



Original

El factor de crecimiento queratinocítico humano recombinante induce la progresión de la supervivencia celular mediada por Akt en ratones enfisematosos



Jai Prakash Moyal^{a,*}, Dhananjay Kumar^a, Sudhir Kotnala^a, Vandana Moyal^{b,c} y Amit Kumar Tyagi^d

^a Department of Biotechnology, School of Biotechnology, Gautam Buddha University, Greater Noida, Uttar Pradesh, India

^b Department of Internal Medicine, Division of Respiratory Medicine, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Alemania

^c 14/Type V, Gautam Buddha University, Greater Noida, Uttar Pradesh, India

^d Division of Nuclear Medicine, Institute of Nuclear Medicine and Allied Sciences, Defense Research Development Organization, Nueva Delhi, India

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 4 de enero de 2014
Aceptado el 29 de abril de 2014
On-line el 10 de julio de 2014

Palabras clave:

Enfisema
Factor de crecimiento queratinocítico humano recombinante
Vía de Akt
Análisis de PCR cuantitativa

R E S U M E N

Introducción: El enfisema se ha asociado a una disminución de la expresión de VEGF y VEGFR-2 y a la presencia de un número elevado de células alveolares apoptóticas. El factor de crecimiento queratinocítico estimula la síntesis de VEGF, lo cual proporciona, a su vez, un mantenimiento de la estructura pulmonar normal a través de la vía de Akt. En este estudio hemos investigado el posible papel del rHuKGF en la mejora de la falta de regulación de la vía de supervivencia celular mediada por Akt en ratones enfisematosos.

Métodos: Se establecieron 3 grupos experimentales: grupos de enfisema, tratamiento y control. Los pulmones de los ratones se trataron terapéuticamente en 3 ocasiones mediante la instilación orofaríngea de 10 mg de rHuKGF/kg de peso corporal tras la inducción del enfisema mediante elastasa pancreática porcina. Posteriormente, se obtuvo tejido pulmonar de los ratones para la realización de exámenes de histopatología y biología molecular.

Resultados y discusión: Las microfotografías de histopatología y el análisis del índice de destrucción han mostrado que el agrandamiento del espacio aéreo inducido por la elastasa y la pérdida de alvéolos se recuperaron en el grupo de tratamiento. El rHuKGF estimula la producción de VEGF, que a su vez induce la vía de supervivencia celular mediada por Akt en los pulmones enfisematosos. Se produjo un aumento significativo de la expresión de mRNA de VEGF, VEGFR, PI3K y Akt, mientras que hubo una disminución notable de Pten, caspasa-9 y Bad en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo de enfisema, y los resultados fueron comparables a los del grupo de control. Además, la expresión de VEGF a nivel proteico concordaba con la observada a nivel de mRNA.

Conclusión: Los suplementos terapéuticos de rHuKGF mejoran la mala regulación de la vía de Akt en el trastorno del enfisema, dando lugar a una supervivencia celular alveolar a través de una activación de la vía de la supervivencia celular dependiente de VEGF endógena. Así pues, el rHuKGF podría ser un posible fármaco para el tratamiento del enfisema.

© 2014 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de SEPAR.

Recombinant Human Keratinocyte Growth Factor Induces Akt Mediated Cell Survival Progression in Emphysematous Mice

A B S T R A C T

Introduction: Emphysema has been associated with decreased VEGF and VEGFR-2 expression and the presence of high numbers of apoptotic alveolar cells. Keratinocyte growth factor stimulates VEGF synthesis which in turn confers normal lung structure maintenance via the Akt pathway. In this study the potential role of rHuKGF in the improvement of deregulated Akt mediated cell survival pathway in emphysematous mice was investigated.

Keywords:

Emphysema
Recombinant human keratinocyte growth factor
Akt pathway
Quantitative PCR analysis

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: jmoyal@gbu.ac.in, suds.biotech@gmail.com (J. Prakash Moyal).

Methods: Three experimental groups, i.e., emphysema, treatment and control groups, were prepared. Lungs of mice were treated on 3 occasions by oropharyngeal instillation of 10 mg rHuKGF per kg body weight after induction of emphysema with porcine pancreatic elastase. Subsequently, lung tissues from mice were collected for histopathology and molecular biology studies.

Results and discussion: Histopathology photomicrographs and destructive index analysis have shown that elastase-induced airspace enlargement and loss of alveoli recovered in the treatment group. rHuKGF stimulates VEGF production which in turn induces the Akt mediated cell survival pathway in emphysematous lungs. mRNA expression of VEGF, VEGFR, PI3K and Akt was significantly increased while Pten, Caspase-9 and Bad was notably decreased in treatment group when compared with emphysema group, being comparable with the control group. Moreover, VEGF protein expression was in accordance with that found for mRNA.

Conclusion: Therapeutic rHuKGF supplementation improves the deregulated Akt pathway in emphysema, resulting in alveolar cell survival through activation of the endogenous VEGF-dependent cell survival pathway. Hence rHuKGF may prove to be a potential drug in the treatment of emphysema.

© 2014 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of SEPAR.

Introducción

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica es un causa importante de la carga de asistencia sanitaria en todo el mundo y la única de las principales causas de muerte cuya prevalencia está aumentando¹. En EE. UU. comporta una morbilidad del 4% y se sitúa en el cuarto lugar de las causas de muerte¹. El enfisema pulmonar, que se produce con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, es un diagnóstico anatomopatológico, definido por un agrandamiento destructivo permanente de los espacios aéreos distales a los bronquiolos terminales, que contribuye a limitar el flujo aéreo y se cree que es irreversible². Hasta el momento no disponemos de ningún tratamiento eficaz para restablecer un parénquima pulmonar con un intercambio de gases normal después de que se hayan establecido las alteraciones enfisematosas. Aunque se ha descrito un papel promotor del tratamiento con ácido all-trans-retinoico en modelos del enfisema en roedores³, no hay ningún tratamiento de eficacia clínica probada que fomente la recuperación del enfisema establecido^{4,5}. Así pues, la inducción de una regeneración alveolar continúa siendo un importante reto para el desarrollo de nuevos tratamientos para el enfisema⁶.

El factor de crecimiento queratinocítico (KGF) es un mitógeno potente en diferentes tipos de células epiteliales y facilita la reparación de la piel, la córnea y el recubrimiento gastrointestinal mediante la estimulación de la división y crecimiento de las células⁷⁻⁹. Esta reparación epitelial ha motivado un interés por su posible uso para el tratamiento de la lesión epitelial en la lesión pulmonar aguda¹⁰. El KGF modula varios mecanismos que se ha observado que son importantes en la reparación del epitelio alveolar y, por tanto, ha generado un interés como posible intervención terapéutica en la lesión pulmonar aguda. El primer estudio sobre el efecto protector del KGF exógeno en un modelo en roedores con lesión pulmonar aguda fue el presentado por Panos et al.¹¹. Los autores indicaron que la administración intratraqueal de KGF humano recombinante (rHuKGF) estimulaba la proliferación de las células de tipo 2 del epitelio alveolar in vivo y reducía la lesión pulmonar inducida por la hiperoxia en las ratas. Posteriormente, el KGF exógeno se ha explorado ampliamente con fines de protección del pulmón frente a la lesión pulmonar experimental, como la inducida por bleomicina^{12,13}, neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*¹⁴, ácido clorhídrico^{15,16}, ácido oleico¹⁷ o radiación y bleomicina¹⁸. Recientemente, los datos de un modelo de perfusión pulmonar humano ex vivo de la lesión pulmonar inducida por endotoxina han indicado que el tratamiento con KGF mejora la función de barrera epitelial y endotelial pulmonar, y mejora la tasa de eliminación del líquido alveolar, con lo que reduce el edema alveolar¹⁹. Tiene interés señalar que los suplementos de rHuKGF aplicados a pulmones enfisematosos muestran una regeneración pulmonar del

epitelio alveolar y el endotelio capilar, así como una transformación y mantenimiento del tejido intersticial²⁰. Además, el KGF tiene tendencia a estimular la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en los queratinocitos humanos²¹⁻²³. El VEGF es un mitógeno específico de las células endoteliales y participa en la reparación de las heridas, la angiogénesis, la permeabilidad microvascular y la protección vascular. Sin embargo, su expresión en la producción de células está estrictamente regulada por factores de crecimiento²². En condiciones normales, estos factores de crecimiento no estimulan de manera directa la angiogénesis, pero pueden modularla a través de la modulación de la expresión de VEGF en tipos celulares específicos, ejerciendo por tanto un efecto angiogénico o antiangiogénico indirecto²⁴. Entre estos factores de crecimiento, el factor de crecimiento fibroblástico 4²⁵, el KGF²⁶, el PDGF²⁷ y el factor de crecimiento transformador β ²⁸ son los que pueden potenciar la producción de VEGF, que a su vez activa la vía de fosfatidilinosítido-3'-OH cinasa (PI3K)-Akt²⁹. En especial en el pulmón, la vía de PI3K-Akt regula múltiples procesos celulares, incluida la proliferación, supervivencia, crecimiento y motilidad de las células alveolares^{30,31}. Así pues, en el presente estudio, investigamos el posible papel del suplemento exógeno de KGF en la inducción de la supervivencia celular mediada por Akt, mediante la activación de PI3K y sus dianas distales en el enfisema (fig. 1).

Material y métodos

Preparación de los modelos animales

Todos los experimentos realizados en animales se llevaron a cabo atendiendo a lo establecido en las guías institucionales que compilaban las regulaciones nacionales e internacionales, y han sido aprobados por el gobierno regional (IAEC, Ministerio de Medio Ambiente y Silvicultura, India). Todos los modelos animales experimentales se prepararon según lo descrito por Yildirim et al.²⁰. Se utilizaron ratones machos C57BL de 8 semanas y libres de patógenos, con un peso corporal de unos 20 g, que fueron asignados aleatoriamente a 3 modelos experimentales diferentes. Se mantuvo a los ratones bajo anestesia de isoflurano y se les administró o bien elastasa o bien rHuKGF/solución salina mediante instilación orofaríngea. Los detalles del desarrollo de los modelos experimentales se describen en el texto que sigue y en la figura 2:

- *Modelo de control (solución salina + solución salina [SS]; n = 8):* La instilación orofaríngea se utilizó para administrar 40 μ l de solución salina los días 1, 10, 31, 34 y 37.
- *Modelo de enfisema (elastasa + solución salina [ES]; n = 8):* Se indujo un enfisema mediante la instilación orofaríngea de elastasa

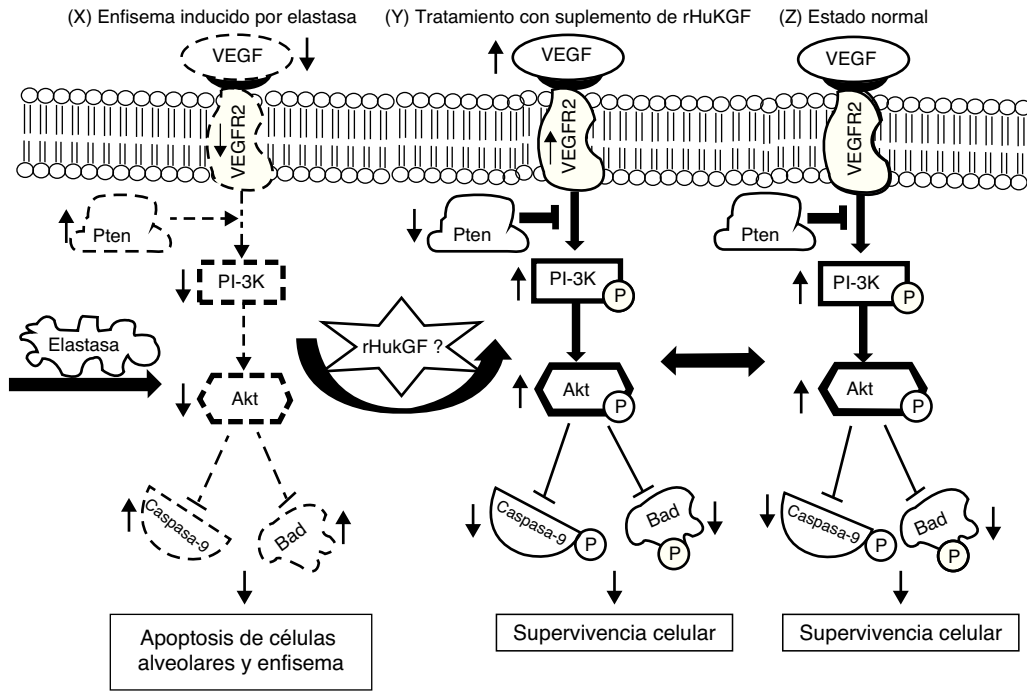


Figura 1. Hipótesis sobre el mecanismo de la inducción por el rHuKGF de la señalización de supervivencia mediada por Akt en el enfisema. El enfisema inducido por elastasa reduce los niveles de VEGF y de VEGFR2, con lo que modifica la señalización de supervivencia a través de PI-3K/Akt. Los factores de crecimiento (como VEGF, KGF etc.) y los factores de supervivencia activan receptores que reclutan PI3K hacia la membrana, lo cual activa a su vez la cinasa Akt. El antagonista Pten inhibe la supervivencia celular mediante una regulación negativa (que se indican con una flecha hacia abajo) de la vía de Akt a través de la desfosforilización. El Akt fosforila y compromete la función de las proteínas caspasa-9 y Bad, que intervienen en las vías de la muerte celular. Esta hipótesis corresponde a la desregulación de la supervivencia celular mediada por Akt en el grupo de enfisema inducido por elastasa (X). Se sabe que diversas moléculas, entre las que se encuentran varios factores de crecimiento, desempeñan un papel clave en la reparación y desarrollo del pulmón y en la supervivencia celular. En este caso, se cree que el suplemento de rHuKGF (S) induce la vía de supervivencia celular mediada por Akt en el enfisema y debe ser idéntico al grupo sano (Z). Akt: cepa de ratón Ak; Bad: promotor de muerte asociado a Bcl-2; PI3K: fosfatidilinosítido-3'-OH cinasa; Pten: homólogo de fosfatasa y tensina en cromosoma 10; t: timosa; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; VEGFR2: receptor de VEGF.

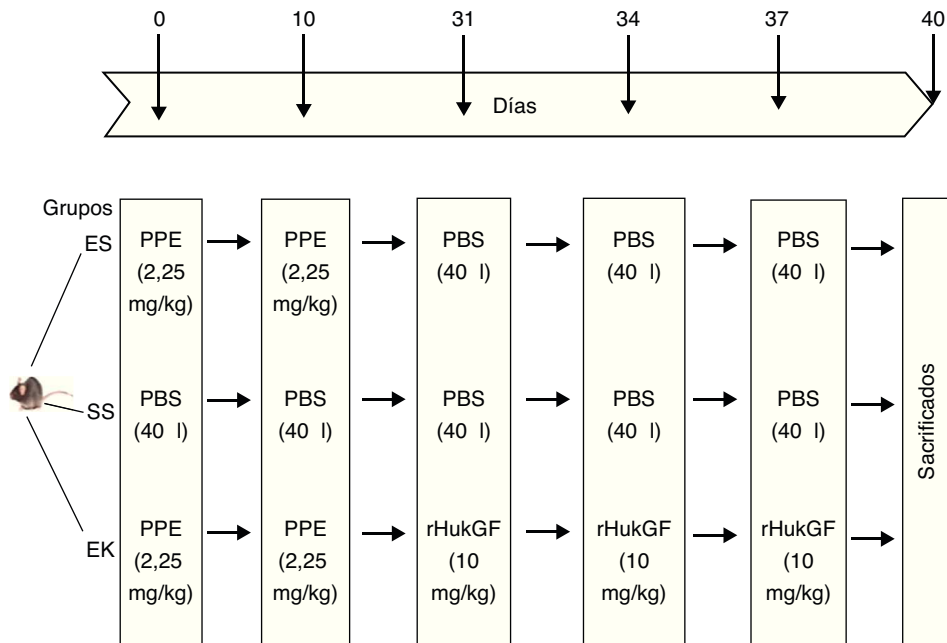


Figura 2. Representación esquemática del diseño experimental. El día 0 y el día 10, los ratones recibieron una instilación orofaríngea de 40 µl de solución salina, con o sin elastasa pancreática porcina (2,5 mg/kg de peso corporal). Los días 31, 34 y 37, los animales recibieron una instilación orofaríngea de 40 µl de solución salina o de rHuKGF (10 mg/kg de peso corporal). El día 40, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los pulmones para los análisis de histopatología y de biología molecular. EK: elastasa-rHuKGF (grupo de tratamiento); ES: elastasa-solución salina (grupo de enfisema); rHuKGF: factor de crecimiento queratinocítico humano recombinante; SS: solución salina (grupo sano).

Tabla 1

Información de los cebadores: secuencia y tamaño de amplicón de las secuencias diana

Nombre del gen	Cebador izquierdo [5'-3']	Cebador derecho [5'-3']	Longitud de amplicón (pb)
VEGFA	CAGGCTGCTGTAACGATGAA	GCATTCACATCTGCTGTGCT	140
VEGFR2	ACCAAGCGGACTATGTTTGC	GGGCAAGTCACTTCAATGGT	160
PI3K	CAAAGCGGAGAACCTATTGC	CCGGTGGCAGTCTTGTTAAT	138
Akt1	GTGAAAGAGAAGGCCACAGG	GTCGTGGGTCTGGAATGAGT	165
Pten	AGACCATAACCCACCACAGC	TACACCAGTCCGTCCTTTC	127
Caspasa-9	GATGCTGTCCCCTATCAGGA	CGATGTACCAGGAGCCACTT	151
Bad	GGAGCTTAGCCCTTTTCAG	GCTTTGTCCATCTGTGTTG	166

Akt: timoma de cepa de ratón Ak; Bad: promotor de muerte asociado a Bcl-2; PI3K: fosfatidilinosítido-3'-OH cinasa; Pten: homólogo de fosfatasa y tensina en cromosoma 10; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; VEGFR2: receptor de VEGF.

pancreática porcina (2,25 mg/kg de peso corporal) en los pulmones de ratones los días 1 y 10. Sin embargo, los pulmones tratados con elastasa recibieron solución salina el día 31, 34 y 37.

– *Modelo terapéutico del enfisema (elastasa + rHuKGF [EK]; n = 8)*: A los pulmones tratados con elastasa se les aplicaron 10 mg/kg de peso corporal de rHuKGF mediante instilación orofaríngea los días 31, 34 y 37.

En el día 40, los animales fueron sacrificados con el método de luxación cervical. Se ventilaron los pulmones artificialmente y se perfundieron con solución salina tamponada con fosfato estéril, para la extracción de la sangre. Se utilizó el pulmón derecho para los análisis de histopatología, mientras que los tejidos del pulmón izquierdo se sumergieron de inmediato en un tanque de nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta el momento del análisis para los estudios de biología molecular.

Fijación del pulmón

Los pulmones derechos se fijaron mediante instilación en la vía aérea de paraformaldehído tamponado con fosfato al 6% a una presión de 20 cm de columna de líquido y se conservaron una noche en el refrigerador. La deshidratación, limpieza e infiltración se realizaron con el empleo de protocolos estándares. Los cortes de tejido procesados se colocaron en un bloque de parafina y se dejaron enfriar y solidificar antes de realizar los cortes de tejido. A continuación se eliminó la parafina del tejido 3 veces mediante Xylene y se volvió a hidratar con diferentes concentraciones de etanol. Con el empleo de un microtomo (microtomo rotatorio, Spencers, India), se realizaron cortes de tejido finos, de 5 μm . Los cortes de tejido finos se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E).

Morfometría

Destrucción del parénquima: Se utilizó una técnica de recuento de puntos microscópicos para determinar el grado de destrucción del parénquima, en lo que se denomina un análisis de índice de destrucción (DI)³². Se colocó una lámina transparente con 83 puntos de recuento sobre una impresión en tamaño A4 de las imágenes microscópicas procedentes de los cortes teñidos. Para cada pieza pulmonar se utilizó la media de 3 cortes diferentes, y se seleccionaron en los cortes generalmente 3 campos no solapados representativos. La evaluación de la presencia de destrucción se llevó a cabo mediante el recuento de los puntos de solapamiento de espacios alveolares y ductales, según lo descrito por Robbesom et al.³³. Se calculó el porcentaje del total de puntos incluidos en las diversas categorías de espacios aéreos destruidos, para obtener el DI, utilizando la fórmula $[D/(D + N)] \times 100\%$, en donde D = destruidos y N = normales. Se calcularon las diferencias de DI en los grupos de enfisema y de tratamiento respecto al grupo de control (100%).

Aislamiento del ARN total del pulmón izquierdo y síntesis de cDNA

Para investigar la expresión relativa del mRNA en el tejido pulmonar, se extrajo el ARN total con el empleo de una técnica basada en el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Nueva Delhi, India) con una pequeña modificación del protocolo de Moyal et al.³⁴. Se determinó la cantidad y la pureza del ARN total con Nanodrop (Thermo Scientific, EE. UU.) mientras que la calidad de la integridad del ARN total se evaluó analizando el ARN ribosómico 18S y 28S en una electroforesis en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio al 1,2%. Se sintetizó el cDNA de primera hebra mediante la introducción de cantidades iguales de ARN (300 ng) de cada muestra en un volumen de reacción total de 20 μl con el empleo de un cebador Oligo dt (Qiagen, Nueva Delhi, India) y un Omniscript RT Kit (Qiagen, Nueva Delhi, India) y los respectivos protocolos. La reacción se incubó a 37°C durante 1 h en Thermoblock TB2 (Biometra, Goettingen, Alemania).

Cuantificación de mRNA relativa

Se realizó una PCR en tiempo real para determinar el factor de amplificación de los genes diana (tabla 1) en un formato de 96 pocillos de Stratagene Mx 3005P (Agilent Technologies, Inc., EE. UU.) en un volumen de reacción total de 20 μl , utilizando 10 μl de un QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Nueva Delhi, India), 1 μl de cada cebador oligonucleótido directo e inverso con especificidad de secuencia (10 pmol), 7 μl de agua y 1 μl de cDNA. Las condiciones de los ciclos térmicos utilizadas en todas las reacciones fueron las siguientes: paso 1: 95°C durante 15 min; 30 ciclos de paso 2 (95°C durante 45 s); paso 3 (temperatura de templado del cebador oligonucleótido de secuencia específica; véase la tabla 1 para los 35 s); y paso 4 (72°C durante 45 s), seguido de un tiempo de paso 5: 72°C , 5 min.

Aislamiento de proteínas y western blot para factor de crecimiento endotelial vascular

Se extrajo la proteína total de 100 mg de WLT con el empleo de un kit de extracción de proteína total (Biochem Life Sciences, Nueva Delhi, India). El protocolo para western blot de VEGF se ha llevado a cabo según lo descrito por Yildirim et al. para el western blot de VEGFR2²⁰.

Análisis estadístico de la cuantificación de mRNA relativa

Se determinaron los niveles de genes diana de mRNA relativos al control endógeno de actina β , según la fórmula de 2 elevado a la potencia de delta del umbral de ciclo ($2^{\Delta\text{Ct}}$), en donde $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}$, gen de referencia - Ct, gen de estudio. Se evaluó la significación estadística de las diferencias entre los grupos experimentales con el empleo de una prueba de Mann-Whitney no paramétrica (GraphPad Prism versión 4, San Diego, EE. UU.). Los niveles de significación se indican mediante * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

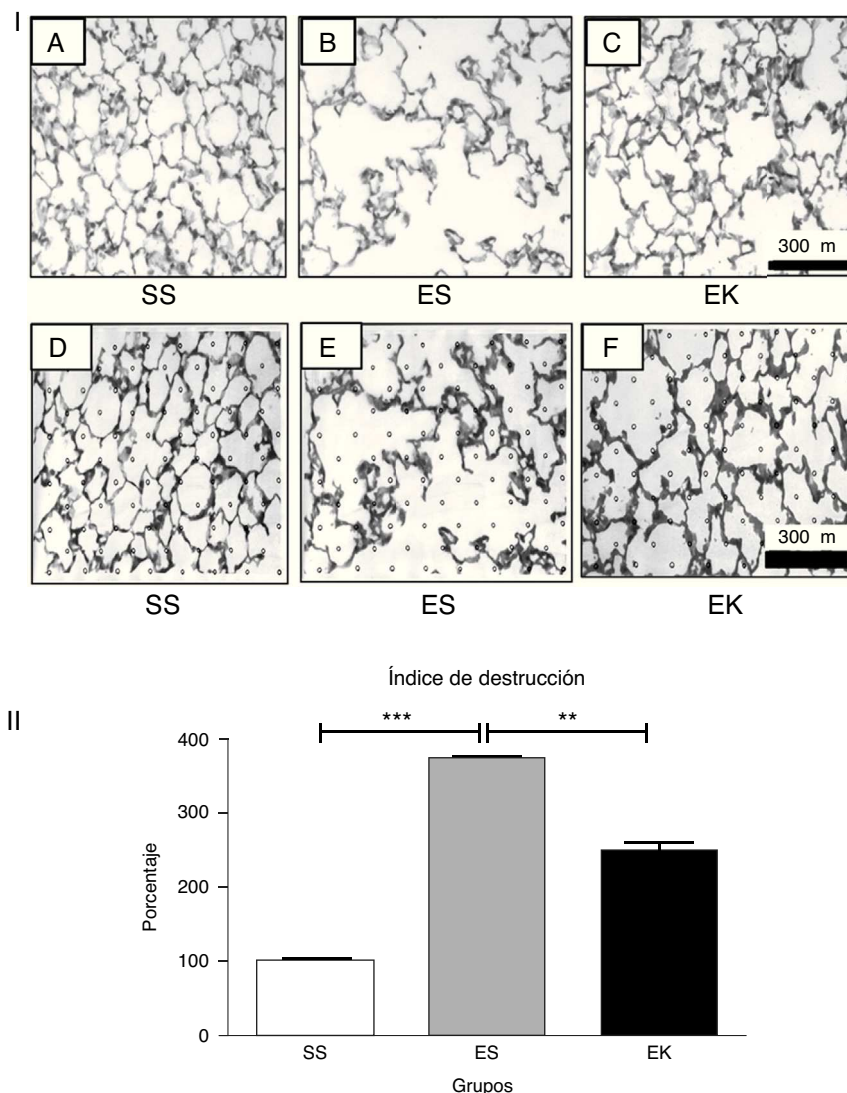


Figura 3. (3-I). Histopatología del área de intercambio de gases. Cortes de tejido con tinción de hematoxilina y eosina que muestran (A) una histología normal en los pulmones de control, (B) una rarefacción de los tabiques alveolares con espacios aéreos agrandados en los pulmones con enfisema y (C) un aumento de los espacios aéreos con engrosamiento de los tabiques alveolares en los pulmones tratados. Todas las microfotografías se tomaron con unos aumentos idénticos. Para la determinación del índice de destrucción, se coloca una lámina transparente con 80 puntos distribuidos por igual sobre la imagen digitalizada impresa de un corte con tinción de HE (D, E, F). Para cada punto, se determina el área circundante según los criterios mencionados en el apartado de Métodos. EK: elastasa-rHuKGF (grupo de tratamiento); ES: elastasa-solución salina (grupo de enfisema); rHuKGF: factor de crecimiento queratinocítico humano recombinante; SS: solución salina (grupo sano).

(3-II). Análisis estadístico del índice de destrucción. A diferencia de lo observado en los pulmones sanos (SS), hubo un aumento significativo del índice de destrucción porcentual en el caso de los pulmones enfisematosos (ES), mientras que este se redujo con el suplemento de rHuKGF en los pulmones enfisematosos (EK). Los gráficos indican los valores de media con desviación estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba de t para datos no emparejados, con objeto de evaluar el efecto del rHuKGF y la elastasa, respectivamente (fig. 3-II). EK: elastasa-rHuKGF (grupo de tratamiento); ES: elastasa-solución salina (grupo de enfisema); rHuKGF: factor de crecimiento queratinocítico humano recombinante; SS: solución salina (grupo sano). *** $p \leq 0,001$ y ** $p \leq 0,01$ frente al correspondiente grupo de control.

Resultados

Efectos del factor de crecimiento queratinocítico humano recombinante sobre la arquitectura tisular

La instilación orofaríngea de 2,25 mg de elastasa pancreática porcina /kg de peso corporal en 2 ocasiones (días 0, 10) produjo un enfisema pulmonar grave, tal como se muestra en la figura 3-I-B de una microfotografía obtenida en el estudio histopatológico. Sin embargo, la microfotografía de los pulmones enfisematosos tratados con rHuKGF mostró de manera evidente la recuperación de los tabiques alveolares perdidos en el grupo de tratamiento (EK, fig. 3-I-C) y fue comparable al grupo de control (SS, fig. 3-I-A). En la determinación del DI de los cortes de tejido de los 3 modelos animales (fig. 3-I-D, E y F), el modelo de ratones enfisematosos mostró

unos valores de DI significativamente superiores a los del modelo de control ($p < 0,001$). Sin embargo, el DI se redujo significativamente ($p < 0,001$) en el caso de los modelos de tratamiento, es decir, los pulmones enfisematosos de ratones tratados con rHuKGF (fig. 3-II).

Efectos del factor de crecimiento queratinocítico humano recombinante sobre el factor de crecimiento endotelial vascular, receptor de factor de crecimiento endotelial vascular, fosfatidilinosítido-3'-OH cinasa y Akt

En un estado normal, la unión de VEGF al VEGFR2 activa la cascada de señalización de Akt distal, lo cual interviene, a su vez, en la supervivencia de las células (fig. 1). Para determinar si el suplemento de rHuKGF induce la cascada de señalización de Akt en los pulmones enfisematosos, evaluamos los niveles de expresión de

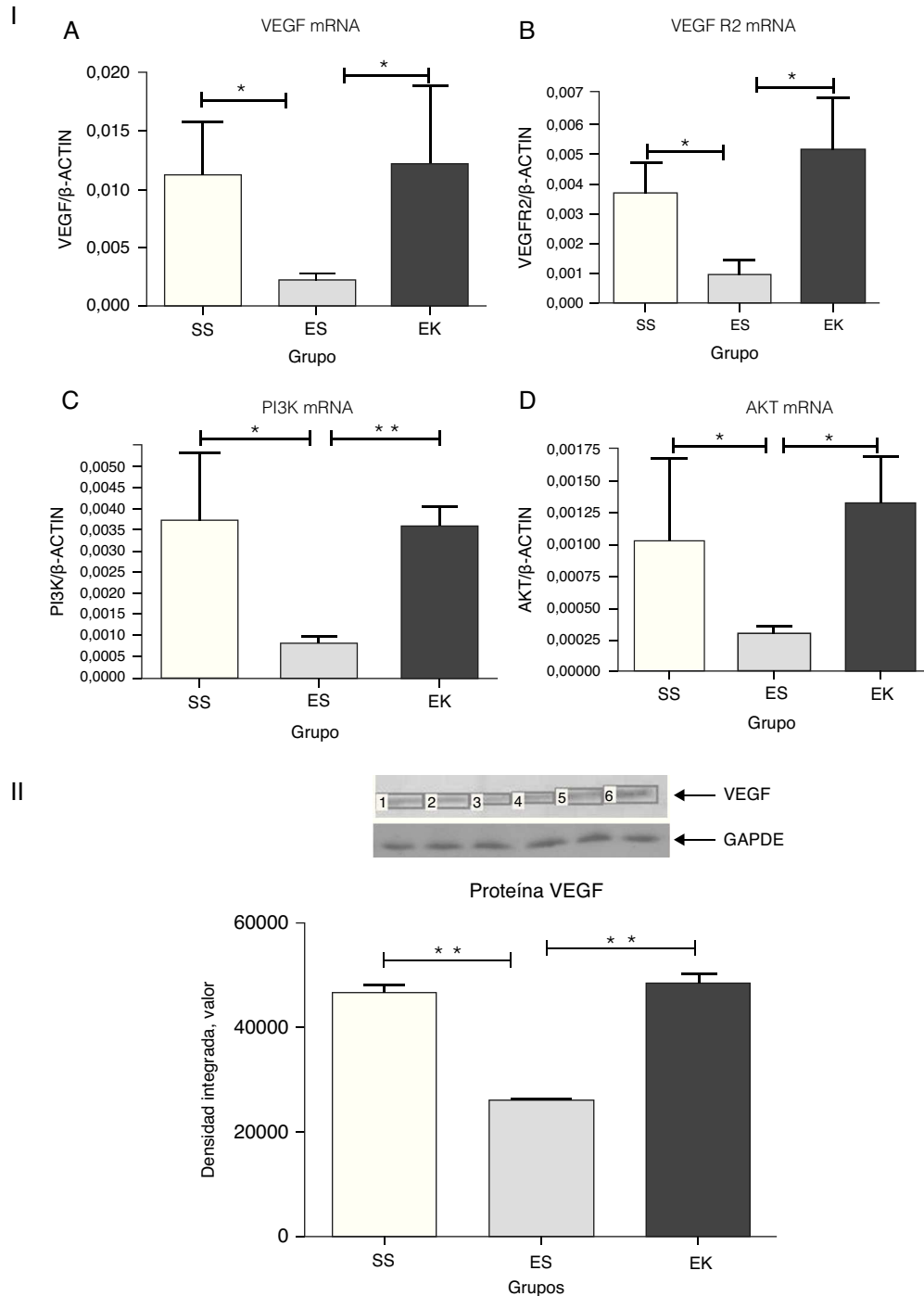


Figura 4. (4-I). Expresión relativa del mRNA de VEGF, VEGFR2, PI3K y Akt (A-D) en tejido pulmonar completo. Los niveles de VEGF, VEGFR2, PI3K y Akt presentaron una regulación negativa significativa en el grupo de enfisema (ES) en comparación con el grupo de control (SS). En cambio, los niveles de VEGF, VEGFR2, PI3K y Akt presentaron una regulación positiva significativa en el grupo de tratamiento (EK) y fueron comparables a los del grupo de control. Se determinaron los niveles de mRNA de los genes diana con los valores relativos respecto al gen de referencia endógeno de la actina β , según la fórmula de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, en donde $\Delta Ct = Ct_{\text{gen de referencia}} - Ct_{\text{gen diana}}$. Akt: cepa de ratón Ak; EK: elastasa-rHuKGF (grupo de tratamiento); ES: elastasa-solución salina (grupo de enfisema); PI3K: fosfatidilinosítido-3'-OH cinasa; rHuKGF: factor de crecimiento queratinocítico humano recombinante; SS: solución salina (grupo sano); VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; VEGFR2: receptor de VEGF. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ frente al respectivo grupo de control. (4-II). Análisis de densitometría de western blot de VEGF. La densitometría de western blot de VEGF puso de manifiesto un patrón similar al observado a nivel del mRNA (fig. 4-IA). Los gráficos indican los valores de media con desviación estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba de t para datos no emparejados, con objeto de evaluar el efecto del rHuKGF y la elastasa, respectivamente. Akt: cepa de ratón Ak; EK: elastasa-rHuKGF (grupo de tratamiento); ES: elastasa-solución salina (grupo de enfisema); PI3K: fosfatidilinosítido-3'-OH cinasa; rHuKGF: factor de crecimiento queratinocítico humano recombinante; SS: solución salina (grupo sano); VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; VEGFR2: receptor de VEGF. ** $p < 0,01$ frente al respectivo grupo de control.

mRNA de VEGF, VEGFR 2, PI3K y Akt respectivamente. En contraste con los pulmones enfisematosos, el grupo de tratamiento (EK) muestra la inducción favorable de los niveles de mRNA de VEGF ($p < 0,05$), VEGFR2 ($p < 0,03$), PI3K ($p < 0,001$) y Akt ($p < 0,02$),

respectivamente. Sin embargo, la expresión de estos genes estaba notablemente reducida en los pulmones enfisematosos (ES) en comparación con los sanos (SS) (fig. 4-I). Además, en la validación de la expresión de VEGF a nivel de proteína, el análisis de western

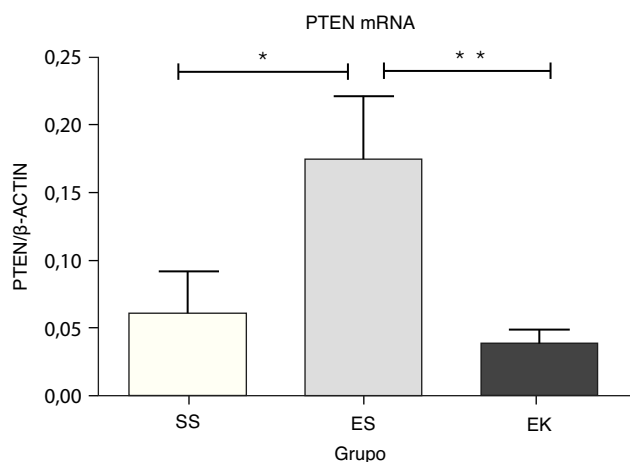


Figura 5. Expresión relativa del mRNA del antagonista (Pten) de la vía de Akt en el tejido pulmonar completo. El nivel de expresión de Pten mostró una inducción significativa en los pulmones expuestos a elastasa, a diferencia del grupo de tratamiento. En el grupo de tratamiento hubo una disminución significativa de los niveles de expresión de Pten, con unos resultados comparables a los del grupo de control. Los niveles de mRNA de los genes diana se determinaron con los valores relativos respecto al gen de referencia endógeno de la actina β según la fórmula de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ elevado a la potencia de delta del umbral de ciclo ($2^{\Delta Ct}$), en donde $\Delta Ct = Ct$, gen de referencia - Ct, gen diana. Los gráficos indican los valores de media con desviación estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba de t para datos no emparejados, con objeto de evaluar el efecto del rHuKGF y la elastasa, respectivamente. EK: elastasa- rHuKGF (grupo de tratamiento); ES: elastasa-solución salina (grupo de enfisema); rHuKGF: factor de crecimiento queratinocítico humano recombinante; SS: solución salina (grupo sano); VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular. * $p < 0,05$ y ** $p \leq 0,01$ frente al respectivo grupo de control.

blot para el VEGF muestra un patrón similar al observado a nivel de mRNA (fig. 4-II).

Efectos del factor de crecimiento queratinocítico humano recombinante sobre el antagonista para la vía de Akt

Se ha descrito que el Pten es un regulador negativo de la vía de supervivencia celular de Akt. Su sobreexpresión da lugar a una desregulación de la señalización de la supervivencia celular. Nuestros datos muestran una regulación positiva significativa de la expresión del mRNA del Pten ($p < 0,04$) en los pulmones enfisematosos (ES) en comparación con los sanos (SS). El papel beneficioso del rHuKGF en los pulmones enfisematosos se apreció también en una reducción significativa del nivel de mRNA de Pten ($p < 0,008$) en comparación con el grupo de ES, y es importante señalar que fue comparable a lo observado en los pulmones sanos (fig. 5).

Efectos del factor de crecimiento queratinocítico humano recombinante sobre los marcadores de apoptosis

Para que se produzca una pérdida de unidades alveolares, sería de prever que, incluso en el modelo de enfisema con elastasa pancreática porcina, hubiera también una cierta apoptosis de las células alveolares. Para evaluar la apoptosis en nuestros modelos animales experimentales, se estudió la expresión de mRNA de marcadores de la apoptosis, es decir caspasa-9 y Bad, en la vía Akt. En este caso, los niveles normalizados de mRNA de caspasa-9 ($p < 0,01$) y Bad ($p < 0,01$) en el tejido pulmonar enfisematoso (ES) mostraron una regulación positiva significativa en comparación con los pulmones sanos (SS). Sin embargo, se observó un efecto prometedor del rHuKGF en el estado de enfisema (EK). En el grupo de tratamiento (EK), observamos una reducción de los niveles de expresión de caspasa-9 ($p < 0,02$) y Bad ($p < 0,0007$) en comparación con los pulmones enfisematosos (ES), lo cual indica que el rHuKGF tiene

una tendencia a contrarrestar la apoptosis de las células alveolares (fig. 6).

Discusión

La patogenia del enfisema pulmonar no se conoce por completo, aunque se han propuesto varios mecanismos, como un desequilibrio de proteasas y antiproteasas, inflamación crónica y estrés oxidativo. Además de estos mecanismos, estudios recientes muestran otro mecanismo involucrado en el desarrollo del enfisema pulmonar que se basa en un aumento de las células endoteliales y epiteliales alveolares apoptóticas en los pulmones³⁵. Sin embargo, la formación del enfisema pulmonar puede interpretarse también como la consecuencia de un fallo de los procesos de reparación del pulmón. En la actualidad, no disponemos de ninguna opción terapéutica que permita la reparación de los alvéolos perdidos en el estado enfisematoso. Así pues, la inducción de una regeneración alveolar continúa siendo un importante reto para el desarrollo de nuevos tratamientos para el enfisema. Tan solo recientemente, la administración de KGF ha mostrado ser el factor de crecimiento potente que posee propiedades tanto protectoras como curativas en el estado de enfisema^{20,36}. Sin embargo, los mecanismos moleculares distales que rigen la supervivencia de las células alveolares no se han abordado por el momento. Así pues, en el presente estudio, hemos intentado mostrar el posible efecto del rHuKGF en la activación de la cascada de señalización de Akt, mediante la estimulación de la producción de VEGF en ratones enfisematosos.

Nuestros resultados muestran claramente un posible papel del rHuKGF en los pulmones de ratones enfisematosos. El papel prospectivo del rHuKGF se observó claramente en la arquitectura tisular con el empleo de histopatología del análisis del DI basado en morfometría. Las microfotografías mostraron la pérdida de los tabiques alveolares en los pulmones enfisematosos en comparación con los pulmones sanos. Se observó que esta pérdida de los tabiques alveolares se recuperaba en el grupo de tratamiento y era del todo comparable a la de los grupos sanos. Yildirim et al. han descrito una observación similar, con el empleo de la longitud de intersección media como instrumento para cuantificar el daño y la recuperación del tejido alveolar²⁰. En nuestro estudio utilizamos un análisis basado en el DI como instrumento para cuantificar tanto el daño como la recuperación del tejido alveolar, con objeto de abordar el papel prospectivo del rHuKGF. El valor medio de DI de los pulmones enfisematosos es superior al valor de los pulmones sanos. Robbesom et al. observaron también un valor de DI similar en los grandes fumadores en comparación con los controles³³. Creemos que los valores más altos de DI pueden deberse a las condiciones de medida estrictas de nuestro estudio, lo cual descarta posibles sesgos como un tejido con insuficiencia subóptima. Tiene interés señalar que los valores de DI se redujeron de manera significativa con el suplemento de rHuKGF en los pulmones enfisematosos. Este efecto recíproco en los valores de DI puede deberse a una regeneración de las paredes de los tabiques alveolares, que dio lugar a un aumento del número de espacios alveolares intactos. Aparte del papel prospectivo del rHuKGF sobre la arquitectura tisular, a continuación, se investigó el papel prospectivo del rHuKGF en la cascada de señalización de Akt en los pulmones de ratones enfisematosos en el presente trabajo.

Según lo indicado por Shiojima et al., la unión del VEGF al VEGFR2 activa la cascada de señalización de Akt, lo cual es importante en la supervivencia, proliferación y migración celulares y en la angiogénesis³⁷. Además, el KGF tiene una posible tendencia a inducir la activación del Akt, lo cual puede ser el mecanismo común subyacente en la citoprotección de las células epiteliales de diferentes tejidos^{38,39}. En el pulmón, Ray et al. obtuvieron unos resultados similares, y señalaron que el KGF estimula la secreción de VEGF, lo

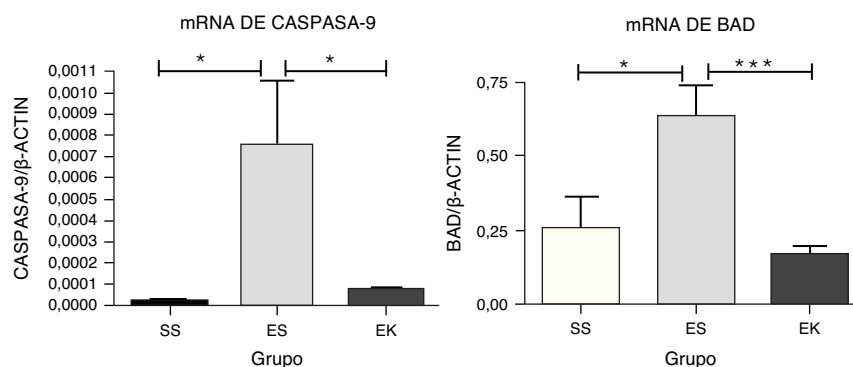


Figura 6. Expresión relativa de mRNA de marcadores de apoptosis (caspasa-9 y Bad) en el tejido pulmonar completo. El nivel de expresión de caspasa-9 y Bad mostró una inducción significativa en los pulmones expuestos a elastasa, a diferencia del grupo de tratamiento. En el grupo de tratamiento hubo una disminución significativa de los niveles de caspasa-9 y Bad, con unos niveles de expresión comparables a los del grupo de control. Los niveles de mRNA de los genes diana se determinaron con los valores relativos respecto al gen de referencia endógeno de la actina β según la fórmula de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, en donde $\Delta Ct = Ct$, gen de referencia-Ct, gen diana. Los gráficos indican los valores de media con desviación estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba de t para datos no emparejados, con objeto de evaluar el efecto del rHuKGF y la elastasa, respectivamente. EK: elastasa-rHuKGF (grupo de tratamiento); ES: elastasa-solución salina (grupo de enfisema); rHuKGF: factor de crecimiento queratinocítico humano recombinante; SS: solución salina (grupo sano). * $p < 0,05$ y *** $p \leq 0,001$ frente al respectivo grupo de control.

cual potencia la citoprotección de las células endoteliales mediante la activación de Akt^{40,41,29}. En este estudio se observó que con el suplemento de rHuKGF en los pulmones enfisematosos, los niveles de mRNA de los genes candidatos (VEGF, VEGFR2, PI3K y Akt), involucrados en la cascada de señalización de Akt, tienen una regulación positiva hasta el nivel óptimo, igual que se observa en los pulmones sanos. Además, la expresión de proteína del VEGF sufrió una inducción significativa en los pulmones enfisematosos tratados con rHuKGF. Esto sugiere que el rHuKGF tiene el potencial de establecer una arquitectura pulmonar normal, tras la pérdida de los tejidos alveolares, mediante la estimulación de la expresión de VEGF en los pulmones enfisematosos. Anteriormente se ha descrito que, en los pulmones enfisematosos de pacientes fumadores y pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la expresión de mRNA y de proteína de VEGF y VEGFR2 presentaron una regulación negativa⁴². Esta reducción de la expresión de VEGF/VEGFR puede conducir a una apoptosis de las células endoteliales con los consiguientes cambios enfisematosos⁴³⁻⁴⁶.

Además, los pulmones enfisematosos a los que se aplica un suplemento de KGF muestran una inducción en los niveles de mRNA de PI-3K, que estaban reducidos en esos pulmones. Esta inducción de PI-3K mejora la interacción de VEGFR2 con PI-3K para la activación de la cascada de señalización distal, con lo que se mantiene la viabilidad celular⁴⁷. Además, el efecto favorable del rHuKGF se observó también a nivel del mRNA de Akt. Se observó que la expresión que estaba reducida en el grupo de enfisema aumentaba tras los suplementos de rHuKGF en los pulmones enfisematosos. Esta inducción en la expresión de Akt puede tener múltiples efectos beneficiosos sobre los procesos celulares, en especial en cuanto a la proliferación y supervivencia de las células alveolares. La inducción de la actividad de la Akt cinasa producida por el KGF de un modo dependiente de la dosis y del tiempo ha sido comentada también por Shenying et al.⁴⁸. Sus resultados concluyeron que el KGF tiene la máxima eficacia en el mantenimiento de la viabilidad celular mediante la estimulación de la actividad de la Akt cinasa antes de la exposición a los estímulos inductores de apoptosis⁴⁸.

Nosotros observamos también que el rHuKGF tiene el potencial de reducir al mínimo la sobreexpresión de Pten y caspasa-9 a un nivel óptimo en los pulmones enfisematosos. El Pten actúa como un antagonista de la supervivencia celular mediante la regulación negativa de la vía de Akt a través de la desfosforilización⁴⁹ y por tanto la inhibición del fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PI [3, 4, 5] P3). Se ha descrito que la sobreexpresión de Pten en el epitelio alveolar causa una notable reducción de la proliferación celular, un aumento notable de la apoptosis y una diferenciación funcional

incompleta, lo cual comporta una regulación negativa de la vía de la supervivencia celular⁵⁰. De igual modo, se ha observado que el aumento de la expresión de la caspasa-9 interviene en la apoptosis celular y la disminución de la supervivencia celular⁵¹. En este estudio, los niveles de mRNA de Pten y caspasa-9 en los pulmones enfisematosos tratados con suplementos de rHuKGF presentaron una regulación negativa, a diferencia de lo observado en los pulmones enfisematosos. Estos cambios favorables podrían deberse a una supresión de la sobreexpresión de Pten y caspasa-9⁴⁸ y a una inducción de la activación de Akt que favorece la disminución de la apoptosis de las células alveolares y el aumento de la supervivencia celular.

El Bad proapoptótico es la diana principal de Akt y el Akt fosforila el Bad, con lo que lo hace inactivo para la señal de apoptosis^{52,53}. Datta et al. plantearon la hipótesis de que la vía de PI3K-Akt puede conducir a una fosforilación del Bad y puede inhibir por tanto la muerte celular y promover la supervivencia de las células^{54,55}. En especial en el estado de enfisema Hu et al. mostraron un aumento de la expresión de Bad en las células de músculo liso de vías aéreas humanas⁵⁶. En nuestro estudio se observó que la expresión de Bad estaba regulada positivamente en los pulmones enfisematosos en comparación con los sanos, lo cual podría deberse al fallo de la fosforilación del Bad por el Akt. Sin embargo, el posible efecto del rHuKGF sobre el Bad se evaluó con mayor detalle en los pulmones enfisematosos. La expresión del Bas mostró una notable regulación negativa en el grupo de tratamiento en comparación con los pulmones enfisematosos y fue idéntica a la de los pulmones sanos. Estos resultados respaldan nuevamente los posibles efectos favorables del suplemento de rHuKGF en un programa de supervivencia y mantenimiento celulares.

Los datos generados por este estudio muestran claramente que el rHuKGF puede ser una medicina molecular potente, que pueda inducir el VEGF endógeno y producir señales de supervivencia importantes que son necesarias para el mantenimiento de la estructura normal del pulmón.

Conclusión

Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto la eficacia terapéutica del rHuKGF para rectificar la vía de supervivencia celular dependiente de Akt que está desregulada en el estado de enfisema. Los efectos favorables se apreciaron en la arquitectura del tejido y en su análisis cuantitativo. Además, los genes que se asocian a la vía de la supervivencia celular dependiente de Akt que regulan la supervivencia de las células alveolares se expresaron

de manera constructiva con los suplementos de rHuKGF exógeno en los pulmones enfisematosos. Considerados conjuntamente, los resultados indican que el mantenimiento de la supervivencia celular en el grupo de tratamiento fue inducido por la mejora de la vía de supervivencia celular dependiente de Akt; y plantean la posibilidad de tratar a los pacientes con enfisema. No obstante, deberán realizarse estudios más detallados.

Contribuciones específicas de cada autor

Jai Prakash Muiyal participó en el diseño del estudio y llevó a cabo la preparación del modelo animal, el análisis estadístico y supervisó el trabajo y colaboró en la elaboración de la versión preliminar del manuscrito. Dhanaanay Kumar llevó a cabo el aislamiento del ARN de los tejidos pulmonares, la síntesis de cDNA y la PCR cuantitativa. Sudhir Kotnala realizó la histopatología, el análisis del índice de destrucción y el western blot. Vandana Muiyal participó en el western blot y en la preparación del manuscrito. Amit K. Tyagi colaboró en la preparación de los diferentes modelos animales.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses directa ni indirectamente relacionados con el contenido del manuscrito.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Rashid Ali (Institute of Nuclear Medicine y Allied Sciences, DRDO, Nueva Delhi, India) la ayuda en el manejo de los animales. Los autores agradecen al Departamento de Ciencia y Tecnología, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Nueva Delhi (India) la ayuda económica y expresan su sincera gratitud a Swedish Orphan Biovitrum (SOBI), Estocolmo (Suecia) por proporcionar el rHuKGF.

Bibliografía

- Hurd S. The impact of COPD in lung health worldwide: Epidemiology and incidence. *Chest*. 2000;117:1S–4S.
- Hogg JC. A stimulating treatment for emphysema. *Nature Med*. 1997;3:603–5.
- Ulrich TR, Yi ES, Longmair K, Yin S, Biltz R, Morris CF, et al. Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo. *J Clin Invest*. 1994;93:1298–306.
- Massaro D, Massaro GD. Toward therapeutic pulmonary alveolar regeneration in humans. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:709–12.
- Taraseviciene SL, Voelkel NF. Molecular pathogenesis of emphysema. *J Clin Invest*. 2008;118:394–402.
- Utz JP, Hubmayr RD, Deschamps C. Lung volume reduction surgery for emphysema: Out on a limb without a NETT. *Mayo Clin Proc*. 1998;73:552–66.
- Staiano CL, Krueger JG, Rubin JS, D'Limi S, Vallat VP, Valentino L, et al. Human keratinocyte growth factor effects in a porcine model of epidermal wound healing. *J Exp Med*. 1993;178:865–78.
- Sotozono C, Inatomi T, Nakamura M, Kinoshita S. Keratinocyte growth factor accelerates corneal epithelial wound healing in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36:1524–9.
- Zeeh JM, Procaccino F, Hoffmann P, Aukerman SL, McRoberts JA, Soltani S, et al. Keratinocyte growth factor ameliorates mucosal injury in an experimental model of colitis in rats. *Gastroenterology*. 1996;110:1077–83.
- Ware LB, Matthay MA. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: Roles in lung development, inflammation, and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282:L924–40.
- Panos RJ, Bak PM, Simone WS, Rubin JS, Smith IJ. Intratracheal instillation of KGF decreases hyperoxia-induced mortality in rats. *J Clin Invest*. 1995;96:2026–33.
- Deterding RR, Havill AM, Yano T, Middleton SC, Jacoby CR, Shannon JM, et al. Prevention of bleomycin-induced lung injury in rats by keratinocyte growth factor. *Proc Assoc Am Physicians*. 1997;109:254–68.
- Sugahara K, Iyama K, Kuroda MJ, Sano K. Double intratracheal instillation of keratinocyte growth factor prevents bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *J Pathol*. 1998;186:90–8.
- Viget NB, Guery BPH, Ader F, Nevriere R, Alfandari S, Creuzy C, et al. Keratinocyte growth factor protects against *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279:L1199–209.
- Yano T, Deterding RR, Simonet WS, Shannon JM, Mason RJ. Keratinocyte growth factor reduces lung damage due to acid instillation in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;15:433–42.
- Nemzek JA, Ebong SJ, Kim J, Bolgos GL, Remick DG. Keratinocyte growth factor pretreatment is associated with decreased MIP-2 concentrations and reduced neutrophil recruitment in acid aspiration lung injury. *Shock*. 2002;18:501–6.
- Ulrich K, Stern M, Goddard ME, Williams J, Zhu J, Dewar A, et al. Keratinocyte growth factor therapy in murine oleic acid-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288:L1179–92.
- Yi ES, Williams ST, Lee H, Malicki DM, Chin EM, Yin S, et al. Keratinocyte growth factor ameliorates radiation- and bleomycin-induced lung injury and mortality. *Am J Pathol*. 1996;149:1963–70.
- Lee JW, Fang X, Gupta N, Serikov V, Matthay MA. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:16357–62.
- Yildirim AO, Muiyal V, John G, Müller B, Seifart C, Kasper M, et al. Palifermin induces alveolar maintenance programs in emphysematous mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181:705–17.
- Ferrara N, Gerber HP, Lecouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9:669–76.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 1999;13:9–22.
- Frank S, Hübner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*. 1995;270:12607–13.
- Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett*. 2006;580:2879–87.
- Deroanne CF, Hajitou A, Calberg-Bacq CM, Nusgens BV, Lapiere CM. Angiogenesis by fibroblast growth factor -4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res*. 1997;57:5590–7.
- Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes—implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*. 1995;270:12607–13.
- Finkenzeller G, Sparacio A, Technau A, Marme D, Siemeister G. Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene*. 1997;15:669–76.
- Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem*. 1994;269:6271–4.
- Fujio Y, Walsh K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J Biol Chem*. 1999;274:16349–54.
- Wang J, Ito T, Udaka N, Okudela K, Yazawa T, Kitamura H. PI3K-AKT pathway mediates growth and survival signals during development of fetal mouse lung. *Tissue Cell*. 2005;37:25–35.
- Davies JA. Do different branching epithelia use a conserved developmental mechanism? *Bioessays*. 2002;24:937–48.
- Saetta M, Shiner RJ, Angus GE, Kim WD, Wang NS, King M, et al. Destructive Index: A measurement of lung parenchymal destruction in smokers. *Am Rev Respir Dis*. 1985;131:764–9.
- Robbeson AA, Versteeg EM, Veerkamp JH, van Krieken JH, Bulten HJ, Smits HT, et al. Morphological quantification of emphysema in small human lung specimens: Comparison of methods and relation with clinical data. *Mod Pathol*. 2003;16:1–7.
- Muiyal JP, Muiyal V, Kaistha BP, Seifart C, Fehrenbach H. Systematic comparison of RNA extraction techniques from frozen and fresh lung tissues: Checkpoint towards gene expression studies. *Diagn Pathol*. 2009;4:9.
- Edirisinghe I, Yang SR, Yao H, Rajendrasozhan S, Caito S, Adenuga D, et al. VEGFR-2 inhibition augments cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammatory responses leading to endothelial dysfunction. *FASEB J*. 2008;22:2297–310.
- Plantier L, Marchand-Adam S, Antico Arciuch VG, Boyer L, de Coster C, Marchal J, et al. Keratinocyte growth factor protects against elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293:L1230–9.
- Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*. 2002;90:1243–50.
- Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, et al. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science*. 1994;266:819–22.
- Rossi S, Blazar BR, Farrell CL, Danilenko DM, Lacey DL, Weinberg KI, et al. Keratinocyte growth factor preserves normal thymopoiesis and thymic microenvironment during experimental graft-versus-host disease. *Blood*. 2002;100:682–91.
- Ray P, Devaux Y, Stolz DB, Yarlagadda M, Watkins SC, Lu Y, et al. Inducible expression of keratinocyte growth factor (KGF) in mice inhibits lung epithelial cell death induced by hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:6098–103. Publicación electrónica 5 May 2003.
- Gratton JP, Morales-Ruiz M, Kureishi Y, Fulton D, Walsh K, Sessa WC. Akt down-regulation of p38 signaling provides a novel mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated cytoprotection in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2001;276:30359–65. Publicación electrónica 31 May 2001.
- Marwick JA, Stevenson CS, Giddings J, MacNee W, Butler K, Rahman I, et al. Cigarette smoke disrupts VEGF165-VEGFR-2 receptor signaling complex in rat

- lungs and patients with COPD: Morphological impact of VEGFR-2 inhibition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290:L897–908.
43. Giordano RJ, Lahdenranta J, Zhen L, Chukwueke U, Petrache I, Langley RR, et al. Targeted induction of lung endothelial cell apoptosis causes emphysema-like changes in the mouse. *J Biol Chem*. 2008;283:29447–60.
 44. Petrache I, Fijalkowska I, Zhen L, Medler TR, Brown E, Cruz P, et al. A novel antiapoptotic role for alpha1-antitrypsin in the prevention of pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:1222–8.
 45. Tang K, Rossiter HB, Wagner PD, Breen EC. Lung-targeted VEGF inactivation leads to an emphysema phenotype in mice. *J Appl Physiol*. 2004;97:1559–66.
 46. Kasahara Y, Tudor RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:737–44.
 47. Thakker GD, Hajjar DP, Muller WA, Rosengart TK. The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *J Biol Chem*. 1999;274:10002–7.
 48. Shenyng B, Yijie W, Patricia S, Alpana C, Andrea ID. Clay keratinocyte growth factor induces Akt kinase activity and inhibits Fas-mediated apoptosis in A549 lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288:L36–42.
 49. Hosgood HD, Idan M, Xingzhou H, Stephen C, Qing L. PTEN identified as important risk factor of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2009;103:1866–70.
 50. Joëlle D, Jean PR, Moshe S, Lothar H, Derek L. PTEN overexpression suppresses proliferation and differentiation and enhances apoptosis of the mouse mammary epithelium. *J Clin Invest*. 2002;110:815–25.
 51. Mirjam D, Dušan Š, Irina M. Overexpression of caspase-9 triggers its activation and apoptosis in vitro. *Croat Med J*. 2006;47:832–40.
 52. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*. 1998;281:1322–6.
 53. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*. 1996;87:619–28.
 54. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91:231–41.
 55. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: A play in three Akts. *Genes Dev*. 1999;13:2905–27.
 56. Hu W, Xie J, Zhao J, Xu Y, Yang S, Ni W. Involvement of Bcl-2 family in apoptosis and signal pathways induced by cigarette smoke extract in the human airway smooth muscle cells. *DNA Cell Biol*. 2009;13–22.