

# Modelos experimentales para el estudio de la fibrosis pulmonar: utilidad práctica actual y futura

María Molina-Molina, Javier Pereda y Antoni Xaubet

Instituto de Investigaciones Agustí Pi i Sunyer (IDIBAPS). Unidad de Endoscopia Respiratoria. CIBER. Enfermedades Respiratorias. Servicio de Neumología. Instituto Clínico del Tórax. Hospital Clínico. Barcelona. España.

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas son un grupo de enfermedades respiratorias con múltiples incógnitas por resolver. En los últimos años se ha asistido a un gran avance en la clasificación para el diagnóstico correcto de cada una de ellas, con lo que se han sentado las bases indispensables para el estudio del proceso fisiopatológico en cada entidad. Sin embargo, resultan desconocidos tanto la causa desencadenante como los mecanismos exactos que llevan a la alteración irreversible del parénquima. Dentro de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas, la más frecuente y de peor pronóstico es la fibrosis pulmonar idiopática. Los tratamientos actuales son empíricos, con respuesta aleatoria, e incapaces de mejorar la supervivencia. Por este motivo la mayoría de los estudios básicos se han centrado en buscar respuestas sobre su fisiopatología y un abordaje terapéutico efectivo. El objetivo de esta revisión es dar a conocer los estudios experimentales que han empezado a abrir caminos hacia la comprensión del complejo proceso fibrótico.

**Palabras clave:** *Fibrosis pulmonar. Estudio experimental. Enfermedad pulmonar intersticial.*

## Introducción

En los últimos años el avance en la clasificación de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas ha permitido diagnosticar con mayor precisión cada una de las entidades y sentar una buena base para estudiar su fisiopatología. Dentro de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas, la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la que tiene mayor incidencia y peor pronóstico<sup>1,2</sup>. Además, los tratamientos actuales no mejoran la supervivencia, se desconoce la causa desencadenante y quedan muchas incógnitas en cuanto los mecanismos exactos que están implicados en la evolución<sup>1,2</sup>. Por este motivo la mayoría de los estudios básicos se han centrado en investigar su fisiopatología y cómo inhibir el proceso.

Correspondencia: Dra. M. Molina-Molina.  
Unidad de Endoscopia Respiratoria. Servicio de Neumología. Hospital Clínico. Villarroel, 170. Barcelona. España.  
Correo electrónico: mariamolinalina@hotmail.com

Recibido: 12-9-2006; aceptado para su publicación: 19-9-2006.

## Experimental Models for the Study of Pulmonary Fibrosis: Current Usefulness and Future Promise

Diffuse interstitial lung diseases form a group of respiratory diseases about which many questions remain to be answered. In recent years there have been major advances in the correct diagnostic classification of each disease, and therefore, the essential foundations have been laid for investigation of their pathophysiology. However, both the triggers and the precise mechanisms that lead to irreversible changes in the lung parenchyma remain to be identified. Idiopathic pulmonary fibrosis is the most common diffuse interstitial lung disease and has the worst prognosis. Current treatments are empirical and the response is random; furthermore, they do not improve survival. Consequently, most basic research has focused on the pathophysiology of the disease and on identifying an effective therapeutic approach. The aim of this review is to describe the experimental studies that have begun to open the way towards an understanding of the complex process of fibrosis.

**Key words:** *Pulmonary fibrosis. Experimental studies. Interstitial lung disease.*

## Patología básica de la respuesta pulmonar fibrótica

La hipótesis fisiopatológica actualmente aceptada en la fibrosis pulmonar es que, en individuos genéticamente predispuestos, factores externos lesionan el epitelio alveolar y se inicia un proceso reparativo alterado, que activa el depósito incontrolado de la matriz extracelular y desestructura la arquitectura pulmonar<sup>3</sup>. Esta hipótesis, basada en una amplia serie de estudios realizados durante las 2 últimas décadas, marca los campos de investigación que han de abordarse en el presente y el futuro:

1. Alteraciones genéticas que podrían predisponer a que el epitelio e intersticio pulmonares reaccionen de forma anómala ante una lesión.
2. Factores externos que activan la respuesta patológica.
3. Alteraciones celulares y moleculares, activadas tras la lesión del epitelio alveolar, que conducen a una reparación anómala del tejido.

4. Relaciones epitelio-mesenquimales alteradas que perpetúan el proceso fibrótico.

5. Factores que favorecen la progresión de la fibrosis o aceleran su curso.

El contexto fundamental que permite estudiar los mecanismos fisiopatológicos de la fibrosis pulmonar es el avance en la tecnología para el estudio molecular y la manipulación transgénica de animales para la experimentación de enfermedades complejas. Las incógnitas que promueven estos estudios tienen en común el objetivo de buscar un tratamiento efectivo de la enfermedad, entendiendo que para curar o prevenir es necesario conocer los mecanismos que la originan.

### Modelos experimentales in vivo

La base para la utilización de modelos animales en la investigación de los mecanismos fibrogénicos son las similitudes estructurales, bioquímicas y moleculares entre la reacción fibrótica en humanos y animales. La experimentación en animales es el único procedimiento que permite valorar en tiempo real el efecto de las interacciones genéticas, bioquímicas y medioambientales que provocan fibrosis pulmonar. Estos modelos se utilizan para investigar un amplio abanico de eventos: *a)* el control de la muerte celular fisiológica (apoptosis) tanto del epitelio alveolar como de fibroblastos y miofibroblastos; *b)* síntesis, mecanismo de acción y regulación de mediadores fibrogénicos o antifibrogénicos. Dependiendo del mecanismo que se desea estudiar, se puede utilizar tanto la manipulación génica como la inducción externa del proceso fibrótico, y *c)* ensayo de nuevos fármacos antifibróticos o intervenciones que frenen la fibrogenia. No obstante, no hay ningún modelo animal que reproduzca exactamente todos los aspectos de la fibrosis pulmonar en humanos. Por este motivo la utilidad y elección del modelo animal a utilizar estarán condicionadas por las características del evento fibrótico determinado que se quiere estudiar, las hipótesis y los objetivos de la investigación, así como las consideraciones logísticas experimentales de las que se dispone.

Los animales de experimentación más utilizados son el ratón y la rata, por su fácil manipulación y el menor coste, aunque se ha estudiado un amplio grupo de animales. Los métodos convencionales para inducir reacciones pulmonares fibróticas incluyen la instilación directa de agentes fibrogénicos y la exposición a irradiación torácica<sup>4-6</sup> (tabla I). Entre los agentes fibrogénicos, el más utilizado es la bleomicina, un potente agente antineoplásico que actúa mediante un efecto oxidante, escindiendo el ADN y aumentando los mediadores fibrogénicos. Se puede administrar de forma endotraqueal, intraperitoneal o intravenosa, y raramente por vía intramuscular o subcutánea. Las primeras observaciones del efecto profibrótico de este agente antineoplásico fueron en perros<sup>7</sup>. Posteriormente se estandarizó la instilación endotraqueal en dosis única en ratas y ratones, hasta determinar la dosis requerida para provocar cambios pulmonares fibróticos uniformes, muy similares a los observados en la FPI<sup>8,9</sup>. Las lesiones inducidas

por este agente incluyen inflamación parcheada y variable, lesión epitelial con hiperplasia reactiva y apoptosis, alteración de la membrana basal, fibrosis de distribución heterogénea (intraalveolar, subpleural o bronquiolocéntrica), así como focos de células mesenquimales en forma de huso de apariencia similar a los focos de miofibroblastos observados en la neumonía intersticial usual<sup>10</sup>. En los últimos años el modelo de bleomicina se ha utilizado para: *a)* estudiar los mecanismos de acción de factores de crecimiento (como el factor transformador del crecimiento beta, la angiotensina II y la endotelina-1) y de diversas citocinas, así como el efecto terapéutico de su inhibición<sup>11-17</sup>; *b)* valorar la modulación transgénica en la respuesta fibrótica e identificar posibles loci reguladores en la predisposición genética a la fibrosis pulmonar<sup>16,18</sup>, y *c)* estudiar la alteración celular epitelial, fibroblástica y de la matriz extracelular<sup>19-21</sup>. Aunque el modelo de bleomicina instilada es fácilmente reproducible, cabe recordar que es un modelo de lesión de rápida instauración y duración determinada. Para estudiar eventos iniciales, donde predomina la inflamación, se sacrifica a los animales a partir del tercer al séptimo días. Asimismo, si lo que se pretende es estudiar la fase fibrótica de la lesión, lo ideal es que los animales se evalúen las semanas 2 y 3, dado que el daño provocado reverte espontáneamente a partir de la tercera semana<sup>9</sup>. Los modelos de administración continua de bleomicina que se han ensayado hasta la actualidad no acaban de reproducir con exactitud la cronicidad de la fibrosis pulmonar<sup>22</sup>.

La inducción de fibrosis con amiodarona es otro modelo bien estandarizado en rata, ratón y hámster. Se utiliza para el estudio de su toxicidad y, administrada por vía endotraqueal y oral, se ha observado que el efecto profibrótico deriva tanto de este compuesto como de su metabolito, la desetilamiodarona<sup>23-25</sup>. La inhalación de partículas como el asbesto o sílice induce lesiones pulmonares similares en humanos y roedores: provoca fibrosis de forma progresiva, acompañada de reacción inflamatoria granulomatosa. Estos modelos son especialmente útiles para el estudio de macrófagos y otros fagocitos<sup>26,27</sup>. Otros elementos pueden inducir fibrosis en animales, como la inhalación de cobalto y cloruro de cadmio, paraquat o

TABLA I  
Modelos animales de fibrosis pulmonar

Agente inductor	Especie animal utilizada
Bleomicina	Ratón, rata, hámster, conejo, perro, mono, faisán
Amiodarona	Ratón, rata, hámster
Partículas inorgánicas (sílice, asbesto)	Ratón, rata, hámster, conejo, cabra
Irradiación	Ratón, rata, hámster, conejo, perro, mono, cabra
Isocianato de fluoresceína	Ratón
Pentóxido de vanadio	Ratón, rata
Antígenos apténicos (trinitrobenceno)	Ratón, hámster
Cobalto inhalado	Rata

diquat vía sistémica, isocianatos y nitrosoureas, o pentóxido de vanadio, aunque su uso para el estudio de este proceso no ha sido estandarizado. La irradiación como inductor de fibrosis es también un sistema muy utilizado. Las dosis empleadas son variables y los efectos fibróticos pueden persistir varios meses tras la radiación<sup>28-30</sup>. El inconveniente principal es el aparataje, que comporta la necesidad de grandes espacios, así como una rigurosa utilización y mantenimiento del sistema.

Los avances en la manipulación genética de animales de experimentación, en particular de los ratones, han permitido estudiar patrones de susceptibilidad a la fibrosis pulmonar, tales como alteraciones en la expresión de citocinas y factores de crecimiento, de componentes de la matriz extracelular o de otros factores específicos que pueden estar implicados en este proceso (enzimas, proteínas y otros componentes intersticiales y del epitelio alveolar). Los animales transgénicos portan un fragmento de ADN exógeno en su genoma, lo cual permite el estudio del patrón de expresión de ese gen y las consecuencias biológicas de la sobreexpresión de la proteína exógena codificada por el transgén en tejidos específicos. La mutagenia de un gen ha permitido generar cepas de ratones que carecen de proteínas determinadas, con lo que se desarrollan modelos específicos de pérdida de función; es lo que se conoce como animales *knock-out*. Cuando el gen normal se sustituye por otro alterado, con mutaciones específicas, recibe el nombre de *knock-in*. Actualmente es posible utilizar ratones con deleciones completas de un gen determinado para comprobar el efecto de la ausencia completa de su producto<sup>26,31-35</sup>, estudiar los cambios en la expresión génica que originan diferentes inductores<sup>36,37</sup>, o bien provocar diferentes mutaciones genéticas para evaluar determinadas vías terapéuticas<sup>38</sup>. Para decidir qué genes estudiar, es útil investigar previamente cómo influye la inducción del proceso fibrótico en el cambio de la expresión génica. Este análisis se ha visto facilitado por la aparición de la técnica de micromatrices (*microarrays*)<sup>39</sup>, que consiste en el análisis de la expresión simultánea de miles de genes mediante la tecnología de organización de micromatrices de ADN. Con este método es posible determinar la alteración del patrón transcripcional de múltiples genes en un mismo tejido tras la inducción de fibrosis o manipulación genética experimental previa<sup>40-43</sup>. En los últimos años se han cruzado ratones transgénicos para obtener modificaciones génicas combinadas que permiten evaluar varios factores implicados en el proceso de fibrogenia<sup>44</sup>. Este método condiciona un mayor ajuste a la realidad, dado que en los últimos años se ha postulado que la FPI es una enfermedad poligénica; es decir, el individuo afectado presentaría más de una alteración genética<sup>45</sup>. El inconveniente básico de trabajar con ratones transgénicos es el elevado coste y la dificultad para obtener algunos modelos, dado que son pocos los laboratorios que trabajan en este campo. Probablemente la mayor accesibilidad al uso de estos animales sea una de las mejoras que se produzcan en los próximos años.

Sin embargo, se sabe que la historia natural de la fibrosis pulmonar en humanos difiere en varios aspectos de la inducida en animales. Por una parte, no hay nin-

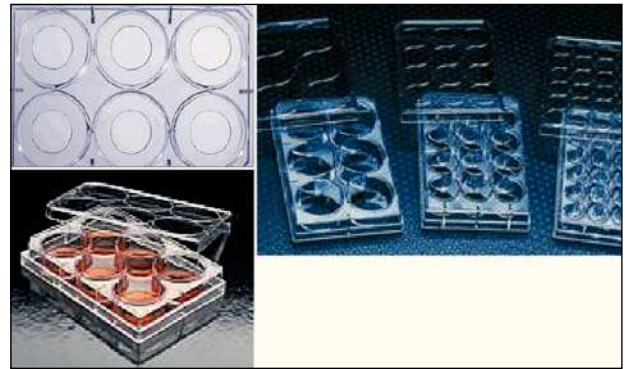


Fig. 1. Placas de cultivo. Las más utilizadas son de 6; 12; 48, y 96 pocillos.

gún modelo que consiga una reproducción precisa de la cronicidad o progresión de la enfermedad, probablemente por el desconocimiento de los factores que provocan en el pulmón humano que un evento reparativo patológico lleve a la perpetuación de la fibrosis<sup>46</sup>. Además, en la mayoría de los modelos animales los cambios producidos por una inducción inicial tienden a regresar, lo cual no ocurre en el proceso humano. Por estos motivos, para extrapolar a la clínica los resultados obtenidos en un modelo animal será primordial su correcta y estricta interpretación. La tendencia a experimentar con fenotipos que reproduzcan lo máximo posible el proceso en humanos es la base para mejorar los modelos animales en el estudio de la fibrosis pulmonar en un futuro próximo.

### Modelos experimentales in vitro

Los modelos experimentales in vitro comprenden una amplia serie de métodos cuyo objetivo es evaluar una respuesta celular o molecular determinada. Los estudios morfológicos aportan información relevante sobre el desarrollo y la progresión de la fibrosis. Sin embargo, estos modelos sólo permiten evaluar la expresión de una determinada molécula y comparar sus características respecto al tejido sano. Para evaluar si estos hallazgos tienen una implicación activa en el proceso fibrótico y determinar su papel, es indispensable trabajar con modelos que permitan la funcionalidad del tejido o la actividad de las células que intervienen. Suelen utilizarse explantes de tejido pulmonar o cultivos de células inflamatorias y mesenquimales, obtenidas de modelos animales y de pacientes con fibrosis pulmonar.

Los explantes pulmonares permiten investigar, en diferentes condiciones (basalmentes, después de añadir factores inductores o un fármaco determinado), la expresión de una molécula, su síntesis y su tipificación genética. Habitualmente estos estudios se llevan a cabo durante pocas horas o días, dado que el explante se degenera fácilmente<sup>47,48</sup>.

El cultivo de células a partir de tejido pulmonar permite el estudio de su proliferación, fenotipo y receptores expresados, así como de los productos que sintetiza. En las placas de cultivo (fig. 1) el fibroblasto es una célula que crece y se adhiere con facilidad. El método óp-

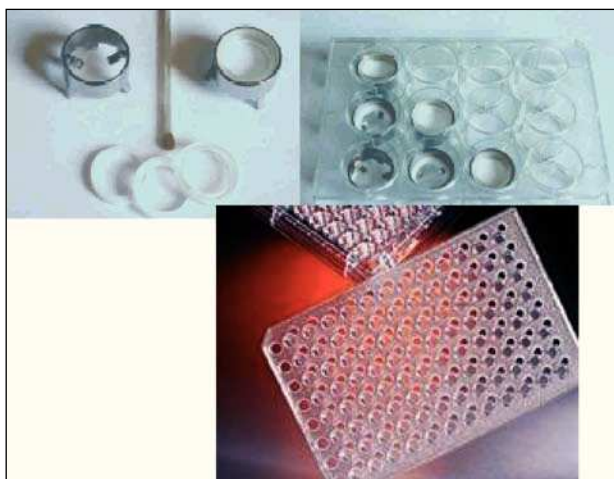


Fig. 2. Placas de cocultivos celulares. Son placas con una membrana que permite separar los diferentes tipos celulares o medios compartimentales.

timo para su obtención es aprovechando un trozo de la pieza de biopsia quirúrgica del paciente para el diagnóstico de la enfermedad intersticial. Los sujetos que pueden considerarse estrictamente controles son aquellos en los que la pieza histológica se cataloga de normal, cuyo patrón funcional respiratorio carece de alteraciones y que no presentan enfermedad inflamatoria o infecciosa concomitante. La utilización de cultivos de fibroblastos<sup>49,50</sup> ha permitido valorar las características de los fibroblastos-miofibroblastos en la FPI y otras enfermedades intersticiales, su resistencia a la apoptosis y la síntesis de moléculas profibróticas, así como los componentes de la matriz extracelular<sup>42,49-53</sup>. Otra célula elemental para investigar es la célula alveolar epitelial tipo II. Estas células son difíciles de obtener a partir del tejido humano, por lo que se utilizan líneas de células epiteliales normales derivadas de la manipulación biológica, como la línea A549<sup>16,54-57</sup>. También se pueden obtener células epiteliales patológicas de los modelos animales de fibrosis mediante el lavado broncoalveolar o digestión por colagenasa de la pieza pulmonar una vez sacrificado el animal<sup>55,58</sup>. Los macrófagos intervienen asimismo en el proceso fibrótico y su estudio se ve facilitado por su fácil obtención mediante el lavado broncoalveolar de pacientes con fibrosis pulmonar o de animales con fibrosis pulmonar inducida, aunque en ratones otra forma de obtenerlos es la vía peritoneal<sup>44</sup>. Los principales inconvenientes son que el estudio funcional de los macrófagos se limita a 24 h y que su cultivo requiere medidas cualitativas estrictas para optimizar la pureza celular, es decir, evitar el crecimiento de otras células como fibroblastos o eritrocitos<sup>59,60</sup>.

Otro método que permite una aproximación más exacta a los fenómenos que podrían darse en el tejido pulmonar de los pacientes con fibrosis pulmonar son los cocultivos celulares. Mediante placas especiales que permiten confrontar 2 tipos celulares en proliferación se puede estudiar el efecto que tienen uno sobre el otro o los mediadores que secretan e intervienen en la fibrogenia. La interacción entre los tipos celulares se hace

posible gracias a una fina membrana que separa los 2 compartimentos (fig. 2). Este método resulta ideal para evaluar la interacción entre las células epiteliales alveolares y los fibroblastos-miofibroblastos<sup>61,62</sup>, así como la relación macrófago-célula epitelial-fibroblasto<sup>63</sup>, contexto que más se aproxima a los fenómenos que se producen en el pulmón de los pacientes fibróticos. Este campo más complejo y novedoso está progresando dada la variedad de opciones que permite, por lo que podría mejorar el diseño de los experimentos en los próximos años.

### Avance en el conocimiento de la fibrosis pulmonar a través de los modelos experimentales. Implicaciones en la práctica clínica

En la última década, los modelos experimentales de fibrosis pulmonar han aportado información muy relevante sobre su fisiopatología y han servido para investigar posibles fármacos que frenen esta enfermedad. Gracias a ellos ha quedado cimentada la nueva hipótesis sobre la fibrogenia pulmonar, en la que la célula epitelial y su apoptosis acelerada tienen un papel principal junto con los fibroblastos-miofibroblastos<sup>3,52,54,58,64</sup> y la implicación de mediadores profibróticos<sup>46-48,50,65</sup>. Se ha comprobado que tras la lesión de la célula epitelial alveolar, inducida por factores exógenos, el proceso reparativo que se inicia es anómalo: mayor apoptosis del epitelio y permeabilidad de la membrana basal, e incremento, en el espacio alveolar e intersticio, de los mediadores profibróticos, que activan la proliferación incontrolada de fibroblastos, su cambio fenotípico a miofibroblastos y el ambiente propicio para el depósito excesivo de colágeno. En cuanto a la valoración del papel de la respuesta celular inflamatoria en la fibrosis pulmonar, aunque muchos han sido los intentos de aclarar su función, la variabilidad de los resultados obtenidos hasta el momento ha hecho imposible llegar a una conclusión definitiva. Las células inflamatorias, que sí participan en el resto de enfermedades pulmonares intersticiales, es probable que no tengan un papel primordial en la FPI, aunque se desconoce la función exacta de su incremento en el proceso fibrótico<sup>66,67</sup>. En este sentido, otro fenómeno aún sin esclarecer es el papel de la vascularización en la fibrogenia. Mientras que algunos estudios experimentales proponen que esta enfermedad se acompaña de una disminución de la vascularización, otros abogan por su aumento como parte del proceso de fibrogenia<sup>68,69</sup>. Una hipótesis es que en las zonas más afectadas por la paralización la vascularización disminuye, en tanto que en las zonas con más actividad inflamatoria existe un aumento de la permeabilidad vascular<sup>70-72</sup>. Otro aspecto que sigue siendo trascendental para la investigación es encontrar qué factor externo es inductor o iniciador del daño celular epitelial que activa todo el proceso. Desde la inhalación de algunas sustancias<sup>73</sup> hasta la relevancia de algunos virus<sup>60,74</sup> o la implicación del reflujo gastroesofágico<sup>75</sup>, han sido diversas las hipótesis postuladas, pero sin conclusiones evidentes. Asimismo, esta incógnita se acompaña del complejo componente endógeno humano: la predisposición genética. Se sabe que existe



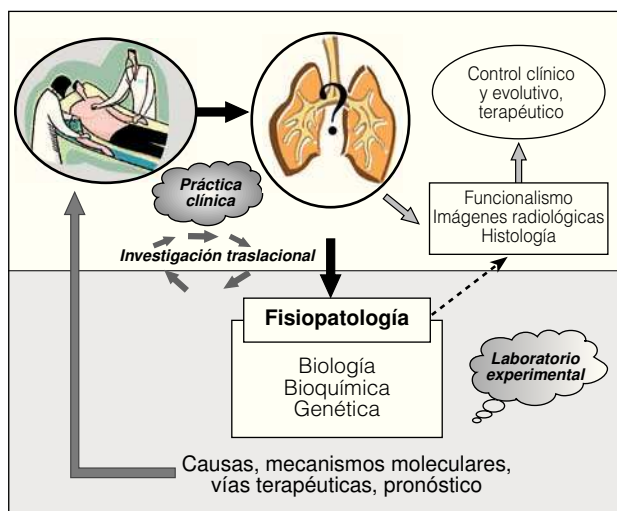


Fig. 3. Investigación traslacional: los estudios experimentales son una herramienta indispensable para la investigación básica de las enfermedades respiratorias.

un tipo de fibrosis pulmonar hereditaria<sup>76,77</sup>, además de cierta agregación familiar en pacientes afectados de diversas enfermedades intersticiales<sup>78,79</sup>. Los estudios genéticos realizados se centran en el análisis de mutaciones de citocinas, factores de crecimiento, componentes del complejo principal de histocompatibilidad e integrantes de la matriz extracelular y epitelio<sup>45,80-84</sup>.

Tras observar el escaso beneficio de la pauta de tratamiento clásica para la FPI (glucocorticoides más inmunodepresores), han sido múltiples los esfuerzos para encaminar las investigaciones hacia tratamientos antifibróticos efectivos<sup>85</sup>. En este sentido, varios modelos experimentales han servido para valorar inicialmente fármacos antifibróticos y han abierto expectativas para su aplicación en humanos. En la actualidad algunos de ellos son objeto de ensayos clínicos<sup>85</sup>, como el interferón  $\gamma 1b$ , la pirfenidona, la N-acetilcisteína y el bosentan. Por lo tanto, los modelos experimentales de fibrosis pulmonar no sólo aclaran puntos clave de la fisiopatología que han permitido avanzar en el conocimiento de su evolución, sino que también son una herramienta indispensable para evaluar la seguridad y acción de nuevos fármacos antifibróticos (fig. 3).

En conclusión, el estudio básico experimental de la fibrosis pulmonar, así como del resto de enfermedades respiratorias, nace de las mil preguntas planteadas en la práctica clínica y experimental, intenta desglosarlas en busca de respuestas específicas y, finalmente, aporta unos resultados que serán parte del conocimiento y, muy probablemente, el desencadenante de nuevas preguntas o hipótesis.

## BIBLIOGRAFÍA

1. American Thoracic Society/European Respiratory Society. International multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:227-304.

2. Xaubert A, Ancochea J, Blanquer R, Montero C, Morell F, Rodríguez-Becerra E, et al. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas. *Arch Bronconeumol.* 2003;39:580-600.
3. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med.* 2001;134:136-51.
4. Phan SH, Thrall RS, Ward PA. Bleomycin-induced pulmonary injury in rats, biochemical demonstration of increased rate of collagen synthesis. *Am Rev Respir Dis.* 1980;121:501-6.
5. Chua F, Gauldie J, Laurent GH. Pulmonary fibrosis: searching for model answers. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33:9-13.
6. 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.
7. Fleischman RW, Baker JR, Thompson GR, Schaeppi UH, Illievski VR, Cooney DA, et al. Bleomycin-induced interstitial pneumonia in dogs. *Thorax.* 1971;26:675-82.
8. Ebihara T, Venkatesan N, Tanaka R, Ludwig MS. Changes in extracellular matrix and tissue viscoelasticity in bleomycin-induced lung fibrosis. Temporal aspects. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:1569-76.
9. Gharaee-Kermani M, Ullenbruch M, Phan SH. Animal models of pulmonary fibrosis. *Methods Mol Med.* 2005;117:251-9.
10. Usuki J, Fukuda Y. Evolution of three patterns of intra-alveolar fibrosis produced by bleomycin in rats. *Pathol Int.* 1995;45:552-64.
11. Zhang K, Flanders KC, Phan SH. Cellular localization of transforming growth factor-beta expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 1995;147:352-61.
12. Munger JS, Huang X, Kawadatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, et al. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell.* 1999;96:319-28.
13. Huaux F, Liu T, McGarry B, Ullenbruch M, Phan SH. Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis. *J Immunol.* 2003;170:2083-92.
14. Park SH, Saleh D, Giaid A, Michel RP. Increased endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:600-8.
15. Serrano-Mollar A, Closa D, Cortijo J, Morcillo EJ, Prats N, Girone-la M, et al. P-selectin upregulation in bleomycin induced lung injury in rats: effect of N-acetyl-L-cysteine. *Thorax.* 2002;57:629-34.
16. Kolb M, Margetts PJ, Galt T, Sime PJ, Xing Z, Schmidt M, et al. Transient transgene expression of decorin in the lung reduces the fibrotic response to bleomycin. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:770-7.
17. Molina-Molina M, Serrano-Mollar A, Bulbena O, Fernández-Zabalegui L, Closa D, Marín-Arguedas A, et al. Losartan attenuates bleomycin induced lung fibrosis by increasing prostaglandin E2 synthesis. *Thorax.* 2006;61:604-10.
18. Haston CK, Wang M, Dejourne RE, Zhou X, Ni D, Gu X, et al. Bleomycin hydrolase and a genetic locus within the MHC affect risk for pulmonary fibrosis in mice. *Hum Molt Genet.* 2002;11:1855-63.
19. Hagimoto N, Kuwano K, Miyazaki H, Kunitake R, Fujita M, Kawasaki M, et al. Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;17:272-8.
20. Li X, Zhang H, Soledad-Conrad V, Zhuang J, Uhal BD. Bleomycin-induced apoptosis of alveolar epithelial cells requires angiotensin synthesis de novo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;284:L501-L7.
21. Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, et al. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest.* 2004;114:438-46.
22. Harrison JH Jr, Lazo JS. High dose continuous infusion of bleomycin in mice: a new model for drug-induced pulmonary fibrosis. *J. Pharmacol Exp Ther.* 1987;243:1185-94.
23. Uhal BD, Wang R, Laukka J, Zhuang J, Soledad-Conrad V, Filipatos G. Inhibition of amiodarone-induced lung fibrosis but not alveolitis by angiotensin system antagonists. *Pharmacol Toxicol.* 2003;92:81-7.
24. Taylor MD, Roberts JR, Hubbs AF, Reasor MJ, Antonini JM. Quantitative image analysis of drug-induced lung fibrosis using laser scanning confocal microscopy. *Toxicol Sci.* 2002;67:295-302.

25. Card JW, Racz WJ, Brien JF, Margolin SB, Massey TE. Differential effects of pirfenidone on acute pulmonary injury and ensuing fibrosis in the hamster model of amiodarone-induced pulmonary toxicity. *Toxicol Sci.* 2003;75:169-80.
26. Barbarin V, Arras M, Misson P, Delos M, McGarry B, Phan SH, et al. Characterization of the effect of interleukin-10 on silica-induced lung fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;31:78-85.
27. Coin PG, Osornio-Vargas AR, Roggli VL, Brody AR. Pulmonary fibrogenesis after three consecutive inhalation exposures to chrysotile asbestos. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:1511-9.
28. Pauluhn J, Baumann M, Hirth-Dietrich C, Rosenbruch M. Rat model of lung fibrosis: comparison of functional, biochemical, and histopathological changes 4 months after single irradiation of the right hemithorax. *Toxicology.* 2001;161:153-63.
29. Abdollahi A, Li M, Ping G, Plathow C, Domhan S, Kiessling F, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. *J Exp Med.* 2005;201:925-35.
30. Carpenter M, Epperly MW, Agarwal A, Nie S, Hricisak L, Niu Y, et al. Inhalation delivery of manganese superoxide dismutase-plasmin/liposomes protects the murine lung from irradiation damage. *Gene Ther.* 2005;12:685-93.
31. Budinger GR, Mutlu GM, Eisenbart J, Fuller AC, Bellmeyer AA, Baker CM, et al. Proapoptotic Bid is required for pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:4604-9.
32. Bonner JC, Rice AB, Ingram JL, Moomaur CR, Nyska A, Bradbury A, et al. Susceptibility of cyclooxygenase-2-deficient mice to pulmonary fibrogenesis. *Am J Pathol.* 2002;161:459-70.
33. Miyazaki H, Kuwano K, Yoshida K, Maeyama T, Yoshimi M, Fujita M, et al. The perforin mediated apoptotic pathway in lung injury and fibrosis. *J Clin Pathol.* 2004;57:1292-8.
34. Peters-Golden M, Bailie M, Marshall T, Wilke C, Phan SH, Toews GB, et al. Protection from pulmonary fibrosis in leukotriene-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:229-35.
35. Liu JY, Brody AR. Increased TGF-beta 1 in the lungs of asbestos-exposed rats and mice: reduced expression in TNF- alpha receptor knockout mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2001;20:97-108.
36. Rim KT, Park KK, Sung JH, Chung YH, Han JH, Cho KS, et al. Gene-expression profiling using suppression-subtractive hybridization and cDNA microarray in rat mononuclear cells in response to welding-fume exposure. *Toxicol Ind Health.* 2004;20:77-88.
37. Blundell R, Kaminski N, Harrison D. Increase in p21 expression independent of the p53 pathway in bleomycin-induced lung fibrosis. *Exp Mol Pathol.* 2004;77:231-7.
38. Inoshima I, Kuwano K, Hamada N, Hagimoto N, Yoshimi M, Maeyama T, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286:L1038-L44.
39. Dave NB, Kaminski N. Analysis of microarray experiments for pulmonary fibrosis. *Methods Mol Med.* 2005;117:333-58.
40. Kijiyama N, Ueno H, Sugimoto I, Sasaguri Y, Yatera K, Kido M, et al. Intratracheal gene transfer of tissue factor pathway inhibitor attenuates pulmonary fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;339:1113-9.
41. Kaminski J, Allard JD, Pittet F, Zuo F, Griffiths MJD, Morris D, et al. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:1778-83.
42. Renzoni EA, Abraham DJ, Howat S, Shi-Wen X, Sestini P, Bou-Gharios G, et al. Gene expression profiling reveals novel TGFβ targets in adult lung fibroblasts. *Respir Res.* 2004;5:1-12.
43. Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, et al. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:188-98.
44. Arras M, Louahed J, Simoen V, Barbarin V, Misson P, Van den Brule S, et al. B lymphocytes are critical for lung fibrosis control and prostaglandin E2 regulation in IL-9 transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;34:573-80.
45. Xaubert A, Marín-Arguedas A, Lario S, Ancochea J, Morell F, Ruiz-Manzano J, et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:431-5.
46. Zhang K, Phan SH. Cytokines and pulmonary fibrosis. *Biol Signals.* 1996;5:232-9.
47. Li X, Rayford H, Uhal BD. Essential roles for angiotensin receptor AT1a in bleomycin-induced apoptosis and lung fibrosis in mice. *Am J Pathol.* 2003;163:2523-30.
48. Xu YD, Hua J, Mui A, O'Connor R, Grotendorst G, Khalil N. Release of biologically active TGF-beta1 by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285:L527-L39.
49. Marshall RP, Gohlke P, Chambers RC, Howell DC, Bottoms SE, Unger T, et al. Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286:L156-L64.
50. Koloksick JE, Toews GB, Jakubzick C, Hogaboam C, Moore TA, McKenzie A, et al. Protection from fluorescein isothiocyanate-induced fibrosis in IL-13-deficient, but not IL-4-deficient, mice results from impaired collagen synthesis by fibroblasts. *J Immunol.* 2004;172:4068-76.
51. Matsuyama W, Watanabe M, Shirahama Y, Mitsuyama H, Higashimoto I, Osame M, et al. Discoidin domain receptor 1 contributes to the survival of lung fibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 2006;168:866-77.
52. Ramos C, Montañó M, García-Álvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, et al. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24:591-8.
53. Liu X, Sun SQ, Ostrom RS. Fibrotic lung fibroblasts show blunted inhibition by cAMP due to deficient cAMP response element-binding protein phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315:678-87.
54. Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. TGF-β<sub>1</sub> induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res.* 2005;6:56.
55. Wang R, Alam G, Zagariya A, Gidea C, Pinillos H, Lalude O, et al. Apoptosis of lung epithelial cells in response to TNF-α requires angiotensin generation de novo. *J Cell Physiol.* 2000;185:253-9.
56. Lichtenberger FJ, Montague C, Hunter M, Frambach G, Marsh CB. NAC and DTT promote TGF-beta1 monomer formation: demonstration of competitive binding. *J Inflamm (Lond).* 2006;11:3:7.
57. Ishida T, Tsukada H, Hasegawa T, Yoshizawa H, Gejyo F. Matrix metalloproteinase-1 activation via plasmin generated on alveolar epithelial cell surfaces. *Lung.* 2006;184:15-9.
58. Adamson IH, Young L, Bowden DH. Relationship of alveolar epithelial injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 1988;130:377-83.
59. Ye Q, Chen B, Tong Z, Nakamura S, Sarría R, Costabel U, et al. Thalidomide partially reduces IL-18, IL-8 and TNF-α release from alveolar macrophages in interstitial lung disease. *Eur Respir J.* 2006;28:824-31.
60. Mora AL, Torres-González E, Rojas M, Corredor C, Ritzenthaler J, Xu J, et al. Activation of alveolar macrophages via the alternative pathway in herpesvirus-induced lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;35:466-73.
61. Portnoy J, Pan T, Dinarello CA, Shannon JM, Westcott JY, Zhang L, et al. Alveolar type II cells inhibit fibroblast proliferation: role of IL-1α. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;290:L307-L16.
62. Morishima Y, Nomura A, Uchida Y, Noguchi T, Sakamoto T, Ishii Y, et al. Triggering the induction of myofibroblast and fibrogenesis by airway epithelial shedding. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24:1-11.
63. Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, Jungraithmayr W, Kollert F, Goldmann T, et al. Vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:781-92.
64. Li X, Shu R, Filippatos G, Uhal BD. Apoptosis in lung injury and remodeling. *J Appl Physiol.* 2004;97:1535-42.
65. Molina-Molina M, Lario S, Luburich P, Ramírez J, Carrión MT, Xaubert A. Determinación en plasma del factor transformador del crecimiento β<sub>1</sub> en la fibrosis pulmonar idiopática. *Arch Bronconeumol.* 2006;42:380-3.
66. Gauldie J. Pro: inflammatory mechanisms are a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1205-6.
67. Strieter RM. Con: inflammatory mechanisms are not a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1206-7.

MOLINA-MOLINA M ET AL. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA FIBROSIS PULMONAR:  
UTILIDAD PRÁCTICA ACTUAL Y FUTURA

68. Calabrese F, Giacometti C, Rea F, Loy M, Valente M. Idiopathic interstitial pneumonias: *primum movens*: epithelial, endothelial or whatever. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2005;22:S15-S23.
69. Keane MP, Strieter RM, Belperio JA. Mechanisms and mediators of pulmonary fibrosis. *Crit Rev Immunol.* 2005;25:429-63.
70. Parra ER, David YR, Da Costa LR, Ab'Saber A, Sousa R, Kairalla RA, et al. Heterogeneous remodeling of lung vessels in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung.* 2005;183:291-300.
71. Keane MP, Belperio JA, Burdick MD, Lynch JP, Fishbein MC, Strieter RM. ENA-78 is an important angiogenic factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164: 2239-42.
72. Keane MP, Arenberg DA, Lynch JP, Whyte RI, Lannetoni MD, Burdick MD, et al. The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol.* 1997;159:1437-44.
73. Taskar VS, Coultas DB. Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3:293-8.
74. Doran P, Egan JJ. Herpesviruses: a cofactor in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;289:L709-L10.
75. Raghu G, Freudemberger TD, Yang S, Curtis JR, Spada C, Sillery JK, et al. High prevalence of abnormal acid gastro-oesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2006;27: 136-42.
76. Lee HL, Ryu JH, Wittmer MH, Harman TE, Lymp JF, Tazelaar HD, et al. Familial idiopathic pulmonary fibrosis: clinical features and outcome. *Chest.* 2005;127:2034-41.
77. Hodgson U, Pulkkinen V, Dixon M, Peyrard-Janvid M, Rehn M, Lahermo P, et al. *ELMOD2* is a candidate gene for familial idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Hum Genet.* 2006;79:149-54.
78. Noguee LM. Genetics of pediatric interstitial lung disease. *Curr Opin Pediatr.* 2006;18:287-92.
79. Elford J, Fitch P, Kaminski E, McGavin C, Wells IP. Five cases of sarcoidosis in one family: a new immunological link? *Thorax.* 2000;55:343-4.
80. Kruit A, Grutters JC, Ruven HJ, Van Moorsel CH, Weiskirchen R, Mengsteab S, et al. Transforming growth factor-beta gene polymorphisms in sarcoidosis patients with and without fibrosis. *Chest.* 2006;129:1584-91.
81. Falfan-Valencia R, Camarena A, Juárez A, Becerril C, Montano M, Cisneros J, et al. Major histocompatibility complex and alveolar epithelial apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Genet.* 2005;118:235-44.
82. Vasakova M, Striz I, Slavcev A, Jandova S, Kolesar L, Sulc J. Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Tissue Antigens.* 2006;67:229-32.
83. Lawson WE, Gran SW, Ambrosini V, Womble KE, Dawson EP, Lane KB, et al. Genetic mutations in surfactant protein C are a rare cause of sporadic cases of IPF. *Thorax.* 2004;59:977-80.
84. Wurfel MM, Raghu G. Genetics of pulmonary fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2002;23:177-87.
85. Ancochea J, Antón E, Casanova A. New therapeutic strategies in idiopathic pulmonary fibrosis. *Arch Bronconeumol.* 2004;40 Supl 6:16-22.