

ESTUDIO EN FIBROBLASTOS HUMANOS DEL SISTEMA ANGIOTENSINA EN LA FISIOPATOLOGIA DE LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPATICA

J. Rodríguez Portal^{1,4}, E. Arellano Orden³, M Barrera Talavera², F.J. Saenz Coronilla³,
A. Díaz Baquero¹, E. Rodríguez Becerra¹.

¹Servicio de Neumología. UMQER. H.U. Virgen del Rocío. Sevilla.

²Servicio de Cirugía Torácica. UMQER. H.U. Virgen del Rocío. Sevilla.

³IBIS. Instituto de Biomedicina. Sevilla.

⁴CIBERES.

Proyecto financiado con Beca Fundación Neumosur 13/2009

Conflicto de intereses: no hay conflictos contrapuestos ni conflictos de intereses que declarar.

Resumen: En el tejido pulmonar de modelos murinos, la angiotensina II induce la proliferación de fibroblastos, su diferenciación a miofibroblastos y la producción de procolágeno tras su unión al receptor I de la angiotensina. Hemos estudiado el comportamiento de fibroblastos pulmonares humanos procedentes de una línea celular comercial tras la estimulación con TGF- β 1. Hemos observado que estos fibroblastos, cuando son estimulados, aumentan la expresión de bFGF, colágeno y α -SMA. Tras el bloqueo del receptor de Angiotensina II con Losartan a una concentración de 10 μ M y la estimulación con TGF- β 1, se produce una disminución, tanto de los niveles de bFGF como de la concentración de colágeno, sin que llegue a alcanzar la significación estadística con respecto a las células no tratadas. En cuanto a la expresión de α -SMA como marcador de transformación a miofibroblastos, no había diferencias entre las células tratadas con TGF- β 1 y TGF- β 1 más losartán.

Palabras clave: Fibrosis pulmonar idiopática, miofibroblastos, Angiotensina II, colágeno.

THE STUDY OF ANGIOTENSIN SYSTEM HUMAN FIBROBLASTS IN THE PHYSIOPATHOLOGY OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS

Abstract: In murine model lung tissue, angiotensin II induces the proliferation of fibroblasts, their distinction from myofibroblasts and procollagen production after its binding with the type 1 receptor. We have studied the behavior of human lung fibroblasts from a commercial cell line after stimulation with TGF- β 1. We observed that those fibroblasts, when stimulated, increased bFGF, collagen and α -SMA expression. After blocking the angiotensin II receptor with losartan at a concentration of 10 μ M and stimulation with TGF- β 1, there was a decrease in both bFGF levels and collagen concentration, without reaching statistical significance with regard to untreated cells. With regard to α -SMA expression as an indicator of transformation to myofibroblasts, there were no differences between cells treated with TGF- β 1 and TGF- β 1 with losartan.

Key words: idiopathic pulmonary fibrosis, myofibroblasts, angiotensin II, collagen

Recibido: 30.01.2017. Aceptado: 01.03.2018

Autor para correspondencia: Dr. José Antonio Rodríguez Portal.
jarportal@ecua.es

INTRODUCCIÓN

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID), progresiva y con una supervivencia media sin tratamiento de de 3 - 4 años desde el diagnóstico¹. Presenta un patrón histológico de neumonía intersticial usual (NIU), siendo la entidad más frecuente y la de peor pronóstico entre las EPID. La fibrosis pulmonar resulta de la alteración en la reepitelización tras una agresión a las células alveolares. Se produce un aumento en la apoptosis epitelial. Las células epiteliales alteradas o apoptóticas secretan factores de crecimiento y citoquinas que favorecen la proliferación de fibroblastos y el depósito de matriz extracelular. Los más destacados son el factor transformador $\beta 1$ del crecimiento de fibroblastos (TGF- β), la Angiotensina II, el factor de crecimiento plaquetario (PDGF), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la endotelina-1 (ET-1)². En el tejido pulmonar de modelos murinos, la angiotensina II induce la proliferación de fibroblastos, su diferenciación a miofibroblastos y la producción de procolágeno tras su unión al receptor I de la angiotensina (ATI)³.

En este trabajo nos planteamos estudiar el proceso de fibrogénesis en una línea celular humana de fibroblastos sanos, así como el papel de la ANGII como agente fibrinogénico. Analizamos el comportamiento de los fibroblastos tras la administración de TGF- β y al bloquear el receptor I de la ANG mediante el Losartan.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para los experimentos hemos utilizado una línea celular de fibroblastos pulmonares sanos (MRC-5) adquirida de la ECACC (*European Collection of Cell Cultures, Inglaterra*). Las células se han cultivado en medio MEM (*Minimun Esencial Medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 1% penicilina-estreptomocina y 2mM de L-glutamina (Gibco, Grand Island, NY, EEUU). Las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂.

Para los experimentos se cultivaron 500.000 células por pocillo y se estimularon con TGF- $\beta 1$ y/o Losartan durante 24, 48 y 72 horas. Se emplearon células sin tratar como controles. Las dosis empleadas fueron 10 ng/ml de TGF- $\beta 1$ y 10 μ M de Losartán; las dosis se eligieron previamente mediante un estudio de dosis-respuesta. Los experimentos se repitieron 6 veces.

En cada uno de los puntos se examinaron los cambios morfológicos en un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 25, Carl

Zeiss Co. Oberkochen, Alemania). Además, se midió la viabilidad mediante Trypan-blue (Sigma, GmbH, Alemania) y se recogieron tanto las células como el sobrenadante. Del pellet celular se extrajo el ARN mediante un kit comercial, según las recomendaciones del fabricante (Roche Mannheim, Alemania), posteriormente hicimos la retrotranscripción a ADNc usando el kit iScript™ cDNA synthesis (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). Analizamos la expresión génica de factor básico de fibroblastos (bFGF), colágeno y alfa-actina de músculo liso (α -SMA) mediante PCR a tiempo real, usando Sybr Green (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU). Empleamos HPRT como control interno para la normalización del gen en estudio.

En el sobrenadante medimos los niveles de proteínas de bFGF mediante ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN).

El análisis estadístico se realizó con el paquete *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS inc, Chicago, IL, EEUU) versión 15.0. Para la descripción de la muestra se emplearon las frecuencias absolutas y relativas en cada categoría de las variables cualitativas, mientras que las cuantitativas se describieron empleando la media y la desviación estándar. Para comparar variables cuantitativas se utilizó la t de Student para datos independientes. Las variables cualitativas se analizaron mediante el test de la chi-cuadrado, empleando el test exacto de Fisher. El nivel de significación estadística se fijó en 0,05.

RESULTADOS

En cada uno de los puntos se examinaron los cambios morfológicos de las células tratadas con respecto a las no tratadas (figura 1).

Tras la estimulación de los fibroblastos con TGF- $\beta 1$, observamos un aumento en la expresión génica de factor básico de fibroblastos (bFGF) ($1,3 \pm 0,05$ versus 1 ± 0 ; $p = 0,013$) comparados con la células sin tratar (figura 2). Además, encontramos que las células tratadas también aumentaban la expresión de colágeno con respecto al control, aunque estas diferencias no fueron significativas ($1,30 \pm 1,43$ versus 1 ± 0 ; $p > 0,05$) (figura 3).

Se midió el α -SMA como marcador de transformación de fibroblastos a miofibroblastos, observándose un incremento significativo de la expresión de este marcador en células tratadas con TGF- $\beta 1$ con respecto al control ($2,46 \pm 2,18$ versus 1 ± 0 ; $p < 0,01$) (figura 4).

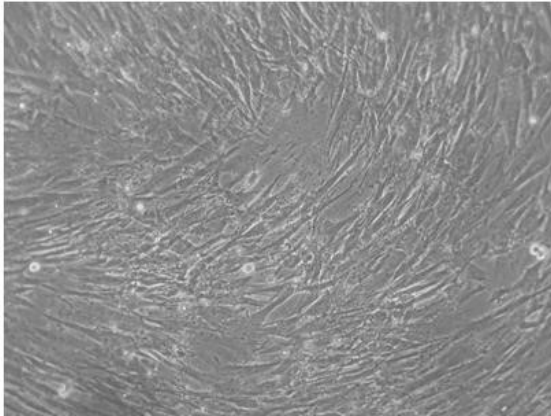
Tras el bloqueo del receptor de Angiotensina II con Losartan a una concentración de 10 ng/ml y la estimulación con TGF- $\beta 1$, se produce una disminución tanto de la expresión de bFGF

($0,77 \pm 0,58$ versus 1 ± 0 ; $p > 0,05$) (figura 2) y de colágeno ($0,72 \pm 0,46$ versus 1 ± 0 ; $p > 0,05$) (figura 3) con respecto a las células sin tratar, sin que llegue a alcanzar la significación estadística con respecto

al grupo control no estimulado. No observamos diferencias en cuanto a la expresión de α -SMA en cuanto las células tratadas con TGF- β 1 versus a las tratadas con TGF- β 1 y Losartán (figura 4).

FIGURAS

A



B

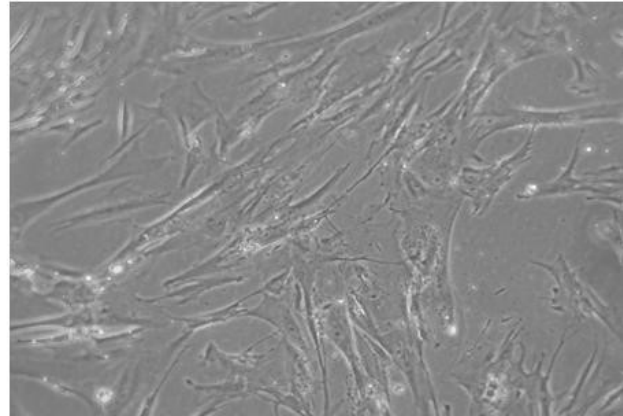


Figura 1. Cultivo de fibroblastos pulmonares humanos procedentes de una línea células (MRC5). Panel A: Control (células sin estimular). Panel B: fibroblastos estimulados con TGF- β 1.

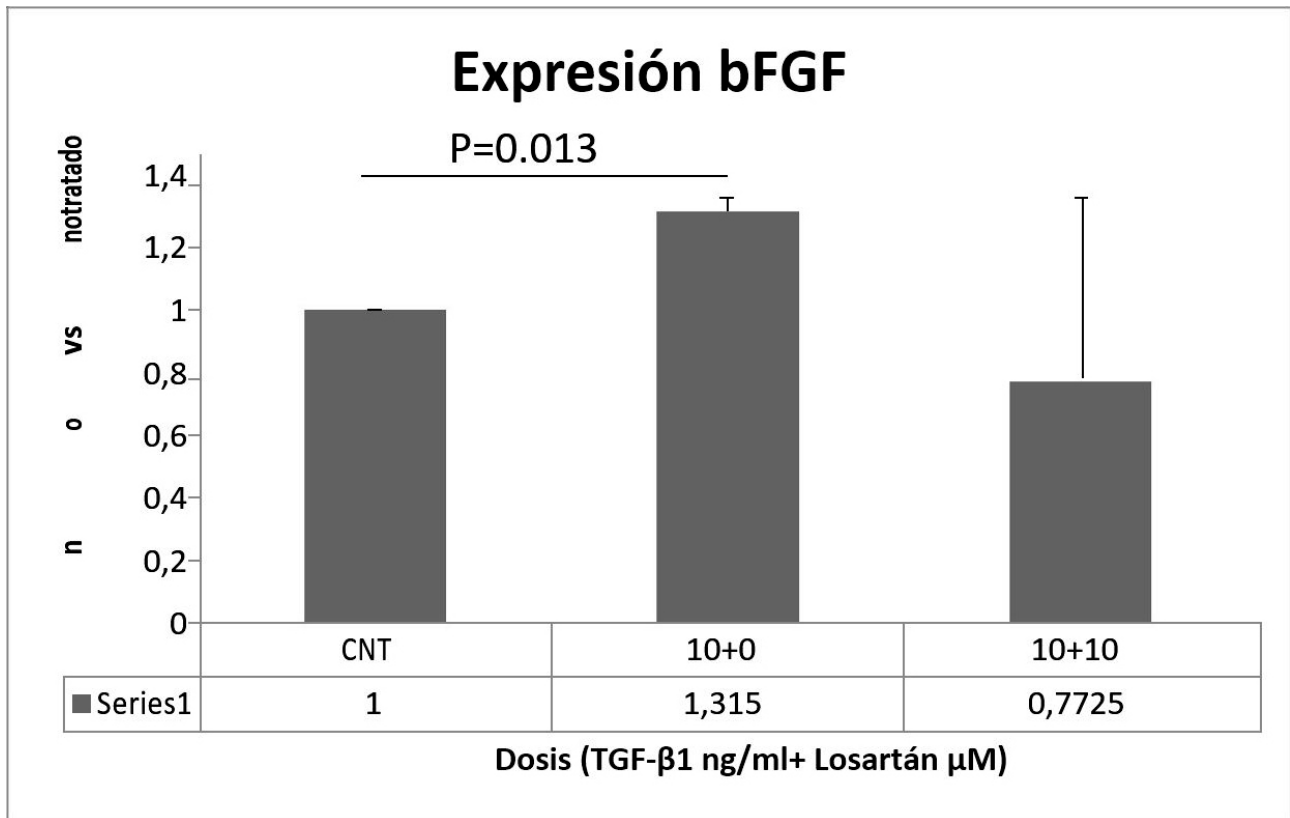


Figura 2. Expresión de bFGF en células no estimuladas y células estimuladas con 10 ng/ml de TGF- β 1 y 10ng/ml de TGF+ 10 μ M de Losartán.

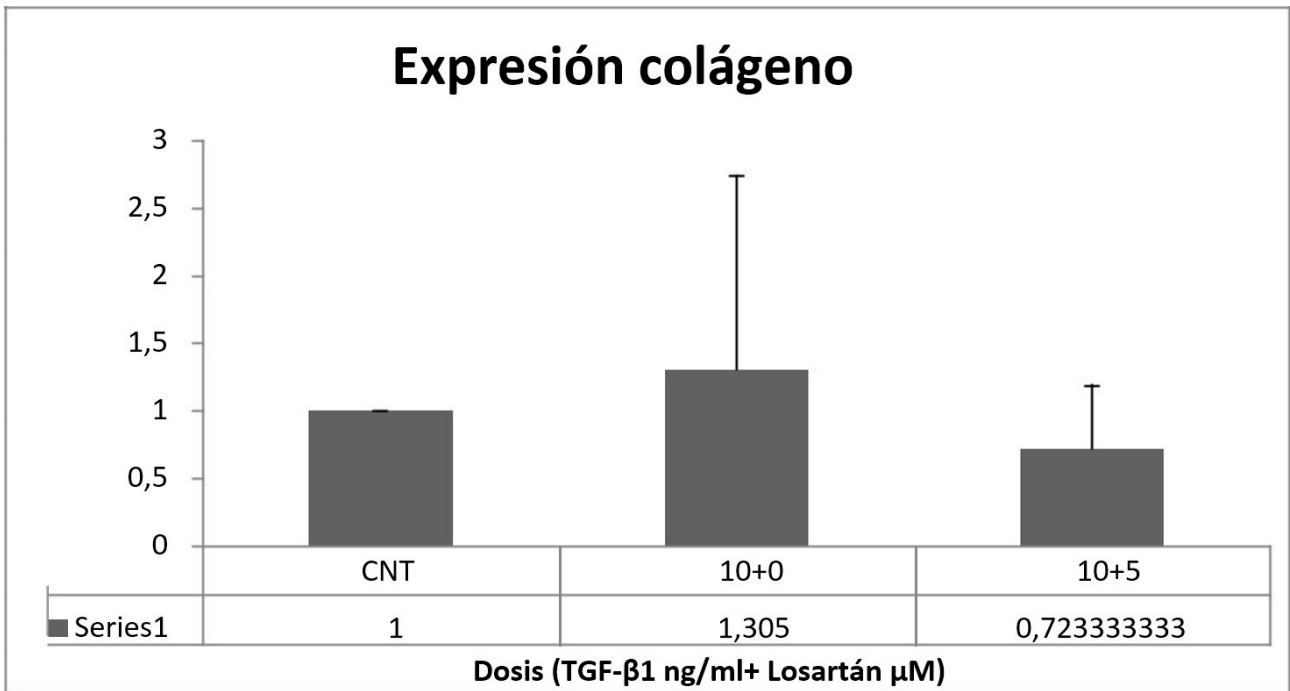


Figura 3. Expresión de colágeno en células no estimuladas y células estimuladas con 10 ng/ml de TGF-β1 y 10ng/ml de TGF+ 5μM de Losartán.

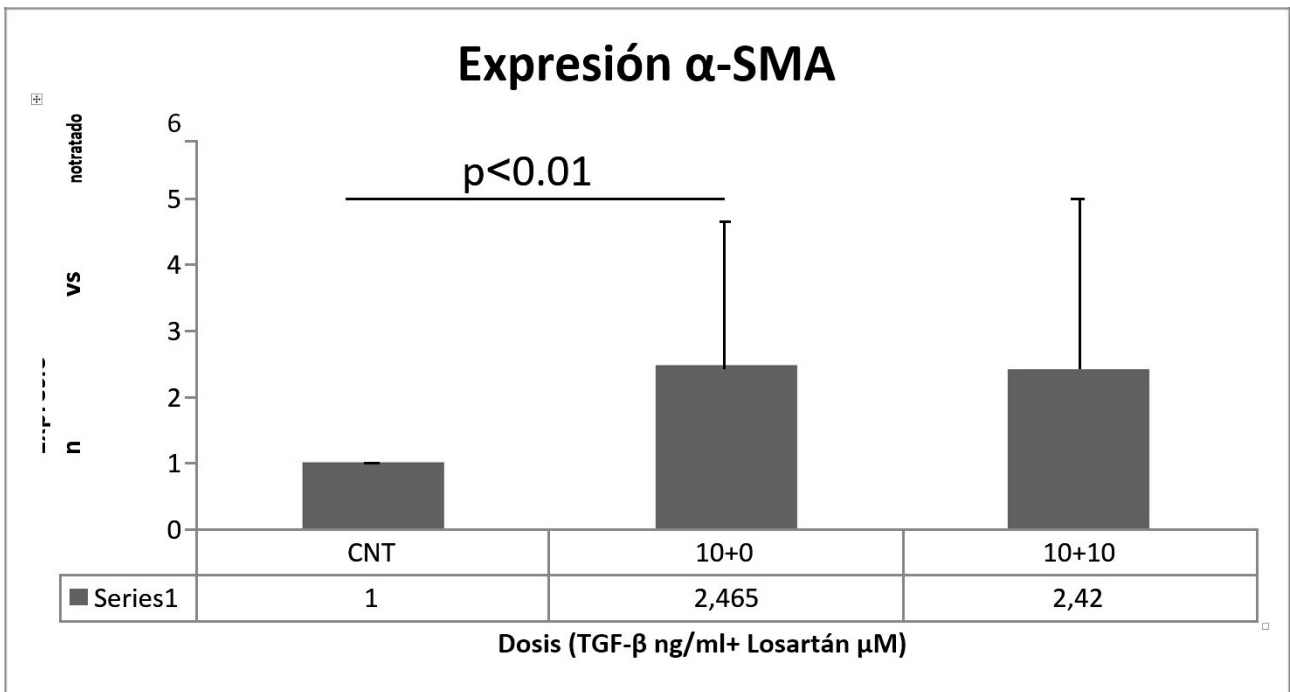


Figura 4. Expresión de α-SMA en células no estimuladas y células estimuladas con 10 ng/ml de TGF-β1 y 10ng/ml de TGF+ 10μM de Losartán.

DISCUSIÓN

Hemos podido comprobar como en cultivos de fibroblastos pulmonares de una línea celular, se producía un aumento en la proliferación y la activación de los fibroblastos tras su estimulación con el TGF- β 1, lo que se traducía en un aumento de la expresión de bFGF. También hemos comprobado como esta citokina interviene en la transformación del fibroblasto a miofibroblasto, siendo ésta la célula primordial en la producción de colágeno y la progresión de la enfermedad⁴. Se ha postulado que el número de focos de miofibroblastos en las muestras de tejido pulmonar son uno de los mejores determinantes del pronóstico de la FPI, determinando la mayor o menor progresión de la fibrosis⁵. A medida que el fibroblasto se transforma, aumenta la producción de α -SMA, proteína marcadora de presencia de miofibroblastos. Hemos comprobado como este proceso es estimulado por la administración de TGF- β 1 y como su concentración es significativamente superior a la encontrada en el grupo control no estimulado con esta citokina.

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID), progresiva y con una supervivencia media de 3 - 4 años desde el diagnóstico sin tratamiento. Presenta un patrón histológico de neumonía intersticial usual (NIU), siendo la entidad más frecuente y la de peor pronóstico entre las EPID⁶. La fibrosis pulmonar resulta de la alteración en la reepitelización tras la lesión de las células alveolares. Se produce un aumento en la apoptosis epitelial y en la síntesis de mediadores pro-fibróticos, con la consiguiente proliferación de fibroblastos, transformación a miofibroblastos y el depósito incontrolado de matriz extracelular. Este concepto de enfermedad epitelio-mesenquimal sustituye al propuesto inicialmente de alteración inflamatoria alveolar como origen de todo el proceso⁷. En la FPI, las células epiteliales alteradas o apoptóticas secretan factores de crecimiento y citoquinas que favorecen la proliferación de fibroblastos y el depósito de matriz extracelular. El TGF- β estimula la diferenciación y síntesis de colágeno, fibronectinas y proteoglicanos, así como la formación de miofibroblastos. Los mecanismos por los que se produce este proceso no están totalmente definidos⁸.

En la FPI se produce un aumento en la matriz extracelular, con una producción anómala de colágeno lo que favorece el proceso de fibrosis en el intersticio pulmonar⁹. En cultivos de fibroblastos hemos podido comprobar como se produce un aumento en la producción de colágeno tras la estimulación con TGF- β 1. Aunque la concentración

era superior a la encontrada en el grupo control, no alcanza la significación estadística.

Se ha podido comprobar que la ANGII estimula la proliferación de fibroblastos y favorece la formación de matriz extracelular mediante el depósito de colágeno¹⁰. El potencial efecto profibrogénico de la Angiotensina II se cree que es debido a una activación de genes productores de colágeno en los fibroblastos pulmonares tras su transformación en miofibroblastos e induciendo la apoptosis de las células alveolares pulmonares¹¹. El bloqueo de esta vía mediante Losartan podría aportar algún beneficio terapéutico¹². En este estudio *in vitro* hemos podido comprobar cómo tanto la proliferación de fibroblastos como la producción de colágeno era menor en el grupo en el que se bloqueaba el receptor de ANGII con Losartan, aunque sin alcanzar la significación estadística. No había diferencias en la concentración de α -SMA en ambos grupos. Es posible que la ANGII intervenga en el proceso inicial de la fibrogénesis y que para la transformación a miofibroblastos son necesarias otras vías diferentes a la de la ANGII¹³.

El estudio presentado tiene algunas limitaciones. En primer lugar, el número de experimentos realizados es limitado. Es posible que las diferencias encontradas en la producción de colágeno no alcancen la significación estadística por esta limitación. Quizás lo más importante es que hemos estudiado un tipo celular (fibroblastos) que participa en una parte del proceso fibrogénico, pero no hemos analizado la respuesta de las células alveolares a este estímulo. Este proceso será el objetivo de posteriores estudios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sgalla G, Biffi A, Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis, epidemiology and natural history. *Respirology*. 2016; 21 (3): 427-37.
2. Xu X, Dai H, Wang C. Epithelium-dependent profibrotic milieu in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: current status and future directions. *Clin Respir J*. 2016 Mar; 10 (2): 133-41.
3. Molina-Molina M, Serrano Mollar A, Bulbena O et al. Losartan attenuates bleomycin induced lung fibrosis by increasing prostaglandin E2 synthesis. *Thorax* 2006; 61: 604-610.
4. Oda K, Yatera K, Izumi H et al. Profibrotic role of WNT10A via TGF- β signaling in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2016 12; 17: 39.
5. Walsh SL, Wells AU, Sverzellati N et al. Relationship between fibroblastic foci profusion and high resolution CT morphology in fibrotic lung disease. *BMC Med*. 2015; 13: 241.

6. Xaubet A, Ancochea J, Bollo E et al. Normativa SEPAR sobre el diagnóstico y tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática. Arch Bronconeumol 2013; 49: 343-53.
7. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. Ann Intern Med. 2001; 134 (2): 136-151.
8. Oda K, Yatera K, Izumi H et al. Profibrotic role of WNT10A via TGF- β signaling in idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Res. 2016; 12; 17:39.
9. Craig VJ, Zhang L, Hagood JS et al. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2015; 53 (5): 585-600.
10. Uhal BD, Kim JK, Li X et al. Angiotensin-TGF-beta 1 crosstalk in human idiopathic pulmonary fibrosis: autocrine mechanisms in myofibroblasts and macrophages. Curr Pharm Des. 2007; 13 (12): 1247-56.
11. M.Okada, K.Suzuki, M. Matsumoto et al. Effects of angiotensin on the expression of fibrosis-associated cytokines, growth factors, and matrix proteins in human lung fibroblasts. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics (2009) 34; 289-299.
12. Couluris M, Kinder BW, Xu P et al. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with losartan: a pilot Project. Lung. 2012; 190 (5): 523-7.
13. Ryu JH, Moua T, Daniels CE et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: evolving concepts. Mayo Clin Proc. 2014; 89 (8): 1130-42.