

# FIBROSIS PULMONAR: PERSPECTIVAS ACTUALES

M. Jordana, A. Xaubet y J. Gauldie

Department of Pathology, Molecular Virology and Immunology Program, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canadá.

## Introducción

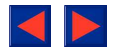
Uno de los conceptos actuales básicos sobre la patogénesis de la fibrosis pulmonar gira alrededor de la noción de que inflamación y fibrosis son procesos íntimamente relacionados. Ciertamente, en estos últimos años un considerable número de estudios han examinado la interacción entre células inflamatorias y células del parénquima pulmonar, principalmente fibroblastos, ilustrando la relevancia de estas interacciones en la patogénesis de la fibrosis pulmonar. Así, el incremento en el depósito de fibras colágenas en el intersticio pulmonar que caracteriza a esta enfermedad ocurriría como resultado de la activación de los fibroblastos por moléculas liberadas por varias células inflamatorias, particularmente macrófagos alveolares y linfocitos. Sin embargo, conviene puntualizar que la capacidad del organismo para articular una reacción inflamatoria en respuesta a agresiones tisulares es esencial para la sobrevivencia del organismo. De modo que para comprender la patogénesis de la fibrosis pulmonar es fundamental entender las causas que alteran una reacción, esencialmente homeostática, como es la inflamación. En este artículo se discutirán tres aspectos que, evaluados en conjunto, podrían ofrecer indicaciones para entender esta alteración. En primer lugar se revisará la capacidad efectora, esto es, de liberar citoquinas (péptidos mensajeros similares a hormonas), de las células inflamatorias, particularmente del macrófago alveolar. En segundo lugar se discutirá el concepto del fibroblasto como célula efectora y su potencial contribución en la regulación o disregulación del proceso inflamatorio. Finalmente se presentarán datos indicando que, en ciertas circunstancias, el fenotipo del fibroblasto pulmonar cambia, y este cambio podría estar asociado al desarrollo de la fibrosis. En esencia, nuestra propuesta contempla la

expresión de enfermedad como la continuación de procesos fisiológicos más allá de los límites requeridos para una función homeostática.

## UNA NOTA SOBRE HISTOLOGÍA

Tradicionalmente se ha considerado que el engrosamiento del intersticio pulmonar secundario a un incremento en el depósito de fibras colágenas es la característica esencial de la fibrosis del pulmón. Es, sin embargo, aparente que las anomalías estructurales que ocurren en esta enfermedad son de una mayor complejidad. Diversos estudios en modelos experimentales de fibrosis pulmonar han ilustrado que las alteraciones en el epitelio y el endotelio pulmonares preceden a los cambios intersticiales<sup>1-3</sup>. Por ejemplo, Basset et al demostraron, en diversas enfermedades intersticiales pulmonares, la presencia de disrupciones en la superficie epitelial y en la membrana basal, las cuales permitían la migración de células conectivas a su través. El resultado de esta migración es la fibrosis intraalveolar y, ocasionalmente, la fibrosis de los septos alveolares y de los bronquiolos distales<sup>4</sup>. Katzenstein describió observaciones similares en pacientes con neumopatía intersticial aguda. Este mismo autor también observó frecuentes áreas de colapso pulmonar en zonas sin recubrimiento epitelial<sup>5</sup>. Por otra parte, Raghu et al estudiaron la distribución de laminina y colágeno tipo IV por medio de inmunofluorescencia indirecta, en especímenes de pacientes con fibrosis pulmonar y demostraron claramente la existencia de interrupciones en la membrana basal<sup>6</sup>. Starcher et al documentaron aumentos en el contenido de elastina, además de colágeno, en los pulmones de hamsters expuestos a bleomicina<sup>7</sup>. Otros estudios han documentado alteraciones, tanto cualitativas como cuantitativas, de los glicosaminoglicanos (GAG) en pulmones fibróticos<sup>8</sup>. En conjunto, estos estudios indican que la fibrosis del pulmón es un proceso

Recibido el 30.8.1988 y aceptado el 3.7.1989.



caracterizado, no simplemente por un aumento del colágeno intersticial, sino por alteraciones en el conjunto de proteínas que conforman la matriz extracelular, las cuales conducen a una distorsión profunda de la arquitectura pulmonar.

## EL MILIEU INFLAMATORIO. PUNTOS Y CONTRAPUNTOS

La asociación entre inflamación y fibrosis ha sido notada desde hace tiempo. Sin embargo, la noción de que inflamación y fibrosis están *causalmente* relacionadas es más reciente y esto ha sido así por varias razones. En primer lugar, el examen detallado de modelos experimentales de fibrosis pulmonar ha desvelado que la inflamación siempre precede a la fibrosis<sup>9-12</sup>. Por otra parte, la observación de que la administración de estímulos fibrogénicos, como sílice y oxígeno hiperbárico, a ciertas especies de aves y anfibios, en los que las células inflamatorias no migran al pulmón, no causa fibrosis pulmonar<sup>13, 14</sup>. La tercera razón, y probablemente la más importante, es el resultado de la información adquirida con respecto al enorme potencial efector de las células pulmonares inmunoinflamatorias, específicamente su capacidad de liberar citoquinas capaces de modular la función de los fibroblastos y probablemente otras células mesenquimatosas.

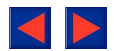
El macrófago alveolar es considerado como una célula de importancia capital en el desarrollo de la fibrosis pulmonar y, consiguientemente, ha sido una de las células inflamatorias examinadas con mayor detalle. Además de su bien conocida capacidad fagocítica y para presentar antígenos, esta célula dispone de una capacidad efectora considerable. El macrófago alveolar es capaz de liberar prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y leucotrienos, los cuales pueden interactuar con numerosos tipos de células y así regular numerosos procesos biológicos; esta célula es también capaz de producir radicales de oxígeno y enzimas, como elastasas y colagenasas, importantes en los mecanismos de daño y reparación tisular<sup>15-18</sup>.

En estos últimos años se han identificado una serie de citoquinas liberadas por el macrófago alveolar implicadas en una amplia variedad de interacciones celulares. Por ejemplo, el *alveolar macrophage-derived growth factor* (AMDGF), recientemente caracterizado como similar al *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) estimula, conjuntamente con la fibronectina, la proliferación de fibroblastos<sup>19</sup>. El *platelet-derived growth factor* (PDGF), un potente mitógeno para células mesenquimatosas, es además quimiotáctico para fibroblastos e induce, en fibroblastos cutáneos, la transcripción de mRNA específico para colagenasa<sup>20, 21</sup>. El *transforming growth factor-β* (TGF-β), un péptido inicialmente identificado por su capacidad para inducir transformaciones fenotípicas en fibroblastos de rata, es hoy reconocido por su habilidad para regular muchas otras funciones celulares<sup>22</sup>. Por ejemplo, Postlewaite et al han demostrado que el TGF-β es también quimiotáctico para los fibroblastos<sup>23</sup> y Varga et al han

documentado recientemente que este péptido estimula la expresión y biosíntesis tanto del colágeno como de la fibronectina en los fibroblastos cutáneos<sup>24</sup>. Además, Roberts et al observaron que el TGF-β también estimula la expresión del receptor para la fibronectina en los fibroblastos pulmonares humanos<sup>25</sup>. Los *tumor necrosis factor α* y *β* (TNFα, β) son dos citoquinas inicialmente identificadas por sus propiedades citotóxicas y antitumorales<sup>26</sup>. Es hoy evidente que, además, el TNF estimula la síntesis de PGE<sub>2</sub> y colagenasa en fibroblastos humanos derivados de la piel y la sinovia<sup>27</sup> y Elias et al han demostrado recientemente que este péptido estimula la producción de GAG en los fibroblastos pulmonares humanos<sup>28</sup>.

Aparte de su capacidad efectora demostrada en sistemas experimentales *in vitro*, existen evidencias indicando que el macrófago alveolar está efectivamente activado *in vivo* en condiciones patológicas. Nuestro laboratorio documentó, en modelos animales experimentales, la capacidad del macrófago alveolar de producir, de manera espontánea, el activador del plasminógeno y las interleuquinas 1 y 6 (IL-1 y IL-6)<sup>29-30</sup>. El activador del plasminógeno degrada las glicoproteínas y ciertos componentes de la elastina, causando consiguientemente distorsiones en la matriz extracelular. La IL-1 posee numerosas actividades biológicas, entre ellas la regulación de varias funciones de los fibroblastos<sup>31</sup>. La IL-6 induce una variedad de efectos biológicos, incluyendo la estimulación de hepatocitos para producir proteínas de la fase aguda<sup>32</sup>. Además, los macrófagos alveolares obtenidos de pacientes con "fibrosis pulmonar activa" producen espontáneamente AMDGF *in vitro*<sup>19</sup> y exhiben un incremento en la transcripción y biosíntesis de fibronectina<sup>33</sup>.

Este substancial volumen de información ha conducido a varios investigadores<sup>34, 35</sup> a postular que el macrófago alveolar, activado en el transcurso del proceso inflamatorio, es el elemento central en la cascada de acontecimientos que culminan en el establecimiento de la fibrosis pulmonar. Ciertamente, su pleomórfica capacidad efectora sitúa al macrófago alveolar en posición para atraer, regular y activar otras células, como neutrófilos, linfocitos y fibroblastos, consideradas directamente involucradas en el desarrollo de la fibrosis. Sin embargo, aun cuando todas estas interacciones celulares probablemente ocurren en el transcurso de la inflamación pulmonar, la cuestión es hasta que punto *determinan* el progreso hacia la fibrosis. Es fundamental puntualizar que aunque la inflamación precede a la fibrosis y la fibrosis no ocurre en ausencia de inflamación, la inflamación no conduce necesariamente hacia la fibrosis. Por ejemplo, en el síndrome de distrés respiratorio del adulto y en las neumonías, esto es, situaciones donde existe una extraordinaria inflamación alveolar, la ocurrencia de fibrosis es notablemente infrecuente en los supervivientes<sup>36-38</sup>. El paradigma central consiste en que las citoquinas secretadas por el macrófago alveolar podrían considerarse, no sólo como participantes en el proceso de desarrollo de fibrosis pulmonar, sino también, simplemente, como moléculas esenciales en la orquestación



de los mecanismos de reparación del daño tisular asociado a la inflamación.

Existen en el parénquima pulmonar otras células inflamatorias, además del macrófago alveolar, con capacidad efectora. Por ejemplo, un pequeño pero significativo incremento de eosinófilos ha sido observado en un cierto número de pacientes con fibrosis pulmonar y su presencia se ha asociado a un peor pronóstico de la enfermedad<sup>40</sup>. Asimismo, la hiperplasia de mastocitos ha sido documentada en varios tipos de enfermedades intersticiales difusas, así como en varios modelos experimentales de fibrosis pulmonar<sup>41-44</sup>. A este respecto, cabe señalar que Liechtenstein et al han demostrado que productos liberados, y aún no caracterizados, por los macrófagos alveolares estimulan la liberación de histamina en los mastocitos pulmonares humanos y en los basófilos de la sangre periférica<sup>45</sup>; y nuestro laboratorio ha demostrado que la histamina induce la proliferación de fibroblastos pulmonares humanos a través de receptores H<sub>2</sub><sup>46</sup>. Por otra parte, los fibroblastos pueden fagocitar gránulos secretados por mastocitos y, en este proceso, liberar  $\beta$ -hexosaminidasa y colagenasa, las cuales pueden a su vez alterar la matriz extracelular<sup>47, 48</sup>. Las múltiples interacciones potenciales entre mastocitos y otras células inflamatorias, como linfocitos y macrófagos, han sido revisadas recientemente por Claman<sup>49</sup>. Parece entonces razonable que una hipótesis comprensiva sobre el desarrollo de fibrosis pulmonar incluya las complejas interacciones entre todas estas células inflamatorias y, como se hará aparente posteriormente, las interacciones entre estas células y las parenquimatosas pulmonares.

Un último contrapunto se refiere a la base conceptual desde la que frecuentemente se estudian las interacciones celulares presumiblemente relevantes en la patogénesis de la fibrosis pulmonar. Los sistemas experimentales se diseñan, generalmente, con el propósito de investigar la capacidad de una determinada célula inmuno-efectora o citoquina para activar (o inducir) una función específica del fibroblasto, sea la proliferación o sea la biosíntesis de una determinada proteína extracelular. Esta conceptualización minimiza de hecho la posibilidad de que el fenotipo del fibroblasto pulmonar pueda cambiar, de modo permanente, en el curso de la enfermedad y asume que el fibroblasto es simplemente una célula "diana" sin capacidad efectora propia. Sin embargo, existe actualmente información que argumenta en contra de ambas presunciones.

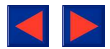
## EL FIBROBLASTO COMO CÉLULA EFECTORA

Un considerable volumen de información ha aparecido recientemente indicando que los fibroblastos y otras células mesenquimatosas son capaces de producir, además de las proteínas que conforman la matriz extracelular, otros péptidos con las características de las citoquinas. Por ejemplo, los *colony-stimulating factors* (CSF's) son glicoproteínas acidófilas con propiedades hematopoyéticas reconocidas tanto *in vivo*

como *in vitro*, por lo que son consideradas como reguladores fisiológicos de la producción de células sanguíneas. En humanos se han caracterizado cuatro CSF's con diferentes especificidad y propiedades físico-químicas: *granulocyte-macrophage-CSF* (GM-CSF), *granulocyte-CSF* (G-CSF), *macrophage-CSF* (M-CSF) y *multi-CSF* o IL-3<sup>50</sup>. En ciertas condiciones, las células endoteliales, las musculares lisas y los linfocitos secretan estas moléculas<sup>51, 52</sup>. Además, se ha demostrado recientemente que fibroblastos derivados de la médula ósea estimulados con IL-1 producen varios factores hematopoyéticos<sup>53</sup>. Asimismo, fibroblastos derivados de la piel producen GM-CSF, M-CSF y G-CSF pero no IL-3, y la estimulación con IL-1 resulta en un incremento substancial en la transcripción y secreción de estos péptidos<sup>54</sup>. Los TNF  $\alpha$  y  $\beta$  también estimulan la liberación tanto de CFS's como de IL-6 en fibroblastos pulmonares humanos<sup>55</sup>. Es hoy aparente que los CSF's no sólo regulan la diferenciación de progenitores de células inflamatorias, sino que también actúan sobre células inflamatorias maduras. Por ejemplo, el GM-CSF ha sido implicado en la proliferación de macrófagos<sup>56</sup> y nuestro laboratorio ha demostrado que el GM-CSF producido por fibroblastos pulmonares humanos mantiene la supervivencia y promueve la activación de eosinófilos humanos *in vitro*<sup>57</sup>.

El *nerve growth factor* (NGF) es una proteína esencial para el desarrollo de los sistemas nerviosos simpático y sensitivo<sup>58, 59</sup>. Aunque el origen celular de esta molécula no se conoce con absoluta certeza, recientes estudios *in vitro* han demostrado que este factor es secretado por una amplia variedad de células, incluyendo los fibroblastos<sup>59</sup>. A pesar de su nombre, el NGF posee numerosas funciones biológicas. Por ejemplo, NGF administrado *in vivo* acelera la cicatrización de heridas<sup>60</sup>. Además, el NGF puede, directa o indirectamente, interaccionar con los mastocitos, ya que aumenta *in vivo* la liberación de histamina por estas células<sup>61, 62</sup>. El NGF también estimula el crecimiento de neuronas y mediadores liberados por estas células, referidos como neuropéptidos, por ejemplo la substancia P y pueden a su vez modular numerosas actividades. Por ejemplo, este neuropéptido estimula la degranulación de mastocitos *in vitro*<sup>63</sup>, así como la liberación de interleucinas 1 y 6 en monocitos<sup>64</sup>. De modo que el NGF, secretado en el transcurso del proceso inflamatorio, podría regular una compleja serie de interacciones celulares incluyendo fibroblastos, mastocitos, nervios y probablemente otras células.

Nuestro laboratorio ha documentado que los fibroblastos pulmonares humanos expresan *in vitro* el gen que codifica la IL-6, y que la estimulación de fibroblastos por citoquinas producidas por monocitos, como la IL-1, regulan la expresión de IL-6 en los fibroblastos<sup>31, 65</sup>. La IL-6, también conocida como *interferon- $\beta$ 2* (IFN- $\beta$ 2), *B-cell stimulating factor-2* (BSF-2), es idéntica al *hepatocyte-stimulating factor* (HSF), denotando su capacidad para estimular hepatocitos para producir proteínas de la fase aguda, como el fibrinógeno y la  $\alpha_1$ -antitripsina entre otros. La noción



de que la IL-6 es una hormona que conecta el pulmón con el hígado es atractiva y quizá podría explicar por qué una enfermedad predominantemente localizada, como es la fibrosis pulmonar, presenta en ocasiones manifestaciones sistémicas. Además, recientes observaciones indican que la IL-6 puede actuar como factor de diferenciación de progenitores de células inflamatorias<sup>66, 67</sup> y, de este modo, contribuir a la regulación o disregulación del proceso inflamatorio a nivel local.

En conjunto, estos estudios demuestran claramente la capacidad efectora de los fibroblastos y su potencial contribución a la creación de un microambiente tisular poderosamente inductivo. Consecuentemente, el estudio de las interacciones celulares, crítico para entender el control de la reacción inflamatoria, debe incluir el examen de la comunicación entre las células clásicamente consideradas inflamatorias con las células estructurales y contemplar la posibilidad de que la expresión (aberrante) de ciertas actividades por las células mesenquimatosas pudiera contribuir a la alteración de esta reacción.

### LA CUESTIÓN DEL FENOTIPO "FIBRÓTICO"

Como ya ha sido indicado anteriormente, la mayoría de estudios que examinan la relación, a un nivel celular, entre inflamación y fibrosis asumen que el fenotipo del fibroblasto pulmonar normal es homogéneo y que la evolución hacia la fibrosis resultaría de la estimulación (inducción) de estos fibroblastos a expresar actividades, como incrementos en proliferación y síntesis de colágeno, consistentes con fibrosis. Nuestro laboratorio está interesado en examinar la cuestión de si existen en el pulmón fibroblastos que expresan genuinamente un fenotipo "fibrótico" y, en este caso, de si su prevalencia en el pulmón de pacientes con fibrosis pulmonar está aumentada. En el curso de estos estudios observamos que la capacidad proliferativa de los fibroblastos obtenidos de pacientes con fibrosis pulmonar activa (fibroblastos "fibróticos") era superior a la de los fibroblastos pulmonares de adultos, y similar a la de fibroblastos derivados de pulmones de recién nacidos. El análisis de líneas clonales de fibroblastos desveló una marcada heterogeneidad en las características proliferativas de estas líneas clonales, independiente del origen; sin embargo, los cultivos de fibroblastos "fibróticos" y de recién nacidos contenían, comparativamente, una proporción superior de clonas que exhibían niveles de proliferación particularmente elevados<sup>68, 69</sup>. Es decir, estas observaciones ilustraron primero que los fibroblastos "fibróticos", así como los neonatales, exhiben una característica fenotípica diferencial incluso aislados de su ambiente habitual *in vivo*, y segundo, que existe heterogeneidad entre fibroblastos.

En el curso de estos estudios también observamos que los fibroblastos neonatales y, en menor medida, los fibroblastos "fibróticos" poseían la capacidad de proliferar *in vitro* en condiciones de mínima estimulación con mitógenos exógenos. Esta observación sugirió la

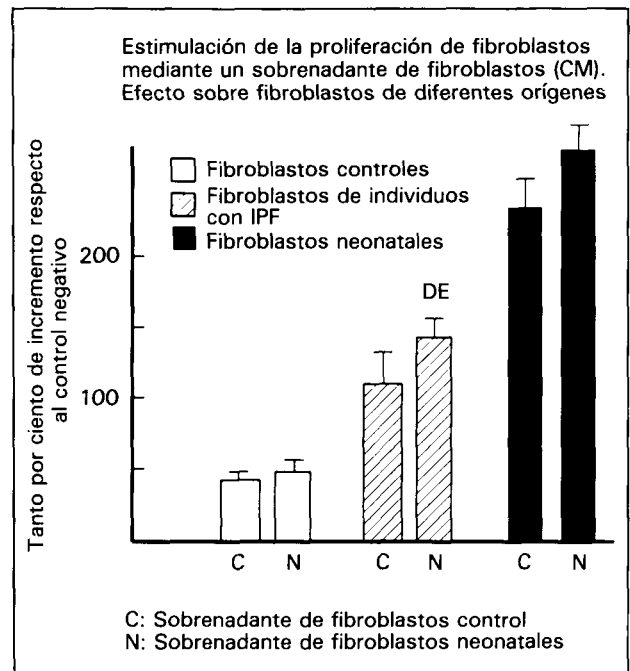
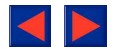


Fig. 1. Efecto del sobrenadante de fibroblastos (CM) en la proliferación de fibroblastos de diferentes orígenes. Barras abiertas: fibroblastos normales de adulto. Barras rayadas: fibroblastos derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (IPF). Barras sólidas: fibroblastos normales neonatales. C representa sobrenadante generado por fibroblastos normales de adulto. N representa sobrenadante de fibroblastos neonatales. Nótese que fibroblastos neonatales y fibróticos muestran una respuesta proliferativa superior a cualquiera de los otros dos sobrenadantes.

posibilidad de que estas células secretaran, de manera autocrina, sus propios factores de crecimiento o, alternativamente, de que exhibieran una hiperrespuesta a cualquier mitógeno. Recientemente, hemos examinado el efecto de sobrenadantes de fibroblastos en la proliferación de fibroblastos. Como se observa en la figura 1, todos los sobrenadantes examinados estimulan la proliferación de fibroblastos. Sin embargo, existen diferencias notables en la respuesta dependiendo del tipo de fibroblasto usado como "diana". Así, los fibroblastos "fibróticos" y los neonatales claramente responden más, en comparación a los fibroblastos pulmonares normales de adultos<sup>70</sup>. La razón de esta respuesta diferencial puede estar a nivel de los receptores que interaccionan con la molécula que específicamente induce el efecto, o bien a nivel intracelular y en relación al modo de operar de moléculas denominadas "segundos mensajeros".

El concepto de regulación autocrina de células mesenquimatosas no es nuevo. Clemmons demostró que tanto las células musculares lisas de cerdo como los fibroblastos humanos producen y responden a IGF-1<sup>71, 72</sup>. Asimismo, Seifert et al demostraron que células musculares lisas derivadas de la aorta de ratas recién nacidas, pero no de ratas adultas, producían una molécula de características similares a PDGF<sup>73</sup>. Además, Majesty et al han documentado que, aunque el gen que codifica la cadena A de la molécula PDGF es expresado en la aorta intacta tanto en ratas adultas



como en recién nacidas a un bajo nivel, el nivel de expresión de mRNA específico para PDGF-A, cuando estas células son aisladas y cultivadas, aumenta marcadamente sólo en aquellas células derivadas de animales recién nacidos<sup>74</sup>. Estas observaciones sugieren que existe un fenotipo específicamente neonatal, el cual podría estar reprimido en circunstancias normales *in vivo*. En este sentido, es interesante la observación de Libby et al, de que células musculares lisas obtenidas de placas ateromatosas no sólo expresan espontáneamente el gen para la cadena A de la molécula PDGF, sino que también secretan la proteína<sup>75</sup>. Una discusión exhaustiva de la noción de que “enfermedad” podría estar relacionada a la emergencia de células con características similares a *stem-like cells* escapa al propósito de esta revisión. Sin embargo, la información presentada en los párrafos precedentes claramente indica que las células estructurales pueden secretar moléculas capaces de autorregular su propia proliferación, que esta actividad parece regulada durante el proceso de desarrollo y que podría reexpresarse en condiciones patológicas.

Al examinar, por medio de cDNA *probes* humanas, el nivel de expresión de colágeno en nuestras líneas primarias de fibroblastos encontramos que los fibroblastos derivados de tejidos fibróticos expresan niveles más elevados, comparados con fibroblastos control, de mRNA específico para procolágenos I y III sin, no obstante, diferencias apreciables en la relación entre tipos I/III<sup>76</sup>. El fenotipo clonal también evidenció, en cuanto a la expresión del colágeno, heterogeneidad en términos cuantitativos. Estos resultados no son en realidad sorprendentes dado que las observaciones de naturaleza similar, tanto *in vitro* como *in situ*, se han documentado en fibroblastos de piel derivados de pacientes con esclerodermia<sup>77-80</sup>. El metabolismo del colágeno es un proceso complejo y dinámico que incluye una serie de mecanismos de “retro-alimentación” intra y extracelulares<sup>81</sup>. Una paradoja interesante del metabolismo del colágeno en los fibroblastos es que, estas células, además de producir colágeno, sintetizan y exportan colagenasa, que es una enzima responsable de la desestructuración del colágeno, así como un inhibidor de esta enzima. De modo que la cantidad de colágeno que es efectivamente depositada en el espacio extracelular es el balance entre estos varios mecanismos. Como demuestra la figura 2, los fibroblastos derivados del tejido fibrótico, no sólo expresan más colágeno, sino que también expresan menos colagenasa en comparación con los fibroblastos control. Estas diferencias son consistentes con la observación de Selman et al, de que especímenes tisulares obtenidos de pacientes con fibrosis pulmonar muestran una menor actividad colagenolítica<sup>82</sup>. También son compatibles con la observación de Pérez-Tamayo et al, de una menor actividad colagenolítica en la fibrosis hepática inducida en animales de experimentación<sup>83</sup>. En conjunto, estas observaciones indican que existen al menos tres mecanismos, quizás independientes, que podrían contribuir al aumento en el depósito de colágeno intersticial que ca-

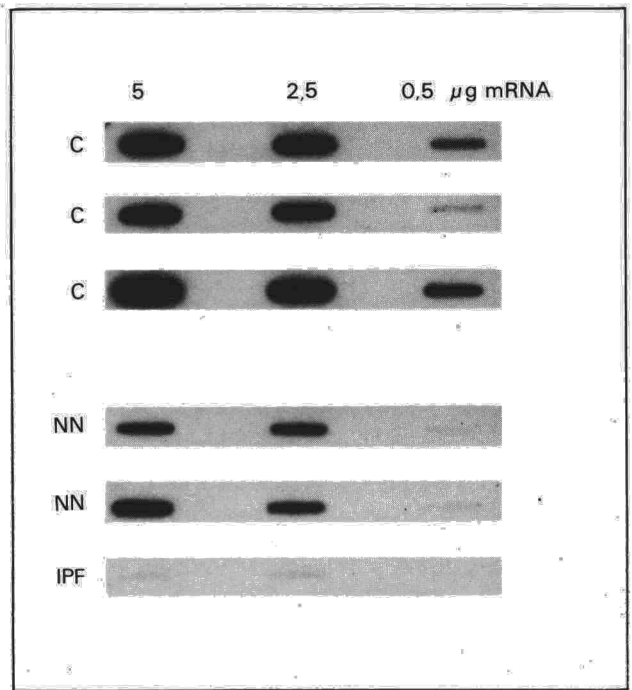


Fig. 2. Expresión del gen de la colagenasa en diversas líneas de fibroblastos pulmonares humanos. C: fibroblastos normales de adulto (control), NN: fibroblastos normales neonatales, IPF: fibroblastos derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. El nivel de expresión de este gen en fibroblastos NN es, en comparación a fibroblastos C, claramente inferior. El nivel de expresión del gen de la colagenasa en fibroblastos IPF es marcadamente bajo.

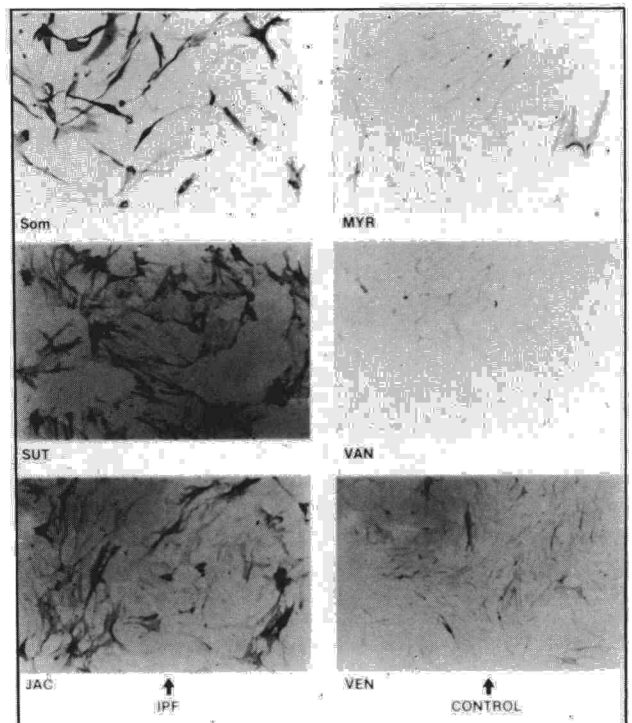


Fig. 3. Inmunohistología de fibroblastos pulmonares humanos con anticuerpos anti  $\alpha$ -actina de músculo liso. MYR, VAN y VEN representan tres líneas de fibroblastos normales de adulto (control). SOM, SUT y JAC representan tres líneas de fibroblastos derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (IPF). Nótese la mayor proporción de células teñidas con el anticuerpo en las preparaciones de fibroblastos IPF.



racteriza a la fibrosis pulmonar: a) aumento en el número de células productoras de colágeno, b) aumento en la producción de colágeno por célula y c) disminución en la desestructuración de colágeno.

Finalmente, en colaboración con el Dr. R. Low de la Universidad de Rochester en Vermont, hemos examinado las características de las moléculas del citoesqueleto sintetizadas por los fibroblastos. Tal como ilustra la figura 3, las preparaciones de fibroblastos derivados de tejido fibrótico parecen contener un mayor número de células teñidas con anticuerpos anti- $\alpha$  actina del músculo liso, así como con anti-miosina, demostrando la presencia de fibras de actina y miosina en estas células. Estos hallazgos son similares a aquellos observados en fibroblastos de rata obtenidos de animales que fueron expuestos a bleomicina<sup>84</sup>, así como a observaciones en tejidos pulmonares obtenidos de pacientes con fibrosis<sup>85</sup>. Las implicaciones de la existencia en el pulmón fibrótico de un mayor número de fibroblastos con características de células musculares lisas es hasta el momento desconocida. Estas células tienen propiedades contráctiles y quizás podrían contribuir a algunas de las aberraciones mecánicas típicas de la fibrosis pulmonar<sup>86</sup>. A este respecto debe recordarse que la correlación entre alteraciones funcionales y contenido de colágeno en el pulmón es relativamente pobre<sup>87</sup>.

El conjunto de las observaciones precedentes indica esencialmente que los fibroblastos, en general, son células con un considerable potencial efector, que los fibroblastos pulmonares humanos son heterogéneos y que los fibroblastos derivados de pacientes con fibrosis pulmonar exhiben *in vitro* características consistentes con la expresión de fibrosis. Estas características se mantienen *in vitro* por períodos de tiempo prolongado y, en consecuencia, definen un fenotipo estable. La cuestión es cómo y por qué aparece este fenotipo. Es improbable, aunque posible, que la expresión de este fenotipo sea debida a la inducción directa mediada por citoquinas liberadas por células inflamatorias, porque los fibroblastos, así como otras células estructurales, son células terminalmente diferenciadas. El hecho de que los fibroblastos pulmonares son heterogéneos proporciona un escenario apropiado para considerar el concepto de selección clonal<sup>68,88</sup>; es decir la expansión, bajo condiciones de presión apropiadas, de poblaciones de células con determinadas características fenotípicas.

## INFLAMACIÓN Y FIBROSIS. NUEVAS CONSIDERACIONES

La fibrosis pulmonar representa una alteración estructural del pulmón de una magnitud tal que produce enfermedad (disfunción). Tan pronto como el pulmón, o cualquier otro órgano, es dañado, se inician mecanismos de reparación, y es muy probable que factores de crecimiento específicos (citoquinas) jueguen un papel central en la orquestación de estos mecanismos. Estos factores atraen fibroblastos hacia las zonas

dañadas y estimulan a estas células a proliferar y sintetizar proteínas de la matriz extracelular a fin de articular el proceso de re-estructuración. El número de citoquinas identificado hasta la fecha es considerable. La cuestión hoy no es cuál de ellas es la más importante. Todas estas señales forman parte de un sistema de comunicación y, tal como han puntualizado Sporn y Roberts<sup>89</sup>, son como los símbolos individuales de un alfabeto. Una palabra, es decir un mensaje, es la combinación adecuada de varias letras.

Es preciso reconocer que, en la mayoría de las ocasiones, el mensaje generado durante el diálogo inflamatorio es "reparación". ¿Cómo, entonces, ocurre la fibrosis? El pulmón fibrótico se asemeja marcadamente a un órgano "supercatrizado", sugiriendo que la fibrosis podría visualizarse como un proceso de reparación "excesivo" probablemente como resultado de la inflamación continuada. Se ha sugerido que la formación de inmunocomplejos podría contribuir a una "activación permanente" de los macrófagos alveolares, y así a una perpetuación de la inflamación<sup>34</sup>. A este respecto, la presencia de inmunocomplejos, tanto en sangre como en el lavado broncoalveolar, en pacientes con fibrosis pulmonar asociada a alveolitis de "alta intensidad" ha sido documentada<sup>90,91</sup>. También se ha observado que los macrófagos alveolares aislados de pacientes con fibrosis pulmonar contienen fluorescencia granular intracitoplasmática para IgG, indicando la fagocitosis de inmunocomplejos de IgG por estas células<sup>91</sup>. Sin embargo, estos estudios proceden de pacientes altamente seleccionados. Más aun, la relación entre fagocitosis de inmunocomplejos por macrófagos alveolares y secreción de citoquinas, así como la prevalencia de este fenómeno para el desarrollo de fibrosis pulmonar no han sido, hasta la fecha, suficientemente examinados.

En base a la información presentada en los párrafos precedentes es posible considerar una hipótesis alternativa. Las células estructurales como los fibroblastos, las células epiteliales y endoteliales, así como las musculares lisas, poseen una capacidad efectora considerable; estas células son las más abundantes y omnipresentes en cualquier órgano. De modo que, los péptidos secretados por estas células, junto a aquellos secretados por las células inmuno-inflamatorias, fácilmente alcanzarían concentraciones elevadas en el microambiente tisular. Algunos de estos péptidos interaccionan, de manera autocrina y paracrina, con las propias células estructurales. Otros tienen la capacidad de interaccionar con las células inflamatorias, regulando su supervivencia, proliferación y activación, así como la diferenciación *in situ* de progenitores inflamatorios. Es plausible argumentar que el origen del "descontrol" del continuum inflamación-reparación se encuentra en la sobresaturación del microambiente por péptidos con potentes actividades biológicas. Una cuestión de importancia central es en qué condiciones las células estructurales ejercen su potencial efector de manera aberrante. El hecho de que las citoquinas secretadas por las células inflamatorias estimulan la actividad efectora de las células



estructurales es importante porque ello podría representar una enorme amplificación de la respuesta inflamatoria, pero probablemente no es suficiente para alcanzar el "punto de ruptura" entre reparación y fibrosis. Es concebible que la presencia de inflamación crónica, o de daño tisular prolongado, permitiera la emergencia, a partir de un *pool* heterogéneo, de células estructurales con determinadas características fenotípicas, incluyendo la expresión espontánea de su potencial efector.

Un importante elemento en el sistema de comunicación microambiental que, por razones de espacio, no hemos discutido en esta revisión la matriz extracelular. Esta estructura posee, además de una función de soporte, una considerable dinamicidad y es ciertamente capaz de regular una variedad de funciones en las células de su entorno inmediato<sup>92,93</sup>. Su localización estratégica y sus propiedades físico-químicas claramente le permiten influir en las vías de comunicación intercelular, y es hoy aparente que existen intrincadas interacciones entre fibroblastos y citoquinas secretadas por células inflamatorias y componentes de la matriz extracelular. Por una parte, existe evidencia de que ciertas funciones mediadas por citoquinas, por ejemplo GM-CSF, están moduladas por como este péptido es "atrapado" en la matriz extracelular<sup>94</sup>. Por otra parte, los fibroblastos poseen receptores específicos para varias proteínas extracelulares y están íntimamente relacionados con esta matriz. Una posibilidad intrigante sería que la matriz extracelular ejerciera, en condiciones normales, un papel de control (represivo) sobre los fibroblastos, que podría contribuir al bajo "recambio" de estas células *in vivo*<sup>95</sup>. En el curso del daño tisular prolongado secundario a la inflamación, y consiguiente disrupción de la matriz extracelular y su capacidad de control, subpoblaciones de células con características fenotípicas específicas podrían emerger y eventualmente prevalecer. Se requiere un análisis detallado de la interacción entre fibroblastos y matriz, así como un examen con marcadores apropiados *in vitro* e *in vivo* de tejidos normales y fibróticos, para la evaluación adecuada de esta hipótesis.

## EPÍLOGO

En nuestra opinión, la cuestión central para entender la patogenia de la fibrosis pulmonar, así como de otras enfermedades inflamatorias crónicas, requiere desvelar los mecanismos que controlan el microambiente tisular. Ello exige diseccionar con precisión el sistema de comunicación entre las células inflamatorias y las células estructurales, y entre éstas y la matriz extracelular. Este sistema es extraordinariamente complejo y, hasta hoy, sólo se ha descifrado una mínima parte de su *modus operandi*. Es aparente que la instrucción final que una célula recibe depende de cómo es articulado el mensaje, en cuanto al número de citoquinas participantes, su secuencia de acción y el modo en que son presentadas<sup>94,96,97</sup>. En este sentido, "enferme-

dad" puede concebirse como un problema de comunicación molecular.

Una parte muy considerable de los estudios a que hemos aludido aquí están basados en sistemas experimentales *in vitro*. Este tipo de estudios simplemente nos informa de la capacidad de una célula determinada para desempeñar una función específica; y esta información es altamente valiosa. Sin embargo, la extrapolación de esta información a situaciones *in vivo* debe ejercerse con suma cautela. Afortunadamente, existen hoy técnicas que permiten examinar cuestiones básicas directamente en el tejido (*in situ*) y existen pocas dudas que en un futuro inmediato dispondremos de estudios describiendo, en tejidos normales y patológicos, el espectro de actividades moleculares de numerosas células. Es asimismo predecible la aparición, en un próximo futuro, de estudios que examinen la capacidad de intervenciones específicas, como antagonistas o anticuerpos contra determinadas citoquinas, para controlar la progresión, a menudo letal, de la fibrosis pulmonar.

## UNA ÚLTIMA PALABRA

La evolución del ser humano ha conllevado un precio biológico considerable. Cuando una rana pierde una extremidad, ésta se regenera en su totalidad. Los humanos, como otros animales de estirpe filogenética superior, han perdido, o reprimido, el aparato genético requerido para la *regeneración* de órganos; poseen, en su lugar, sólo mecanismos de *reparación*. Estos mecanismos son eficaces frente a agresiones tisulares moderadas. Sin embargo, son probablemente inadecuados en situaciones de agresión prolongada asociadas a considerable destrucción tisular. Tal como sugirió Shmuel Shoshan<sup>98</sup>, la fibrosis podría ser no más que la segunda mejor solución, y la única posible, al problema creado por la disrupción de la integridad tisular, por cuanto la alternativa es la muerte.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. J. Bienenstock sus valiosos comentarios durante la preparación de este trabajo. Los estudios procedentes de nuestro laboratorio citados en este manuscrito fueron subvencionados por el Medical Research Council of Canada y el Council for Tobacco Research Inc. USA. M.J. Está parcialmente subvencionado por la Parker B. Francis Foundation, USA; y A.X. por becas del Hospital Clinic i Provincial de Barcelona, FISS (88/2331) y SEPAR.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Adamson IY, Bowden DH. Endothelial injury and repair radiation-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1983; 112:224-230.
2. Snider GL, Hayes JA et al. Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal bleomycin: pathology and serology. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117:1.099-1.108.



3. Smith P, Heath D et al. The pathogenesis and structure of paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats. *J Pathol* 1974; 114:57-67.
5. Katzenstein AL. Pathogenesis of "fibrosis" in interstitial pneumonia: An electronmicroscopy study. *Hum Pathol* 1985; 16:1.015-1.024.
6. Raghu G, Striker L et al. Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131:182-189.
7. Starcher BC, Kuhn C et al. Increased elastin and collagen content of the lungs of hamsters receiving an intratracheal injection of bleomycin. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117:299-305.
8. Kavilinsky JB, Glycosaminoglicans in emphysematous and fibrotic hamster lungs. *Am Rev Respir Dis* 1982; 125:85-86.
9. Thrall RS, Barton RW et al. Differential cellular analysis of bronchoalveolar lavage fluid obtained at various stages during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126:488-492.
10. Fassel E. Pathogenesis of pulmonary fibrosis induced by chrysotile asbestos. Longitudinal light and electron microscopic studies on the rat model. *Virchows Archiv A* 1986; 408:329-346.
11. Haschek WM, Kelen-Szanto AJP et al. Long-term morphologic and biochemical features of experimentally-induced lung fibrosis in the mouse. *Lab Invest* 1982; 46:438-449.
12. Fukuda Y, Ferrans VJ et al. Patterns of pulmonary structural remodelling following experimental paraquat toxicity: the morphogenesis of intraalveolar fibrosis. *Am J Pathol* 1985; 118:452-475.
13. Brown CF, Prath PC et al. Characterization of pulmonary cellular influx differentials to known toxic agents between species. *Inflammation* 1982; 6:327-341.
14. Somayajulu RSN, Mukherjee S et al. Pulmonary oxygen toxicity in chickens and rabbits. *Undersea Biomed* 1978; 5:1-7.
15. Du Bois RM. The alveolar macrophage. *Thorax* 1985; 40:321-327.
16. Fels AO, Cohn ZA. The alveolar macrophage. *J Appl Physiol* 1986; 60:353-369.
17. Mensing H, Czarnetzki BM. Leukotriene B4 induces *in vitro* fibroblast chemotaxis. *J Invest Dermat* 1984; 82:9-12.
18. Campbell EJ, Senior RM et al. Extracellular matrix injury during lung inflammation. *Chest* 1987; 92:161-167.
19. Bitterman PB, Rennard SI et al. Human alveolar macrophage growth factor for fibroblasts: regulation and partial characterization. *J Clin Invest* 1982; 70:806-822.
20. Seppa H, Grotendorst G et al. Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. *J Cell Biol* 1982; 92:584-588.
21. Bauer EA, Cooper TW et al. Stimulation of *in vitro* human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:4.152-4.156.
22. Sporn MB, Roberts AB et al. Transforming growth factor  $\beta$ : biological function and chemical structure. *Science* 1986; 233:532-534.
23. Postlethwaite AE, Keski-Oja et al. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor  $\beta$ . *J Exp Med* 1987; 165:251-256.
24. Varga J, Rosenbloom J et al. Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNA's in normal human dermal fibroblasts. *Biochem* 1987; 247:597-604.
25. Roberts CJ, Birkenmeir TM et al. Transforming growth factor  $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and of both subunits of the human fibronectin receptor for cultured human lung fibroblasts. *J Biol Chem* 1988; 236:4.585-4.592.
26. Sugarman BJ, Aggarwal BB et al. Recombinant human tumor necrosis factor  $\alpha$ . Effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. *Science (Wash. DC)* 1985; 280:943-945.
27. Dayer JM, Beutler B et al. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E<sub>2</sub> production for human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985; 162:2.163-2.168.
28. Elias JA, Krol RC et al. Regulation of human lung fibroblast glycosaminoglycan production by recombinant interferon, tumor necrosis factor and lymphotoxin. *J Clin Invest* 1988; 82:325-333.
29. Lamontagne LR, Gauldie J et al. *In vivo* initiation of unstimulated *in vitro* interleukin-1 release by alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131:326-330.
30. Jordana M, Richards C et al. Spontaneous *in vitro* release of alveolar macrophage cytokines after the intratracheal administration of bleomycin in rats: characterization and kinetic studies. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:1.135-1.140.
31. Dinarello CA. An update on human interleukin-1: from molecular biology to clinical relevance. *J Clin Immunol* 1985; 5:287-296.
32. Gauldie J, Richards C et al. Interferon  $\beta$ 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:7.451-7.455.
33. Yamauchi K, Martinet Y et al. Modulation of fibronectin gene expression in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1987; 80:1.720-1.727.
34. Crystal RG, Bitterman PB et al. Interstitial lung diseases of unknown cause (First of two parts). *N Eng J Med* 1984; 310:154-160.
35. Goldstein RH, Fine A. Fibrotic reactions in the lung: the activation of the lung fibroblast. *Exp Lung Res* 1986; 11:245-261.
36. Elliot CG, Morris AH et al. Pulmonary function and exercise gas exchange in survivors of adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123:492-495.
37. Potgieter PD, Rosenthal E et al. Immediate and long-term survival in patients admitted to a respiratory ICU. *Crit Care Med* 1985; 13:798-802.
38. Yahav J, Lieberman P et al. Pulmonary function following the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 1978; 74:247-250.
39. Rotman HH, Lavelle TF et al. Long-term physiologic consequences of the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 1977; 72:190-192.
40. Peterson MW, Monick M et al. Prognostic role of eosinophils in pulmonary fibrosis. *Chest* 1987; 92:51-56.
41. Kawanami O, Ferrans VJ et al. Ultrastructure of pulmonary mast cells in patients with fibrotic lung disorders. *Lab Invest* 1979; 40:717-734.
42. Goto T, Befus DA et al. Mast cell heterogeneity and hyperplasia in bleomycin-induced pulmonary fibrosis of rats. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:797-802.
43. Wagner MMF, Edwards RE et al. Mast cells and inhalation of asbestos in rats. *Thorax* 1984; 39:539-544.
44. Watanabe S, Watanabe K et al. Mast cells in the rat alveolar septa undergoing fibrosis after ionising radiation. *Lab Invest* 1974; 31:555-561.
45. Schulman ES, Liu MC et al. Human lung macrophages induce histamine release from basophils and mast cells. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131:230-235.
46. Jordana M, Befus AD et al. Effect of histamine on proliferation of normal human adult lung fibroblasts. *Thorax* 1988; 43:552-558.
47. Atkins FM, Metcalfe DD. Degradation of the heparin matrix of mast cells granules by cultures fibroblasts. *J Immunol* 1983; 131:1.420-1.425.
48. Pilarisetti V, Subba Rao et al. Phagocytosis of mast cell granules by cultured fibroblasts. *J Immunol* 1982; 130:341-349.
49. Claman HN. Mast cells, T cells and abnormal fibrosis. *Immunology Today* 1985; 6:192-195.
50. Metclaf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 1986; 67:257-267.
51. Bagby GC, McCall et al. A monokine regulates CSA production by vascular endothelial cells. *Blood* 1983; 62:663-668.
52. Babby GC, Rigas VD et al. Interaction of lactoferrin, monocytes and T-lymphocytes subsets in the regulation of steady-state granulopoiesis *in vitro*. *J Clin Invest* 1981; 68:56-63.
53. Lee M, Segal GM et al. Interleukin-1 induces human bone marrow-derived fibroblasts to produce multilineage hematopoietic growth factors. *Exp Hematol* 1987; 15:983-988.
54. Kaushansky K, Lin N et al. Interleukin-1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. *J Clin Invest* 1988; 81:92-97.
55. Zucali JR, Broxmeyer HE et al. Recombinant human tumor necrosis factors  $\alpha$  and  $\beta$  stimulate fibroblasts to produce hemopoietic growth factors *in vitro*. *J Immunol* 1988; 140:840-844.
56. Kobzik L, Rose R. Alveolar macrophage response to recombinant colony-stimulating factors. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:A38.
57. Vancheri C, Ohtoshi T, et al. Human lung fibroblast-derived GM-CSF induces survival of peripheral blood eosinophils *in vitro*. *Am J Resp Cell and Mol Biol* 1989; 1:289-295.





58. Bradshaw RA, Young M. Nerve growth factor. Recent developments and perspectives. *Biochem Pharmacol* 1976; 25:1.445-1.448.
59. Li CH (ed). Hormonal proteins and peptides. Vol 12 Academic Press. New York 1984; 1-56.
60. Li AKC, Koroly MJ et al. Nerve growth factor: acceleration of the rate of wound healing in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:4.379-4.381.
61. Bruni A, Bigan E et al. Interaction between nerve growth factor and lysophosphatidylserine on rat peritoneal mast cells. *FEBS Letters* 1982; 138:190-192.
62. Pearce FL, Thompson HL. Some characteristics of histamine secretion from rat peritoneal mast cells stimulated with nerve growth factor. *J Physiol* 1986; 372:379-393.
63. Shanahan F, Denburg J et al. Mast cell heterogeneity effect of neuroenteric peptides on histamine release. *J Immunol* 1985; 135:1.331-1.337.
64. Lotz M, Vaughan JH et al. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 1988; 241:1.218-1.221.
65. Gaudie J, Jordana M et al. The release of interferon  $\beta$ /BSF-2/HSF/IL-6 by the human lung fibroblast mediates the acute-phase response during lung inflammation. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:A49.
66. Chiu CP and Lee F. IL-6 is a differentiation factor for M1 and WEHI-3B myeloid leukemic cells. *J Immunol* 1989; 142:1.909-1.915.
67. Miyaura C, Jin CH et al. Production of interleukin-6 and its relation to the macrophage differentiation of mouse myeloid leukemia cells (M1) treated with differentiation-inducing factor and  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Biochem and Biophys Res Com* 1989; 158:660-666.
68. Jordana M, Schulman J et al. Heterogeneous proliferative characteristics of human adult lung fibroblast lines and clonally derived fibroblasts from control and fibrotic tissue. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:579-584.
69. Irving L, Jordana M et al. Differences in *in vitro* behaviour between neonatal and adult human primary and cloned lung fibroblast lines. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:A66.
70. Jordana M, Schulman J et al. Spontaneous *in vitro* release of growth factors by human lung fibroblasts. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:A49.
71. Clemmons DR, Underwood LE et al. Hormonal control of immunoreactive somatomedin production by cultured human fibroblasts. *J Clin Invest* 1981; 67:10-19.
72. Clemmons DR, Van Wick JJ. Evidence for a functional role of endogenously produced somatomedin-like peptides in the regulation of DNA synthesis in cultured human fibroblast and porcine smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1985; 75:1.914-1.918.
73. Seifert RA, Schwartz SM et al. Developmentally regulated production of platelet-derived growth factor-like molecules. *Nature* 1984; 311:669-671.
74. Majesty MW, Benditt EP et al. Expression and developmental control of platelet-derived growth factor A-chain and B-chain/sis genes in rat aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:1.524-1.528.
75. Libby P, Warner SJC et al. Production of platelet-derived growth factor-like mitogen by smooth muscle cells from human atheroma. *N Eng J Med* 1988; 318:1.493-1.498.
76. McSharry C, Jordana M et al. Procollagen gene expression by primary fibroblast lines derived from control and fibrotic lung tissue in humans. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:A306.
77. Leroy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts *in vitro*. A possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblasts. *J Clin Invest* 1974; 54:880-889.
78. Graves PN, Weiss IK et al. Increased procollagen mRNA levels in scleroderma skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1983; 80:130-132.
79. Scharffetter K, Lankat-Buttgereit B et al. Localization of collagen mRNA in normal and scleroderma skin by *in situ* hybridization. *Eur J Clin Invest* 1988 18:9-17.
50. Veli-Matti K, Sandberg M et al. Identification of fibroblasts responsible for increased collagen production in localized scleroderma by *in situ* hybridization. *J Invest Dermatol* 1988; 90:664-670.
81. Laurent GJ. Lung collagen: more than scaffolding. *Thorax* 1986; 41:418-428.
82. Selman M, Montano M et al. Concentration, biosynthesis and degradation of collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 1986; 41:355-359.
83. Pérez-Tamayo R, Montfort I et al. Collagenolytic activity in experimental cirrhosis of the liver. *Exp Mol Pathol* 1987; 47:300-308.
84. Low RB, Woodcock-Mitchell J et al. Actin content of normal and of bleomycin-fibrotic rat. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129:311-316.
85. Adler KB, Craighead JE et al. Actin-containing cells in human pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1981; 102:427-437.
86. Kapanci Y, Assimakopoulos A et al. Contractile interstitial cells in pulmonary alveolar septa: a possible regulator of ventilation/perfusion ratio?: ultrastructural, immunofluorescence and *in vitro* studies. *J Cell Biol* 1974; 60:375-392.
87. Golstein RH, Lucy EC et al. Failure of mechanical properties in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1979; 120:67-73.
88. Botstein GR, Sherer GK et al. Fibroblast selection in scleroderma: an alternative model of fibrosis. *Arthritis Rheum* 1982; 25:189-195.
89. Sporn MB, Roberts AB. Peptide growth factors and inflammation, tissue repair and cancer. *J Clin Invest* 1986; 78:329-332.
90. Dreising RB, Schwartz ML et al. Circulating immunocomplexes in the idiopathic interstitial pneumonias. *N Eng J Med* 1978; 298:353-357.
91. Hunninghake GW, Gadek JE et al. Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1981; 68:259-269.
92. Reid L, Jefferson D. Cell cultures using extracts of extracellular matrix to study growth and differentiation in mammalian cells. En: *Mammalian Cell Culture*. New York. J. Mather (ed). Plenum 1984; 239-280.
93. Slavkin HC, Greulich RC (eds). Extracellular matrix influence on gene expression. Academic Press. New York 1975.
94. Gordon MY, Riley GP et al. Compartmentalization of a hemopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature* 1987; 326:403-405.
95. Bowden DH. Cell turnover in the lung. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128:545-548.
96. Assoian RK, Grotendorst GR et al. Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets. *Nature* 1984; 309:804-806.
97. Leof EB, Proper JA et al. Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor  $\beta$ : A proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:2.453-2.457.
98. Shoshan Shmuel. Wound healing. *International Rev Conn Tissue Res* 1981; 9:1-27.