realizar los western blot se incubaron las membranas con el anticuerpo primario a 4ºC durante toda una noche; tras 3 lavados breves, se incubaron con el anticuerpo secundario. Finalmente, después de otros 3 lavados breves, se detectaron los complejos inmunes empleando el *Alpha Innotech detection system* (Alpha Innotech Corp., San Leandro-CA, USA). Se analizó la intensidad de las bandas utilizando el software Image J 1.46r software *(National Institutes of Health, USA)*, comparando la expresión de cada proteína en el pulmón fibrótico, en el pulmón sano y en cada cepa.

Análisis estadístico: para el estudio estadístico se empleó el programa GraphPad Prism 5. Los resultados numéricos se expresaron como medias ± DE. Se empleó el test de Mann-Whitney no paramétrico para comparar variables numéricas y el test exacto de Fischer para comparar variables categóricas. Para variables de estudio tipo proporciones se muestran las diferencias. que se presentaron en forma de porcentajes. Se consideraron como significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Hallazgos histológicos: el análisis histológico llevado a cabo a los 14 días de la inducción con bleomicina vs suero mostró la presencia de cambios fibróticos focales de predominio subpleural y perivascular, con áreas de consolidación parenquimatosa, pérdida de la arquitectura alveolar normal, así como un prominente infiltrado inflamatorio en el espacio alveolar e intersticial (Figura 1). Comparado con la cepa C5BL/6 (Figura 1A), los cambios fibróticos fueron significativamente más severos en la cepa TRPV1-/- (Figura 1B). Así, se evidenció la presencia de una fibrosis severa e intensa, que se extendía desde las regiones subpleurales hacia las zonas centrales del pulmón, afectando a las áreas perivasculares y peribronquiales. Asociado a dichas áreas de fibrosis, se detectó un depósito anormal de colágeno en el espacio alveolo-intersticial, como se muestra gracias al empleo de la tinción de Tricrómico de Masson (Figura 1B). Por el contrario, en la cepa C5BL/6 el grado de fibrosis fue inferior, observándose menos lesiones fibróticas subpleurales, así como un leve infiltrado inflamatorio parenquimatoso en las áreas centrales (Figura 1ª). Como cabía esperar, en la cepa Balb/c no se produjo una fibrosis pulmonar significativa.

Evaluación cuantitativa de los cambios histológicos producidos: se determinó el índice fibrótico, empleando la escala numérica de Ashcroft, a los 14 días de la administración de tratamiento (bleomicina vs suero). Se evidenció una correlación significativa entre los índices fibróticos obtenidos por cada uno de los 4 observadores ($r^2 = 0,9$; $p = 0,001$) (Figura 1C). El índice fibrótico medio de los ratones TRPV1-/- tratados con bleomicina fue superior al de la cepa salvaje C5BL/6 (4,5 ± 0,2 vs 2,3 ± 0,2). Por el contrario, no se evidenciaron cambios fibróticos significativos en los ratones de la cepa Balb/c, así como en los tratados con suero (controles). Todos los animales sobrevivieron hasta la finalización del experimento.

Inmunohistoquímica: dado que los macrófagos constituyen uno de los principales estímulos causantes de la fibrosis pulmonar mediada por TGF-β, decidimos analizar por inmunohistoquímica el contenido en macrófagos en las cepa salvaje C5BL/6, así como en los ratones TRPV1-/-. Como se muestra en la Figura 1D, se evidenció que la población total de células positivas para el marcador F4/80 fue significativamente superior en los ratones TRPV1-/- tratados con bleomicina que en los ratones salvajes.

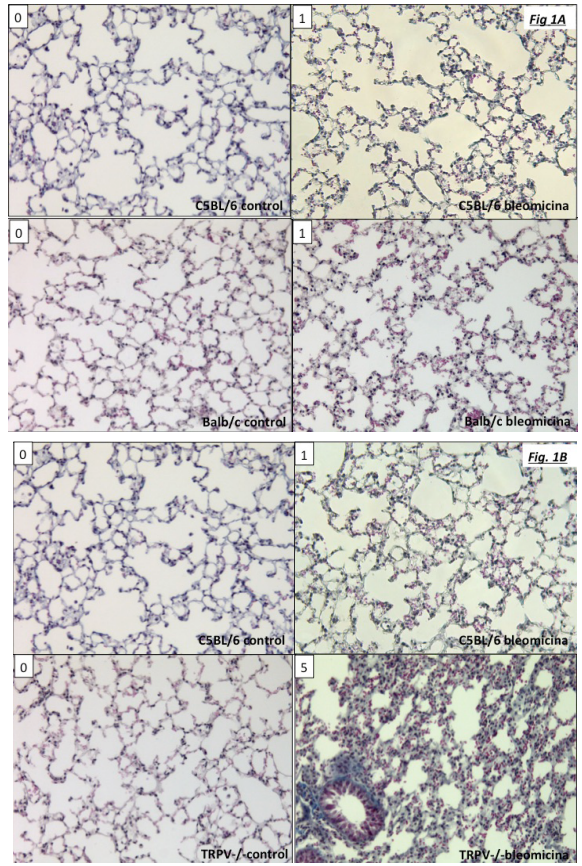


Fig 1A y 1B: Secciones histológicas procedentes de pulmones murinos tras la inducción de fibrosis pulmonar mediante instilación intratraqueal de bleomicina, comparado con suero (controles). Aumento original 100x. Se empleó la tinción de Tricrómico de Masson.
Fig 1A: Grupos de tratamiento empleando las cepas C5BL/6 y Balb/c. Tras la administración de bleomicina, en la cepa salvaje C5BL/6 se produjo una fibrosis en grado leve (Ashcroft 1), con un ligero infiltrado inflamatorio, un engrosamiento leve de las paredes alveolares o bronquiolares, y un mínimo depósito de fibras de colágeno. En los ratones de la cepa Balb/c no se produjo una fibrosis pulmonar significativa respecto a los controles a los que se les administró suero.
Fig 1B: Grupos de tratamiento empleando las cepas C5BL/6 y TRPV1-/- . En los ratones TRPV1-/- a los que se les indujo fibrosis pulmonar con bleomicina, se produjo una fibrosis intensa y parcheada, con daño severo de la estructura pulmonar, existiendo un incremento en la celularidad de los septos alveolares, un colapso alveolar, un engrosamiento del intersticio, y una fibrosis intraalveolar, objetivada como un depósito masivo de fibras de colágeno, respecto a los controles de la misma cepa a los que se les administró suero. Los ratones tratados con suero (controles) presentaron en todos los casos una arquitectura pulmonar normal.

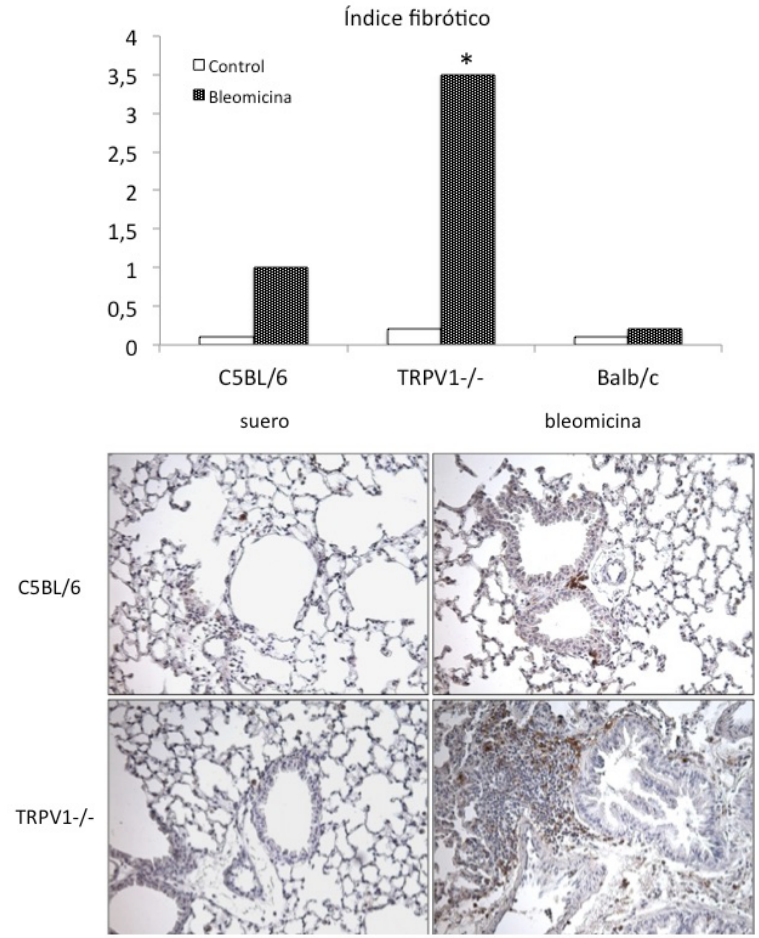


Fig 1C: Se muestra el índice fibrótico calculado para 5 ratones en cada grupo experimental, según la escala de Ashcroft. El índice fibrótico medio de los ratones TRPV1-KO tratados con bleomicina fue superior al de la cepa salvaje C5BL/6 (4,5 ± 0,2 vs 2,3 ± 0,2, p <0,05). Por el contrario, no se evidenciaron cambios significativos en los ratones de la cepa Balb/c, así como en los tratados con suero (controles).
Fig 1D: Inmunohistoquímica empleando el marcador de macrófagos F4/80: Aumento original 40x. Se muestra la presencia del marcador F4/80 en secciones pulmonares al día 14º de la administración de bleomicina. La población total de células positivas para el marcador F4/80 fue significativamente superior en los ratones TRPV1-/- tratados con Bleomicina que en los ratones salvajes.

Contenido en hidroxiprolina: la Figura 2 muestra los resultados del análisis del contenido de hidroxiprolina en los ratones tratados con bleomicina frente a los controles. Los resultados obtenidos muestran que la administración de una sola dosis intratraqueal de bleomicina incrementó de forma significativa los niveles pulmonares de hidroxiprolina a los 14 días, comparado con los ratones a los que solo se les administró suero (controles). Además, el incremento en hidroxiprolina fue aún mayor en los ratones tratados TRPV1-/- respecto a los controles (2,791 vs 1,951, p <0,001). Por el contrario, no se detectaron cambios significativos en la cepa Balb/c.

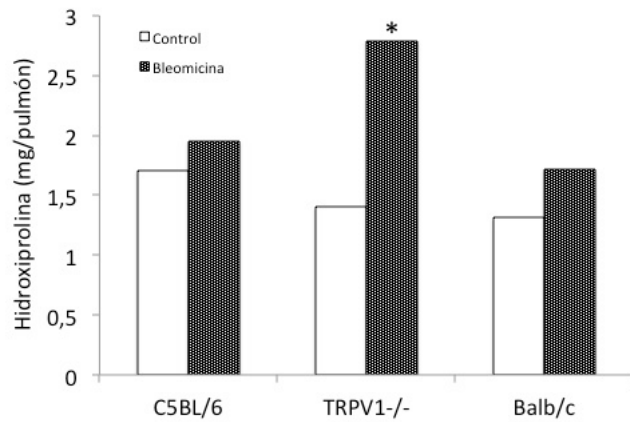


Figura 2. Niveles de hidroxiprolina presentes en ratones tratados con suero o bleomicina intratraqueal. Los valores se presentan como medias (miligramos/pulmón). Cada experimento se realizó en, al menos, 10 animales para cada grupo. En la cepa TRPV1-/- tratada con bleomicina, el contenido en hidroxiprolina fue significativamente superior (*P <0,05), comparado con suero. En las cepas salvajes C5BL/6 y Balb/c no se detectaron diferencias significativas en el contenido de hidroxiprolina.

Actividad mieloperoxidasa: se evidenció que los niveles de MPO presentes en el homogenado de los pulmones congelados a -80ºC eran muy bajos en los ratones a los que se les administró suero (grupo de no-inducción), comparado con los ratones a los que se les había administrado bleomicina, en los que se detectó un incremento significativo (Figura 3). Esto último, en consonancia con el acúmulo leucocitario evidenciado en el análisis histológico. Además, el incremento en MPO fue significativamente superior en la cepa TRPV-/- tratada con bleomicina, que en los C5BL/6.

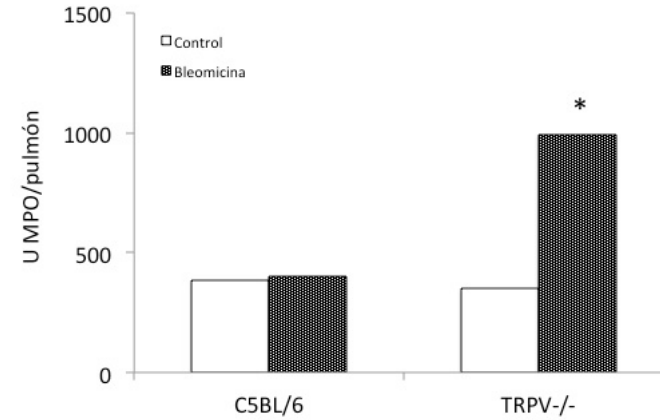
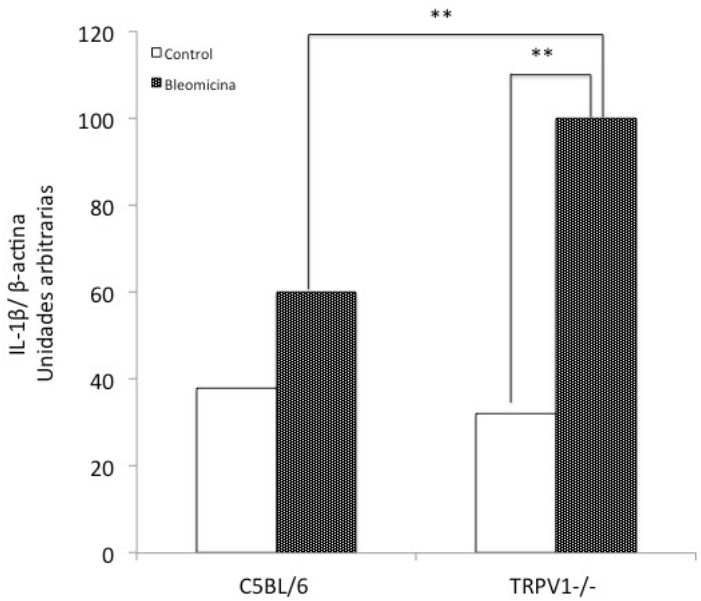
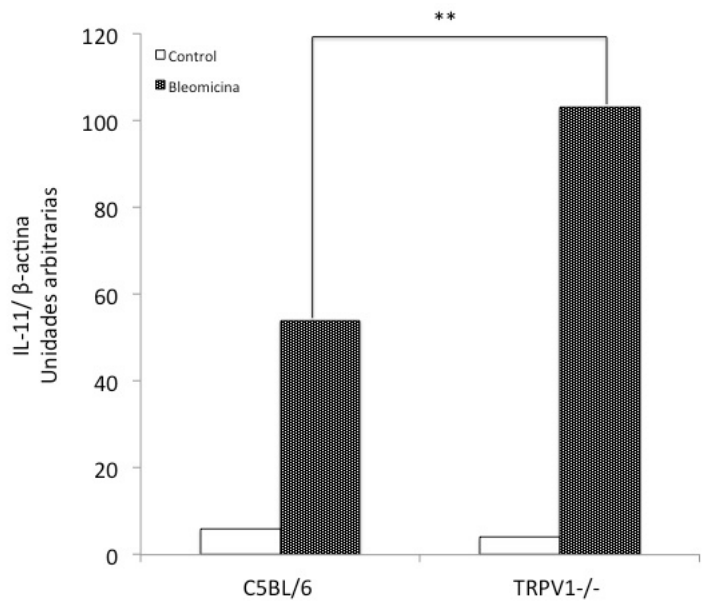
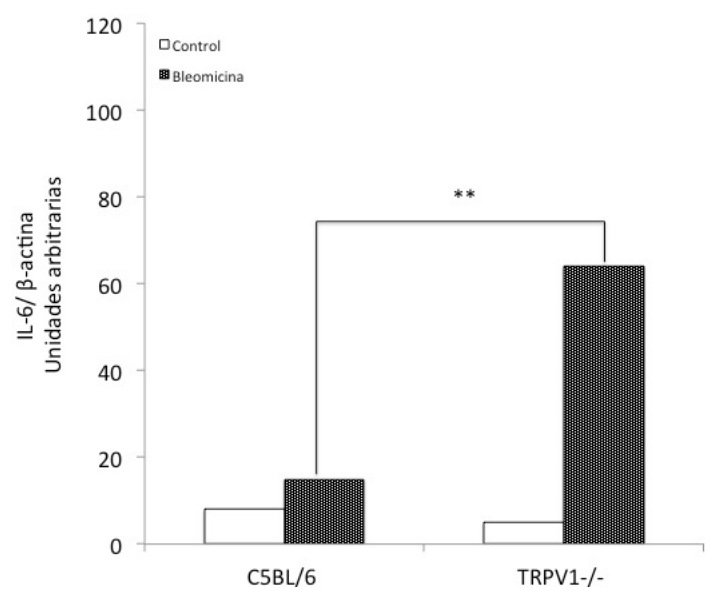


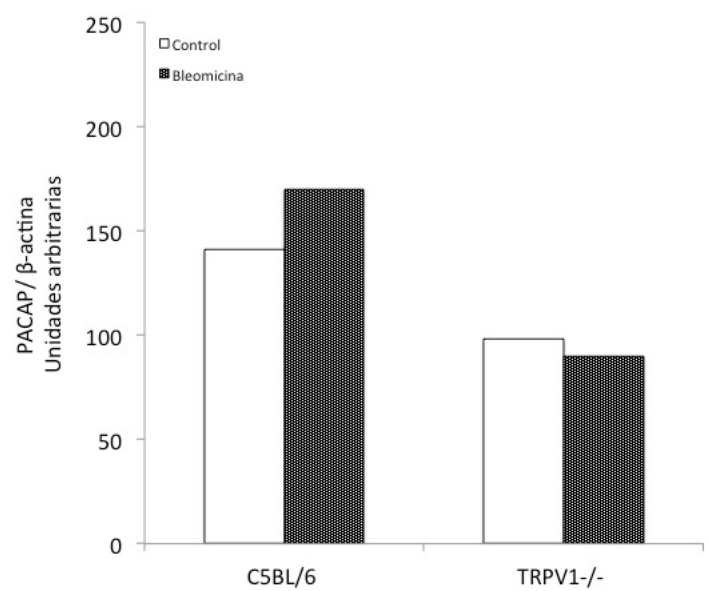
Figura 3. Se analizaron los niveles de mieloperoxidasa, como marcador del infiltrado inflamatorio leucocitario. Se detectó un incremento significativo en los niveles de mieloperoxidasa (MPO) en el homogenado de pulmones de ratones tratados con bleomicina respecto a los controles (grupo de no-inducción). El incremento en MPO fue significativo en los ratones C5BL/6 inducidos con bleomicina respecto a los C5BL/6 controles, así como en los TRPV1-/- tratados con bleomicina, respecto a los TRPV1-/- tratados con suero. Igualmente, se detectó un incremento significativo (*p <0,05) en los TRPV1-/- tratados con bleomicina respecto a los C5BL/6 tratados con bleomicina. Se incluyeron al menos 10 ratones por cada grupo.

Expresión ARNm: la administración de bleomicina se tradujo en un incremento de la expresión de genes proinflamatorios, como *TNF-a, IL-1b, IL-11 e IL-6*, tanto en ratones salvajes como en TRPV1-/- (Figura 4). Este incremento fue significativamente mayor en los TRPV1-/-. IL-6 e IL-11 pertenecen a la misma familia de citoquinas proinflamatorias, estando conectadas con las rutas de señalización de STAT3 y NF-kB. Se objetivó un incremento significativo en la expresión, tanto de IL-6 como de IL-11 a nivel de ARNm, tanto en los ratones C5BL/6 como en los TRPV1-/-. Por el contrario, se objetivó una potente inducción en la expresión de VIP a nivel de ARNm, en los ratones salvajes C5BL/6 tratados con bleomicina, comparado con la cepa TRPV1-/-. En el caso del neuropéptido PACAP, hubo una tendencia hacia una mayor expresión en la cepa salvaje C5BL/6, tratada con bleomicina, respecto a la cepa TRPV1-/-, aunque no estadísticamente significativa.


**
**
120
100
80
60
40
20
0
Control
Bleomicina
IL-1β/ β-actina
Unidades arbitrarias
C5BL/6
TRPV1-/-


**
120
100
80
60
40
20
0
Control
Bleomicina
IL-11/ β-actina
Unidades arbitrarias
C5BL/6
TRPV1-/-


**
120
100
80
60
40
20
0
Control
Bleomicina
IL-6/ β-actina
Unidades arbitrarias
C5BL/6
TRPV1-/-


250
200
150
100
50
0
Control
Bleomicina
PACAP/ β-actina
Unidades arbitrarias
C5BL/6
TRPV1-/-

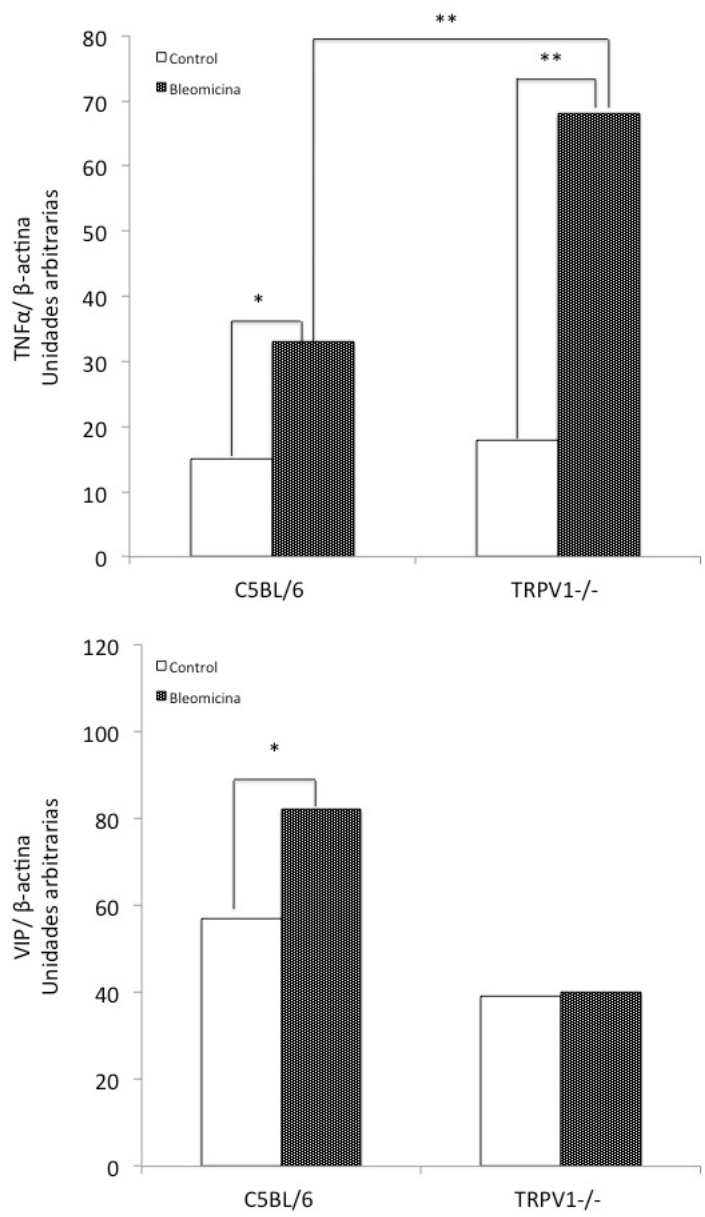


Figura 4. Inducción de la expresión pulmonar de citoquinas proinflamatorias (TNF-a, IL-1b, IL-11 e IL-6) en ratones tratados con suero o bleomicina intratraqueal. Se expresaron los niveles de ARNm como números absolutos, después de normalizar con los niveles de β-Actina, comparando los grupos de tratamiento con los controles, para cada cepa. Los resultados se muestran como medias, para cada grupo de tratamiento. Se consideraron significativos valores de p <0,05 (t-student). La ausencia de expresión del receptor TRPV1 incrementó de forma significativa la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria, tras la inducción con bleomicina. Histogramas mostrando la expresión relativa de citoquinas proinflamatorias obtenidas por RT-PCR a partir de ARNm extraído de tejido pulmonar preservado a -80ºC. Los niveles de VIP y PACAP fueron mayores en los ratones C5BL/6 tratados con bleomicina que en los TRPV1-/-.

DISCUSIÓN

En este trabajo demostramos la utilidad del modelo experimental, consistente en la administración intratraqueal de bleomicina instilada en dosis única en ratones, para estudiar la fibrosis pulmonar. En el presente estudio, analizamos el papel del sistema endocannabinoide en la fibrogénesis pulmonar, empleando la cepa de ratones TRPV1-/, la cual no expresa constitutivamente el receptor TRPV1. Nuestros resultados demuestran que la ausencia del receptor TRPV generó unos cambios fibróticos severos en los pulmones de ratones tratados con bleomicina. El sulfato de bleomicina se emplea frecuentemente en los modelos experimentales de fibrosis pulmonar, generalmente en roedores. La bleomicina es un agente quimioterápico cuyo efecto adverso más temido es la fibrosis pulmonar[8]. La bleomicina es inactivada por la enzima bleomicina-hidrolasa, la cual es producida en el pulmón en baja cuantía, de ahí su mayor susceptibilidad a presentar daño tóxico por este agente. Se cree que el mecanismo por el cual se produce el daño pulmonar es a través de una rotura directa de la cadena de ADN y la generación de radicales libres, induciendo así estrés oxidativo[4]. El potencial de este agente antineoplásico de inducir fibrosis pulmonar a nivel experimental fue demostrado por primera vez en perros[5]. Más tarde, Snider y cols.[6] popularizaron la administración única intratraqueal en animales de pequeño tamaño. La bleomicina genera un daño en el epitelio alveolar, presumiblemente secundario al daño que produce en el ADN, al que sucede una intensa reacción inflamatoria. A las 2 semanas de la administración, las respuestas inflamatoria y fibroproliferativa son perfectamente detectables en el tejido, como se refleja en el modelo analizado en el presente trabajo.

La fibrosis pulmonar es un trastorno crónico, caracterizado por un acúmulo excesivo de matriz extracelular y por un remodelado de la arquitectura del

pulmón. Las enfermedades que alteran el espacio intersticial, comprendido entre el endotelio vascular y el epitelio alveolar, se denominan enfermedades pulmonares intersticiales[1]. Cuando el espacio alveolar es ocupado por células inflamatorias y/o un depósito de colágeno, se altera el intercambio gaseoso y se reducen el número de unidades alveolares funcionantes[9]. La FPI es la forma más frecuente y severa de enfermedad pulmonar intersticial. A pesar del tratamiento con diversos fármacos, fundamentalmente corticoides e inmunosupresores, no existe ningún tratamiento efectivo, de modo que la mediana de supervivencia desde el diagnóstico es de 2 a 5 años[2].

Queda ampliamente demostrada la validez del modelo experimental de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (mediante la administración de una única dosis por vía intratraqueal) empleada en el presente proyecto. A pesar de que se han desarrollado numerosos modelos animales para investigar la fibrosis pulmonar, el más empleado y mejor caracterizado hasta la fecha es el que se basa en la administración de bleomicina a animales de pequeño tamaño. La ventaja del modelo es que una única administración de bleomicina produce daño pulmonar que resulta, a continuación, en fibrosis[6]. Nuestro trabajo corrobora que el modelo de inducción de fibrosis tras una única instilación intratraqueal de bleomicina, y posterior sacrificio de los animales a los 14 días, da lugar a una respuesta fibrótica máxima. Así, el sacrificio de los animales a los 14 días de la administración del agente fibrosante mostró la presencia de cambios fibróticos severos junto con un prominente infiltrado inflamatorio en los espacios alveolar e intersticial. Estos resultados confirman, igualmente, que la respuesta inflamatoria que tiene lugar a nivel pulmonar se caracteriza por una importante activación neutrofílica, como se demuestra en la importante elevación del contenido en mieloperoxidasa.

Es importante destacar que la cepa Balb-c no desarrolló una fibrosis pulmonar significativa, lo cual concuerda con lo publicado previamente en la literatura[10], con lo cual, esta cepa resultó muy útil como grupo control, además del control de tratamiento para todas las cepas a las que se les administró suero en lugar de bleomicina.

Es bien conocido que en la patogénesis y progresión de la fibrosis pulmonar existe un incremento en la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-1β y TNF-α, así como una menor expresión de la citoquina antifibrótica IFN-γ [11, 12]. Nuestros resultados son consistentes con estos trabajos. Así, el incremento en la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF-α, IL-1β, IL-11 e IL-6 podría ser explicada por un estímulo en la producción de las mismas por los macrófagos alveolares, puesto que se detectó un incremento significativo en la expresión del marcador de macrófagos F4/80. Además, el hecho de que los niveles de estas citoquinas fueran significativamente superiores en la cepa TRPV1-/- tratada con bleomicina, podría ser debida a una alteración en la respuesta inflamatoria secundaria a la ausencia del receptor endocannabinoide TRPV1.

El Sistema Endocannabinoide (SE) está compuesto por ligandos endógenos, sus enzimas reguladoras y sus receptores (CB1, CB2 y TRPV1) centrales y/o periféricos. Entre las funciones conocidas del SE destacan la de regular la homeostasis del organismo, poseer propiedades antitumorales, la regulación del metabolismo energético, la regulación de la respuesta al estrés, efectos neuromoduladores e inmunomoduladores, analgesia, o la termo-regulación. Entre los endocannabinoides identificados hasta la fecha se encuentran la anandamida (N-araquidonil-etanolamida, AEA), el 2-araquidonil-glicerol (2-AG), el éter del 2-araquidonil-glicerol (éter de noladín), el O-araquidonil-etanolamina (virodhamina), y la N-araquidonil-dopamina (NADA). Aunque los efectos a nivel neurológico de los cannabinoides han sido investigados intensamente, poco se conoce en la actualidad de las propiedades farmacológicas de estos agentes sobre el tracto respiratorio. La inhalación de Λ^9 tetrahidrocannabinol, el principal componente activo de la marihuana, induce broncodilatación y protege frente a la broncoconstricción inducida por agentes colinérgicos en la vía aérea de pacientes asmáticos[13], aunque se desconoce si estos efectos son mediados a nivel central. El receptor TRPV1 es activado de forma selectiva por la capsaicina, el principal componente pungente de la cayena, de la guindilla y de otros pimientos picantes, así como por una variedad de agentes tóxicos respiratorios, tanto exógenos como endógenos, incluida la anandamida[14], productos del metabolismo por lipooxigenasas del ácido araquidónico[15], H_2S[16], etanol[17], ácidos[18, 19] y contaminantes atmosféricos[20].

El papel del SE en la fibrosis pulmonar sigue siendo desconocido, puesto que podría tener tanto efectos beneficiosos como deletéreos sobre el sistema respiratorio. En otros órganos, se ha demostrado que los endocannabinoides podrían poseer propiedades profibróticas o antifibróticas, en función de su interacción con receptores CB1 o CB2, respectivamente. A nivel pulmonar, numerosos trabajos han evidenciado la presencia de cantidades significativas del receptor TRPV1 en varios componentes del aparato respiratorio[20-25]. A raíz de los resultados evidenciados en el presente trabajo, queda patente que la ausencia de receptor TRPV1 se tradujo en la aparición de una fibrosis pulmo-

nar en grado intenso respecto a la cepa salvaje. Esta aseveración quedó reflejada tanto a nivel anatomopatológico, como en la cuantificación del contenido en hidroxiprolina, la actividad mieloperoxidasa o la expresión de citoquinas proinflamatorias. De modo que especulamos que el receptor TRPV1 podría ser una potente diana terapéutica para prevenir la aparición de la fibrosis pulmonar, frenar la evolución de la misma una vez ya establecida.

Entre los factores limitantes de estos modelos destacan los siguientes:

a) Por un lado, la variabilidad en el modelo animal respecto a la clínica humana. El grado de fibrosis varía según la vía de administración empleada, la cepa de ratón utilizada o, incluso, dentro de una misma cepa y empleando la misma dosis y vía de administración, la respuesta fibrogénica resulta diferente.
b) El cese del agente inductor en algunos modelos animales puede dar lugar a la regresión de la fibrosis, concepto que nunca sucede en la clínica. La fibrosis pulmonar en el hombre tiene lugar tras meses-años de un remodelado pulmonar aberrante. En los modelos animales, por el contrario, esta secuencia se reproduce en un periodo de tiempo significativamente más corto, generalmente como respuesta a un episodio único de daño pulmonar. En el presente trabajo no se investigó en concreto la duración de la fibrosis pulmonar en el tiempo, puesto que todos los animales fueron sacrificados a las 2 semanas del tratamiento.
c) La vía de instilación intratraqueal, a pesar de que logra inducir fibrosis con una única dosis administrada, no se asemeja tanto a la clínica como la ruta intravenosa, la cual reproduce de manera más similar la forma en que se genera fibrosis pulmonar como efecto adverso de la administración de bleomicina como agente quimioterápico.
d) La respuesta fibrótica a la administración de bleomicina es cepa-dependiente. Así, mientras que la cepa salvaje C57Bl/6 es más susceptible al daño, los ratones Balb/c son resistentes, seguramente por el mayor contenido en bleomicina hidrolasa de los últimos. Aún así, en nuestro trabajo la cepa Balb/c se empleó como grupo control, siendo los ratones deficientes en TRPV1 los que desarrollaron una fibrosis más intensa.

En conclusión, el presente trabajo aporta por primera vez evidencia de que la alteración del sistema endocannabinoide mediante la ausencia de expresión del receptor TRPV1 conduce a la aparición de una fibrosis pulmonar severa en el modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Nuestra hipótesis es que el receptor TRPV1 podría tener un papel protector en la fibrosis pulmonar mediante la modulación de la síntesis de citoquinas proinflamatorias, y podría ser una potente diana terapéutica en esta enfermedad.

Agradecimientos: los autores quieren reconocer el excelente trabajo realizado por Lourdes Santaella Jiménez en su inestimable ayuda técnica y apoyo material en este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

1. American Thoracic S, European Respiratory S. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165: 277-304.
2. Collard HR, Moore BB, Flaherty KR et al. Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2007; 176: 636-643.
3. Kotloff RM, Thabut G. Lung transplantation. Am J Respir Crit Care Med 2011; 184: 159-171.
4. Moeller A, Ask K, Warburton D et al. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? Int J Biochem Cell Biol 2008; 40: 362-382.
5. Fleischman RW, Baker JR, Thompson GR et al. Bleomycin-induced interstitial pneumonia in dogs. Thorax 1971; 26: 675-682.
6. Snider GL, Celli BR, Goldstein RH et al. Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal bleomycin. Lung volumes, volume-pressure relations, carbon monoxide uptake, and arterial blood gas studied. Am Rev Respir Dis 1978; 117: 289-297.
7. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. J Clin Pathol 1988; 41: 467-470.
8. Muggia FM, Louie AC, Sikic BI. Pulmonary toxicity of antitumor agents. Cancer Treat Rev 1983; 10: 221-243.
9. Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med 2001; 345: 517-525.
10. Haston CK, Amos CI, King TM et al. Inheritance of susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the mouse. Cancer Res 1996; 56: 2596-2601.
11. Oku H, Shimizu T, Kawabata T et al. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. Eur J Pharmacol 2008; 590: 400-408.
12. Ziesche R, Hofbauer E, Wittmann K et al. A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med 1999; 341: 1264-1269.

13. Williams SJ, Hartley JP, Graham JD. Bronchodilator effect of delta1-tetrahydrocannabinol administered by aerosol of asthmatic patients. Thorax 1976; 31: 720-723.
14. Van Der Stelt M, Di Marzo V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. Eur J Biochem 2004; 271: 1827-1834.
15. Hwang SW, Cho H, Kwak J et al. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 6155-6160.
16. Trevisani M, Patacchini R, Nicoletti P et al. Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. Br J Pharmacol 2005; 145: 1123-1131.
17. Trevisani M, Gazzieri D, Benvenuti F et al. Ethanol causes inflammation in the airways by a neurogenic and TRPV1-dependent mechanism. J Pharmacol Exp Ther 2004; 309: 1167-1173.
18. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. Neuron 1998; 21: 531-543.
19. Ricciardolo FL, Gaston B, Hunt J. Acid stress in the pathology of asthma. J Allergy Clin Immunol 2004; 113: 610-619.
20. Veronesi B, Oortgiesen M, Carter JD et al. Particulate matter initiates inflammatory cytokine release by activation of capsaicin and acid receptors in a human bronchial epithelial cell line. Toxicol Appl Pharmacol 1999; 154: 106-115.
21. Seki N, Shirasaki H, Kikuchi M et al. Expression and localization of TRPV1 in human nasal mucosa. Rhinology 2006; 44: 128-134-
22. Mitchell JE, Campbell AP, New NE et al. Expression and characterization of the intracellular vanilloid receptor (TRPV1) in bronchi from patients with chronic cough. Exp Lung Res 2005; 31: 295-306.
23. Watanabe N, Horie S, Michael GJ et al. Immunohistochemical localization of vanilloid receptor subtype 1 (TRPV1) in the guinea pig respiratory system. Pulm Pharmacol Ther 2005; 18: 187-197.
24. Reilly CA, Taylor JL, Lanza DL et al. Capsaicinoids cause inflammation and epithelial cell death through activation of vanilloid receptors. Toxicol Sci 2003; 73: 170-181.
25. Agopyan N, Head J, Yu S et al. TRPV1 receptors mediate particulate matter-induced apoptosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004; 286: L563-572.