



Cribratge biomecànic per a la identificació de potencials dianes en la fibrosi pulmonar

Alicia Giménez Hidalgo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Tesi doctoral

Programa de Doctorat en Biomedicina

Cribratge biomecànic per a la identificació de potencials dianes en la fibrosi pulmonar

Presentada per

Alicia Giménez Hidalgo

per optar al grau de doctor

Treball dirigit per

Jordi Alcaraz Casademunt

A la Unitat de Biofísica i Bioenginyeria

del departament de Ciències Fisiològiques I,

Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

AGRAÏMENTS

Voldria agrair el suport que he rebut per part de tothom amb qui en algun moment o altre he pogut interaccionar al llarg d'aquest temps.

Gràcies Jordi per haver confiat en mi des del primer moment i per la teva capacitat de trobar els aspectes positius i de transmetre entusiasme per la ciència.

També a tots els professors i investigadors de la Unitat de Biofísica i Bioenginyeria i tota l'altra gent de la facultat i l'hospital i d'altres centres de recerca amb qui en algun moment he coincidit per haver compartit els seu coneixement i estar disposats a ajudar-me. Gràcies sobretot a tots els que han sigut els meus companys, incloent tècnics, doctorands, estudiants de màster i visitants pels moments compartits. I especialment a la Marta per ser un gran suport i una gran amiga.

A l'equip de la Plataforma de Genòmica de l'IDIBAPS pels seus serveis i suport tècnic. Moltes gràcies a l'Àlex i al Francesc per ajudar-me amb el disseny i l'anàlisi bioinformàtic i per tot el que ens heu ensenyat.

Per últim, moltes gràcies a tots els membres de la meva família pel seu recolzament incondicional i l'esforç per comprendre. Gràcies Oriol per estar per a escoltar, consolar i empènyer a seguir i per les ganes d'ajudar.

CONTINGUT

CONTINGUT.....	I
FIGURES.....	VII
TAULES	IX
ABREVIACIONS	XI
INTRODUCCIÓ	1
1. ASPECTES MECÀNICS DE LES PATOLOGIES	3
1.1 <i>Característiques mecàniques dels teixits i mecanobiologia</i>	3
1.1.1 La mecanobiologia en la biomedicina	3
1.1.2 Importància de la duresa dels teixits en l'homeòstasi	3
1.2 <i>La mecanobiologia i la mecanotransducció</i>	4
1.2.1 Conceptes bàsics	4
1.2.2 Components de la mecanotransducció	5
1.3 <i>Alteració de la biomecànica i conseqüències patològiques</i>	6
2. LA FIBROSI COM A PARADIGMA DE LA MECÀNICA TISSULAR ALTERADA	8
2.1 <i>La matriu extracel·lular</i>	9
2.1.1 Components de la ECM	9
2.1.2 Metal·loproteïnases de la matriu (MMP)	11
2.2 <i>Els fibroblasts i els miofibroblasts</i>	12
2.3 <i>TGF-β, l'activador del programa fibrogènic</i>	15
3. LA FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA.....	16
3.1 <i>El pulmó</i>	17
3.1.1 Estructura i components dels pulmons	17
3.1.2 La fibrogènesi pulmonar	18
3.1.3 Les propietats mecàniques dels pulmons	19
3.1.4 La mecànica del pulmó fibròtic	19
3.2 <i>La fibrosi pulmonar idiopàtica</i>	20
3.2.1 Epidemiologia	20
3.2.2 Història natural i simptomatologia	20
3.2.3 Diagnòstic i tractament	21
3.2.4 Potencials factors de risc i factors genètics	21
3.2.5 Fisiopatologia de la IPF	22
3.2.6 Possibilitats translacionals dels aspectes mecànics de la IPF	24
3.3 <i>Altres malalties pulmonars fibròtiques</i>	25
3.3.1 Pneumònia organitzativa criptogènica	25
3.3.2 Alveolitis al·lèrgica extrínseca (EAA)	26

4. MODELS PRECLÍNICS EN L'ESTUDI DE LA IPF.....	26
4.1 <i>Models animals</i>	26
4.2 <i>Models de cultiu cel·lular per a simular l'enduriment o canvis en la ECM</i>	27
4.3 <i>Genòmica i perfilat d'alt rendiment de l'expressió gènica</i>	28
4.4 <i>Aproximacions genòmiques a la biomecànica en la fibrosi</i>	30
OBJECTIUS	33
MÈTODES.....	37
1. FIBROBLASTS DE PULMÓ.....	39
1.1 <i>Fibroblasts pulmonars de línia cel·lular</i>	39
1.2 <i>Fibroblasts pulmonars primaris</i>	39
1.3 <i>Cultius cel·lulars</i>	39
2. GELS DE COL·LAGEN 3D.....	39
3. GELS DE POLIACRILAMIDA	40
3.1 <i>Preparació de gels de poliacrilamida</i>	40
3.2 <i>Mesures de microscòpia de força atòmica</i>	41
3.3 <i>Recobriments dels gels amb col·lagen de tipus I</i>	41
3.3.1 <i>Sulfo-SANPAH:</i>	41
3.3.2 <i>NHS-acrilat</i>	42
3.3.3 <i>Acrilamida carregada positivament</i>	42
3.4 <i>Cultiu dels fibroblasts en els gels de poliacrilamida</i>	42
3.5 <i>Inhibició del receptor I de TGF-β</i>	43
3.6 <i>Inhibició de la integrina $\beta 1$</i>	43
4. ZIMOGRAFIA.....	43
5. EXTRACCIÓ D'RNA	43
5.1 <i>Preparació de lisats cel·lulars</i>	43
5.2 <i>Purificació de l'RNA</i>	44
5.3 <i>Control de qualitat i quantificació de l'RNA</i>	44
6. PCR QUANTITATIVA EN TEMPS REAL	44
7. MICROARRAYS D'RNA	45
7.1 <i>Processat dels microarrays</i>	45
7.2 <i>Control de qualitat i anàlisi bioinformàtic</i>	46
8. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNA PER ELISA	46
9. IMMUNOFLUORESCÈNCIA	47

10. ANÀLISI ESTADÍSTIC	47
RESULTATS	49
1. ESTUDI EXPLORATIU DE MARCADORS DEL MICROENTORN EN IPF MITJANÇANT	
GELS 3D DE RIGIDESA VARIABLE	51
1.1 <i>Expressió de components de la matriu extracel·lular fibròtica</i>	51
1.2 <i>Expressió de proteases de la matriu</i>	52
1.3 <i>Nivells i activitat de metal·loproteïnases</i>	53
1.4 <i>Limitacions dels gels de col·lagen de tipus I</i>	54
2. DISSENY D'UNA ESTRATÈGIA DE CRIBRATGE BIOMECÀNIC.....	55
2.1 <i>Definició d'una estratègia general de cribratge biomecànic</i>	55
2.2 <i>Aplicació del cribratge biomecànic a la IPF</i>	56
2.3 <i>Optimització del disseny basat en biomaterials</i>	57
2.3.1 <i>Preparació de gels de poliacrilamida d'una duresa definida</i>	57
2.3.2 <i>Anàlisi qualitatiu de l'optimització del mètode de recobriment dels gels de PAA</i>	58
2.4 <i>Selecció de la plataforma de microarrays</i>	60
2.5 <i>Control de qualitat del RNA</i>	60
3. CRIBRATGE BIOMECÀNIC.....	61
3.1 <i>Normalització, control de qualitat i filtrat</i>	61
3.2 <i>Anàlisi qualitatiu de les possibles mecanorespostes</i>	64
3.3 <i>Anàlisi del mecanotranscriptoma</i>	64
3.3.1 <i>Anàlisi quantitatiu de gens mecanosensibles i que distingeixen classes</i>	64
3.3.2 <i>Relació entre el mecanotranscriptoma i la IPF: anàlisi bibliogràfic</i>	67
3.3.3 <i>Clustering del mecanotranscriptoma</i>	67
3.3.4 <i>Enriquiment de cromosomes en gens sensibles a la rigidesa de la matriu</i>	69
3.3.5 <i>Localització cel·lular de les dianes mecanosensibles</i>	69
3.3.6 <i>Gens regulats per TGF-β</i>	69
3.3.7 <i>Interactoma del mecanotranscriptoma</i>	70
4. SELECCIÓ I VALIDACIÓ DE DIANES POTENCIALS	73
4.1 <i>Validació a nivell de transcrit</i>	73
4.2 <i>Validació a nivell de proteïna</i>	75
4.2.1 <i>DUSP10</i>	75
4.2.2 <i>PAPP-A</i>	76
4.2.3 <i>IGFBP-3</i>	77
5. CARACTERITZACIÓ DE IGFBP-3	77
5.1 <i>L'efecte del TGF-β i l'enduriment extracel·lular en IGFBP-3</i>	77
5.2 <i>Inhibidor del receptor de TGF-β</i>	78

5.3 <i>Integrina beta 1</i>	79
6. CRIBRATGE D'ELEMENTS DE LA ECM INDEPENDENT DE LA BIOMECÀNICA	80
DISCUSSIÓ	83
1. ESTUDI EXPLORATIU DE MARCADORS DEL MICROENTORN EN IPF MITJANÇANT GELS 3D DE RIGIDESA VARIABLE	85
1.1 <i>Una prova pilot en fibroblasts primaris activats en cultius 3D mostra que mecanosensibilitat transcripcional és selectiva i independent del TGF-β1</i>	85
1.2 <i>Limitacions dels cultius 3D en termes de rigidesa extracel·lular</i>	87
2. DISSENY D'UNA ESTRATÈGIA DE CRIBRATGE BIOMECÀNIC	87
3. CRIBRATGE BIOMECÀNIC	89
3.1 <i>Aspectes novedosos del cribratge mecànic en IPF</i>	89
3.2 <i>El cribratge biomecànic és molt més restrictiu que els cribratges convencionals</i>	90
3.3 <i>Potencials mecanismes mecanosensors i mecanotransductors en fibroblasts pulmonars</i>	91
3.4 <i>Els efectes transcripcionals de l'enduriment i del TGF-β1 són majoritàriament independents</i>	91
3.5 <i>L'anàlisi del mecanotranscriptoma mostra xarxes reguladores emergents novedoses en el camp de la mecanobiologia</i>	92
3.5.1 <i>L'interactoma mostra una xarxa reguladora emergent rica en components del citoesquelet d'actina-miosina</i>	92
3.5.2 <i>L'interactoma mostra una xarxa reguladora emergent rica en fosfatases de la família DUSP</i>	92
3.5.3 <i>L'interactoma mostra una xarxa reguladora emergent rica en proteïnes relacionades amb IGF</i>	93
4. SELECCIÓ DE I VALIDACIÓ DE DIANES POTENCIALS	94
5. CARACTERITZACIÓ DE IGFBP-3	95
5.1 <i>L'efecte del TGF-β i de l'enduriment en IGFBP-3 són independents</i>	96
5.2 <i>L'efecte de la duresa en IGFBP-3 requereix la integrina β1</i>	97
5.3 <i>Divisió de tasques entre l'enduriment extracel·lular, la TGF-β1 i altres factors en la sobreexpressió anòmala de IGFBP-3 en IPF</i>	97
6. CRIBRATGE D'ELEMENTS DE LA ECM INDEPENDENT DE LA BIOMECÀNICA	98
CONCLUSIONS.....	101
BIBLIOGRAFIA	105
APÈNDIX I: PROTOCOLS	117
A. CELL CULTURE IN 3D COLLAGEN I GELS	119
B. ZIMOGRAFIA.....	120

C. REAL-TIME PCR WITH TAQMAN® GENE EXPRESSION ASSAYS.....	124
D. PREPARATION AND COATING OF POLYACRYLAMIDE GELS FOR CELL CULTURE.....	127
APÈNDIX II: PUBLICACIONS I COMUNICACIONS	131
PUBLICACIONS	133
COMUNICACIONS A CONGRESSOS	133
ESTADES A LABORATORIS INTERNACIONALS.....	134

FIGURES

Figura 1.	Rang de rigideses fisiològiques de diferents cèl·lules i teixits	4
Figura 2.	Origen dels miofibroblasts.....	13
Figura 3.	La diferenciació dels miofibroblasts	14
Figura 4.	Model de la senyalització de TGF- β	16
Figura 5.	Anatomia del sistema respiratori	17
Figura 6.	Microarquitectura del pulmó	18
Figura 7.	Tinció de α -SMA.....	22
Figura 8.	Representació de la preparació de gels de PAA i el recobriment amb ECM	40
Figura 9.	Sistema de cultiu en gels de PAA.....	42
Figura 10.	Nivells d'expressió de COL1A1.....	52
Figura 11.	Nivells d'expressió de VCAN	52
Figura 12.	Nivells d'expressió de MMP-1	53
Figura 13.	Nivells d'expressió de MMP-2	53
Figura 14.	MMP-2 activa en relació a MMP total.....	54
Figura 15.	Imatges representatives de zimogrames de gelatina.....	54
Figura 16.	Esquema de les estratègies de	55
Figura 17.	Mesures per AFM del mòdul de Young dels gels de PAA	58
Figura 18.	Gel de PAA positiva de 3 kPa amb fractures.....	59
Figura 19.	Distribució d'intensitats dels microarrays	62
Figura 20.	Heatmaps del clustering no supervisat	63
Figura 21.	Possible comportament de l'expressió de les sondes del microarray.....	64
Figura 22.	Exemples de mecanorespostes detectades.....	65
Figura 23.	Distribució de les sondes dins l'univers analitzat	65
Figura 24.	Heatmap del clustering dels gens del mecanotranscriptoma	68
Figura 25.	Distribució dels gens mecanosensibles al llarg dels 23 cromosomes.....	69
Figura 26.	Interactoma segons veïns del mecanotranscriptoma	71
Figura 27.	Expressió dels gens validats.....	73

Figura 28.	Expressió gènica mitjançant microarrays i RT-PCR.....	74
Figura 29.	Correlació en el canvi relatiu en l'expressió	75
Figura 30.	Immunofluorescència de DUSP-10	75
Figura 31.	Nivells de proteïna DUSP10	76
Figura 32.	Nivells de proteïna PAPP-A	76
Figura 33.	Nivells de proteïna IGFBP-3	77
Figura 34.	Nivells de proteïna IGFBP-3 en absència o presència de TGF- β 1	78
Figura 35.	Quocient de l'expressió de IGFBP-3.....	78
Figura 36.	Inhibició del TGF- β RI	79
Figura 37.	Imatges de fibroblasts.....	79
Figura 38.	Efecte de la inhibició específica de la integrina β 1.....	80

TAULES

Taula 1.	Malalties de la mecanobiologia:	7
Taula 2.	Membres de la família de les MMP	11
Taula 3.	Classificació de les ILD	25
Taula 4.	Proporcions d'acrilamida i bis-acrilamida per la preparació de gels de PAA	41
Taula 5.	Sondes Taqman® emprades per a la RT-PCR.....	45
Taula 6.	Característiques de les mostres del cribratge	57
Taula 7.	Resum dels resultats en l'optimització del mètode de recobriment dels gels de PAA	59
Taula 8.	Quantificació i control de qualitat de les mostres de RNA.....	60
Taula 9.	Sondes mecanosensibles	67
Taula 10.	Localització principal de les proteïnes mecanosensibles	69
Taula 11.	Gens mecanosensibles descrits com a regulats per TGF-β1.....	70
Taula 12.	Components del matrisoma alterats a nivell de mRNA en fibroblasts.....	81

ABREVIACIONS

α-SMA	de l'anglès <i>alpha smooth muscle actin</i>
ADC	adenocarcinoma
AFM	de l'anglès <i>atomic force microscopy</i>
ANOVA	anàlisi de la variància
COL1A1	col·lagen 1 α 1
COP	de l'anglès <i>cryptogenic organizing pneumonia</i>
CTGF	de l'anglès <i>connective tissue growth factor</i>
cDNA	de l'anglès <i>complementary desoxyribonuclei acid</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	de l'anglès <i>desoxyribonuclei acid</i>
dNTP	desoxiribonucleòtid difosfat
DUSP	de l'anglès <i>dual specificity phosphatase</i>
EAA	de l'anglès <i>extrinsic allergic alveolitis</i>
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
ELISA	de l'anglès <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ECM	de l'anglès <i>extracellular matrix</i>
ED-A	extra domini A
EMT	de l'anglès <i>epithelial-mesenchymal transition</i>
ERK	de l'anglès <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FBS	de l'anglès <i>fetal bovine serum</i>
FDR	de l'anglès <i>false discovery rate</i>
FGF	de l'anglès <i>fibroblast growth factor</i>
GAG	glicosaminoglicà
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HP	de l'anglès <i>hypersensitivity pneumonitis</i>
ILD	de l'anglès <i>interstitial lung disease</i>
IPF	de l'anglès <i>idiopathic pulmonary fibrosis</i>
IGF	de l'anglès <i>insulin-like growth factor</i>
IGFBP	de l'anglès <i>insulin-like growth factor binding protein</i>
ITS	insulina-transferrina-seleni
JNK	de l'anglès <i>c-Jun-N-terminal kinase</i>
MAPK	de l'anglès <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MMP	de l'anglès <i>matrix metalloproteinase</i>
mRNA	de l'anglès <i>messenger ribonucleic acid</i>
MT-MMP	de l'anglès <i>membrane type-MMP</i>
MYLK	quinasa de la cadena lleugera de la miosina

n.d.	no disponible
NHS	N-hidroxisuccinimidil
n.s.	no significatiu
PAA	poliacrilamida
PAI	de l'anglès <i>plasminogen activator inhibitor</i>
PBS	de l'anglès <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	de l'anglès <i>polymerase chain reaction</i>
PI3K	de l'anglès <i>phosphoinositide 3-kinase</i>
RIN	de l'anglès <i>RNA integrity number</i>
RMA	de l'anglès <i>robust multi-array average</i>
RNA	de l'anglès <i>ribonucleic acid</i>
RT-PCR	de l'anglès <i>real-time PCR, PCR en temps real</i>
SEM	de l'anglès <i>standard error of the mean</i>
SFM	de l'anglès <i>serum free medium</i>
TEMED	tetrametiletildiamina
TGF-β	de l'anglès <i>transforming growth factor beta</i>
TIMP	de l'anglès <i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF-α	de l'anglès <i>tumor necrosis factor</i>
u.a.	unitats arbitràries
UIP	de l'anglès <i>usual interstitial pneumonia</i>
VCAN	versicà

Introducció

1. ASPECTES MECÀNICS DE LES PATOLOGIES

1.1 Característiques mecàniques dels teixits i mecanobiologia

1.1.1 *La mecanobiologia en la biomedicina*

Al segle XIX era un coneixement general el fet que les forces físiques actuen com a reguladors crítics en la biologia. Per exemple la llei de Wolff, del 1892, descrivia com en els animals sans els ossos s'adapten a les càrregues a les que es sotmeten. Així, es sabia que en incrementar la càrrega en un os en particular, aquest es remodelaria amb el temps per esdevenir més fort i resistir aquesta càrrega. I de forma contrària, que quan es redueix la càrrega sobre un os, aquest es tornarà més feble [1].

No obstant, amb la revolució de la biologia molecular i l'aparició de tecnologies com la seqüenciació del genoma o el desenvolupament de la bioinformàtica es va perdre l'interès per la mecànica en l'àmbit de la biomedicina [2]. Les noves aproximacions van donar lloc a grans avenços en el coneixement de la base molecular i cel·lular de moltes patologies [2]. Per això, tradicionalment la recerca biomèdica s'ha basat en la genètica i la biologia molecular, ignorant gairebé per complet la base física de la malaltia.

En conseqüència, en l'actualitat encara es disposa d'un coneixement relativament reduït sobre els mecanismes homeostàtics que mantenen l'elasticitat normal dels teixits i sobre com el seu mal funcionament porta a un enduriment o estovament crònic en els processos patològics [3]. Segurament hi contribueix el fet que les alteracions biomecàniques dels teixits hagin estat tradicionalment considerades com una conseqüència passiva de la malaltia. No obstant, moltes malalties són el resultat de canvis en l'estructura o la mecànica dels teixits.

Nogensmenys, aquesta visió ha començat a canviar en les últimes dues dècades, quan la recerca en el camp de la mecanobiologia s'ha reactivat. A més, ara els metges i fisiòlegs reconeixen de nou la importància de les forces mecàniques en el desenvolupament i la funció de molts òrgans i teixits (cor, pulmons, creixement de la pell i múscul, manteniment de cartílag i os) i en l'etiologia de nombroses malalties [2].

1.1.2 *Importància de la duresa dels teixits en l'homeòstasi*

Actualment està ben establert el fet que en condicions fisiològiques normals, l'organisme conserva la rigidesa característica de cada teixit i cada òrgan per tal que aquests puguin dur a terme les seves funcions específiques. En concordança, els components cel·lulars de cada teixit tenen un rang de rigidesa òptima (Figura 1) [3]. Per exemple, els ossos són molt rígids per a poder sostenir el pes del cos i donar suport als moviments, mentre que els pulmons són tous i elàstics per a poder expandir-se i contraure's cíclicament, permetent els canvis en el volum pulmonar durant la respiració.

La rigidesa dels teixits i de les cèl·lules pot variar, com per exemple en el curs del desenvolupament embrionari o degut a canvis o adaptacions naturals en les funcions dels òrgans [3]. A més, les propietats

físiques també es poden veure compromeses transitòriament, per exemple quan s’hi produeix un dany. Amb el temps, però, els mecanismes fisiològics de reparació retornen l’elasticitat i la funció normals als teixits un cop acaba la reparació del dany. No obstant, els ossos dels malalts d’osteoporosi es tornen permanentment tous i fràgils [4], mentre que els pulmons que presenten creixements tumorals o lesions fibròtiques exhibeixen un enduriment sostingut [5, 6]. Aquests són alguns exemples d’entre nombroses malalties en que la duresa normal dels teixits es veu compromesa crònicament, de forma que els teixits esdevenen massa rígids o massa tous [3].

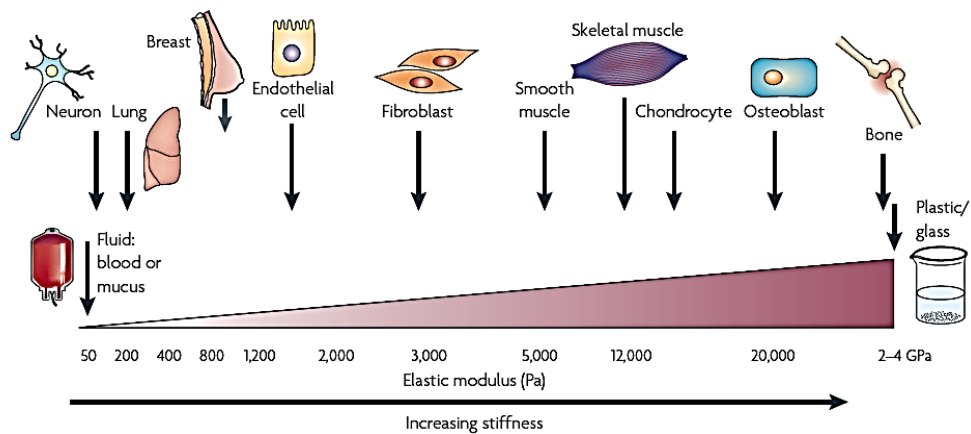


Figura 1. Rang de rigideses fisiològiques de diferents cèl·lules i teixits necessàries per mantenir l’homeòstasi. Adaptat de [3].

1.2 La mecanobiologia i la mecanotransducció

1.2.1 Conceptes bàsics

La supervivència de tots els organismes, des dels bacteris més simples fins als humans, es basa en la seva capacitat de respondre a les pressions ambientals, incloent-hi les forces mecàniques [7]. Les cèl·lules que es troben formant part dels teixits estan subjectes a una gran quantitat de forces a través d’interaccions dinàmiques amb la matriu extracel·lular (ECM) i amb les cèl·lules veïnes [3]. Aquestes forces exerceixen un gran efecte en el comportament cel·lular i contribueixen a donar forma als teixits, així com al seu desenvolupament i manteniment [2, 3, 7]. Nombrosos estudis de la passada dècada han demostrat que la rigidesa de la matriu controla molts processos cel·lulars, com ara el destí de les cèl·lules mare [8], la diferenciació cel·lular [9], l’angiògenesis [10] i la morfògenesis [11].

La mecanobiologia és la disciplina que intenta entendre com les forces mecàniques interactuen amb els processos biològics per a controlar les funcions cel·lulars. La mecanotransducció és el procés pel qual les cèl·lules detecten les senyals mecàniques del seu entorn (ECM, cèl·lules adjacents o forces externes) i hi responen. En la mecanotransducció els senyals mecànics es detecten i s’activen rutes intracel·lulars de senyalització bioquímica [7].

1.2.2 Components de la mecanotransducció

Els elements que medien la transducció de les senyals mecàniques són per una banda les molècules de la matriu extracel·lular i per una altra banda les cèl·lules, a través dels receptors transmembrana (com les integrines), les estructures citosquelètiques i altres components de transducció de senyal [2].

Matriu extracel·lular

La ECM proporciona la bastida que dona suport físic a les cèl·lules dins dels teixits i òrgans i que a més regula la senyalització bioquímica i biomecànica intercel·lular. Els components moleculars de la ECM inclouen col·làgens, elastines, proteoglicans i laminines. Les propietats mecàniques de la ECM contribueixen significativament a la resposta de mecanotransducció i a les funcions cel·lulars [2]. L'alteració d'aquesta xarxa resulta en una pèrdua de l'homeòstasi de les cèl·lules i els teixits i porta a un gran nombre de malalties [7].

Cèl·lules

Les cèl·lules proporcionen rigidesa als teixits i tenen la capacitat de detectar forces i respondre-hi. Els principals components cel·lulars implicats en els mecanismes de mecanotransducció inclouen les integrines i el citosquelet (principalment els filaments d'actina-miosina), així com altres molècules de transducció de senyal com les proteïnes G, tirosina quinases de receptors, quinases activades per mitògens (MAPK) i canals iònics activats per tensió [12].

Les cèl·lules s'adhereixen a la ECM a través de la unió a receptors de membrana específics. Els receptors de ECM més ubics i ben caracteritzats són les integrines [2].

Integrines

Les integrines són els principals receptors d'adhesió cel·lular. Aquesta família de proteïnes transmembrana consta de 18 subunitats alfa i 8 subunitats beta, les quals es combinen en 24 receptors heterodimèrics [13]. La seva especificitat d'unio depèn de l'aparellament de les seves subunitats alfa i beta unides de manera no covalent [2].

La porció externa dels receptors s'uneix a seqüències en les molècules de la ECM, mentre que els dominis intracel·lulars s'associen físicament amb proteïnes del citosquelet, formant així un pont entre la ECM i el citosquelet [2, 14]. Les integrines poden agrupar-se en complexos d'ancoratge especialitzats, coneguts com a adhesions focals [2, 14]. Per establir contactes amb la ECM, les integrines en la superfície de les cèl·lules s'han d'activar, el que implica canvis de conformació. Aleshores s'uneixen als lligands de la ECM per acabar formant adhesions focals, el que implica l'agregació de diversos tipus d'integrines i el reclutament de proteïnes adaptadores que connecten amb les fibres d'estress d'actina. En aquest context cal destacar que les forces s'han identificat com una senyal important per a la maduració i el manteniment d'aquestes adhesions [15].

Les integrines proporcionen un lloc preferencial per la transmissió de senyals mecàniques a través de la superfície cel·lular, funcionant com a mecanoreceptors. Quan s'apliquen forces externes a les

integrines, es produeixen canvis locals en la transducció de la senyal bioquímica. Així, aquests receptors poden detectar els estressos mecànics aplicats a la superfície cel·lular i transmetre la senyal cap al citosquelet mitjançant vies moleculars específiques, per a acabar mitjançant canvis en el comportament cel·lular com l'adhesió, migració, proliferació, diferenciació i apoptosi [2, 16].

Citosquelet

El citosquelet és una bastida formada per fibres polimèriques que ocupen l'interior de les cèl·lules i que proporciona estabilitat a la seva forma [2, 17]. Està compostat per tres tipus diferents de filaments: microfilaments, microtúbuls i filaments intermedis. Totes les cèl·lules generen forces tensionals a través dels filaments d'actomiosina del citosquelet. Aquestes forces s'equilibren amb les adhesions a la ECM i a les cèl·lules veïnes i als altres filaments [2].

Els canvis en les forces a la microescala que alteren l'equilibri de forces del citosquelet i modulen la forma cel·lular controlen comportaments cel·lulars complexos que són crítics pel desenvolupament i l'homeòstasi dels teixits. La proliferació cel·lular, la polaritat i la motilitat, contractilitat i la mort cel·lular poden ser influïts per les distorsions físiques de les cèl·lules. Nombrosos estudis han revelat que les característiques físiques del substrat i el grau de distorsió de les cèl·lules governen el seu comportament independentment de les citoquines i altres factors reguladors solubles presents [2]. En el cas de les cèl·lules adherents, les forces aplicades a la macroescala també resulten en canvis en la mecànica de la ECM i del citosquelet a la microescala [2].

1.3 Alteració de la biomecànica i conseqüències patològiques

L'alteració en la biomecànica dels teixits es pot donar en diverses circumstàncies normals i patològiques i pot ser deguda a diversos factors [2]. Per una banda pot resultar de canvis en les forces a nivell cel·lular i també de variacions en l'estructura i les propietats mecàniques de la ECM [2]. Per altra banda, hi pot haver una desregulació dels mecanismes moleculars pels que les cèl·lules detecten les senyals mecàniques i les converteixen en una resposta química (mecanotransducció) [2].

Aquestes alteracions en la duresa dels teixits i en la mecanotransducció de les cèl·lules tenen uns efectes cada cop més ben coneguts, tant sobre les cèl·lules com en el seu microentorn i per tant tenen repercussió en tots els elements dels teixits i en el seu funcionament global. La rigidesa patològica d'un teixit pot, per exemple, potenciar el fenotip maligne de les cèl·lules canceroses [5] i promoure un microambient pro-fibròtic i pro-escleròtic en fibroblasts [6].

Canvis en l'estructura de la ECM que afecten a la mecànica dels teixits i proporciona un estímul constitutiu per al creixement cel·lular poden fins i tot contribuir a l'inici i la progressió del càncer. A més, l'acumulació d'una ECM amb propietats biomecàniques anòmales contribueix al desenvolupament d'una mecànica tissular anormal la qual pot pertorbar la funció de l'òrgan [2].

La base física de moltes malalties pot ser el producte per una banda d'una alteració en l'homeòstasi tensional, la qual pot resultar de perturbacions de les forces i les propietats materials a nivell cel·lular o tissular. També pot ser el resultat d'una alteració en la resposta cel·lular als estímuls mecànics [7].

Cal ressaltar que hi ha un ampli rang de malalties, dins de molts camps de la medicina, l'etiologia i la presentació clínica de les quals resulta d'una mecanotransducció anormal [2]. Es tracta de malalties com l'aterosclerosi, l'artritis, la sordesa, les distròfies musculars, l'osteoporosi o el càncer, les quals resulten d'una resposta fisiològica anormal a senyals extrínseques o intrínseques (generades per cèl·lules) (Taula 1) [7]. Així, els pacients amb escleroderma, o amb fibrosi pulmonar pateixen les conseqüències d'un enduriment del teixit derivat d'un increment de la deposició ECM i una alteració de la seva estructura, mentre que l'emfisema pulmonar es produeix per una degradació incrementada de la ECM que comporta una destrucció i un estovament del teixit [2].

	ENDURIMENT	ESTOVAMENT
Sang	Malària Anèmia falciforme	
Sistema cardiovascular	Angina (vasoespasmes) Hipertensió Aterosclerosi	
Teixit connectiu		Col·lagenopaties Síndrome de Marfan
Desenvolupament	Progèria/Síndrome de Hutchinson-Gilford	
Pell	Escleroderma	
Sistema digestiu	Síndrome de l'intestí irritable Cirrosi Pancreatitis	
Neurologia	Hidrocefàlia Accident cerebrovascular	
Oncologia	Càncer	Invasió/metàstasi
Ulls	Glaucoma	
Sistema músculo-esquelètic	Dolor d'esquena crònic Contractura de Dupuytren	Distròfia muscular Osteoporosi Osteoartritis Artritis reumatoide
Pulmons	Asma Fibrosi pulmonar	Emfisema
Ronyons	Nefropatia diabètica	Incontinència urinària

Taula 1. Malalties de la mecanobiologia: la seva causa o clínica estan relacionades amb una mecànica alterada on el teixit mostra un enduriment o estovament [2, 18-20].

Moltes malalties que aparentment no estan relacionades podrien tenir en comú una mecanotransducció anormal en el seu desenvolupament i la seva forma de presentació clínica. Les molècules que medien la mecanotransducció poden, per tant, representar dianes per a la intervenció terapèutica en una varietat de malalties [2].

De fet, ja hi ha diverses intervencions terapèutiques que es basen en l'alteració de la mecànica cel·lular o tissular o de la mecanotransducció. Es creu que aquests sistemes actuen mitjançant alteracions en la microescala de forces i activant transducció de senyal en les cèl·lules [2]. Per exemple, els cirurgians utilitzen teràpies mecàniques per a promoure el creixement i remodelat de teixits. Per altra banda, s'han emprat inhibidors de la quinasa associada a Rho, una molècula que controla la senyalització mecànica a través de les integrines i de la regulació de la contractilitat del citosquelet, en models experimentals per evitar la progressió del glaucoma [21].

El fet de que cada vegada es vagi avançant més en el coneixement de la relació entre estructura i funció en els teixits i els mecanismes fonamentals de mecanotransducció podria portar-nos a mètodes completament nous d'intervenció terapèutica. Així, és esperable que algun dia arribi a ser possible tractar un gran rang de malalties usant medicaments dirigits específicament contra molècules que contribueixen a restaurar la mecanoregulació normal [2].

2. LA FIBROSI COM A PARADIGMA DE LA MECÀNICA TISSULAR ALTERADA

La fibrosi es caracteritza per l'acumulació excessiva de ECM, cosa que sovint resulta en la destrucció de l'arquitectura normal del teixit i causa una important disfunció de l'òrgan [22]. L'acumulació excessiva de ECM i el remodelat de l'arquitectura del teixit poden ser la conseqüència de l'alteració de l'equilibri de dos processos fisiològics. Per una banda el balanç entre la proliferació i l'apoptosi de fibroblasts es decanta cap a una major proliferació o cap a una menor apoptosi, portant a una acumulació de fibroblasts, que són els principals productors de la ECM. Per altra banda, l'equilibri entre deposició i recanvi de ECM es desplaça cap a la deposició, i com a conseqüència s'acumulen quantitats excessives de ECM [23].

En general, es considera que la fibrosi resulta d'una reparació anormal del dany en el teixit. La reparació del dany en els teixits és una resposta fisiològica molt complexa que s'inicia després d'un dany per a contenir-lo i aïllar-lo. És un procés que implica el reemplaçament de les cèl·lules necròtiques o apoptòtiques, amb una deposició limitada de teixit connectiu [24]. Els processos de reparació del dany han estat extensament estudiats en la pell i sovint s'han extrapolat a altres teixits i òrgans. En general, la primera fase després del dany és la fase inflamatòria, en la que es forma una matriu provisional de fibrina i fibronectina que omple la zona lesionada. S'alliberen nombroses quimiocines que recluten cèl·lules inflamatòries, fibroblasts i cèl·lules endotelials. En una segona fase, es produeix angiogènesi, permetent l'arribada de nutrients i oxigen. A més, els fibroblasts atrets proliferen, s'activen i produeixen una ECM que reemplaça la matriu provisional. Les propietats contràctils dels fibroblasts activats ajuden a la contracció i maduració de la cicatriu. L'última fase és la de regeneració del teixit, que implica el remodelat progressiu de la ECM dipositada, on les metal·loproteïnases de la matriu (MMP) i els inhibidors de metal·loproteïnases dels teixits (TIMP) juguen un paper clau, i el nombre de fibroblasts activats es redueix per apoptosi [25]. No obstant, si es produeix un dany perllongat en el teixit o una desregulació del procés normal de cicatrització i resolució del dany, es pot desencadenar una deposició excessiva i descontrolada de components de la ECM, que porta a la fibrosi patològica [24, 26].

Encara que les condicions fibròtiques en diferents òrgans tenen diferents etiologies, típicament la fibrosi resulta d'una inflamació crònica persistent, la qual pot haver estat induïda per una varietat d'estímuls (per exemple infeccions cròniques, reaccions al·lèrgiques, dany químic o per radiació). Una resolució defectuosa o una fallida en la contenció de la reacció inflamatòria poden resultar en una producció de factors de creixement pro-fibrogènics de manera sostinguda [22]. Si l'agent causant del

dany desapareix, la capacitat de revertir la fibrosi varia entre diferents òrgans i en funció de l'extensió del dany. Serà necessària la desaparició de les cèl·lules productores de ECM i degradació de la matriu dipositada. No obstant hi ha punts de no retorn: quan la fibrosi és molt avançada i la ECM es torna resistent a la degradació, per exemple degut a l'entrecreament de les fibres de col·lagen. I també quan el dany és sever i es perd la integritat del teixit [26].

La fibrosi en diferents òrgans (ronyó, fetge, pulmó) té característiques comunes, incloent el paper crític del factor de creixement transformant beta (TGF- β) i els factors de creixement de fibroblasts (FGF) i la generació d'espècies reactives d'oxigen [26].

2.1 La matriu extracel·lular

La ECM és el component no cel·lular de tots els teixits i òrgans [27]. A més de proporcionar una estructura física essencial per als constituents cel·lulars, la ECM serveix per a integrar la informació bioquímica i biomecànica, regulant la senyalització bioquímica i biomecànica intercel·lular, que és imprescindible per la diferenciació i l'homeòstasi dels teixits [7, 27, 28]. En conseqüència, té un paper en un gran nombre de processos cel·lulars, incloent l'adhesió, la migració, l'apoptosi, la proliferació i la diferenciació [7]. La diversitat en la composició i l'organització de la ECM li permet adoptar una varietat de funcions i formes, des de les estructures sòlides que es troben en els ossos i les dents a les matrius elàstiques i flexibles que es troben en el cartílag i els tendons. A més, a nivell molecular la ECM té la capacitat d'unir, integrar i controlar la presentació de factors i d'altres lligands a les cèl·lules [7].

Encara que la ECM està formada fonamentalment per aigua, proteïnes i polisacàrids, cada teixit té una matriu amb una composició única, que a més és heterogènia dins de cada teixit [27]. A més, la ECM no és estàtica és una estructura dinàmica de composició i distribució variable en les diferents etapes del desenvolupament, l'homeòstasi i la reparació dels teixits [7, 27, 28].

En condicions normals, la ECM es troba en remodelat constant. Aquest remodelat es produeix a través d'una alteració en l'equilibri entre la deposició i la degradació i reabsorció de la matriu, que són processos dinàmics que estan regulats de manera precisa [27, 28]. A més, hi participen altres enzims que entrecreuen les fibres, com la lisil oxidasa que entrecreua el col·lagen i l'elastina [7]. La pèrdua del control d'aquests processos pot portar a una remodelat patològic dels teixits i una pèrdua de l'homeòstasi de les cèl·lules i els teixits i porta a un gran nombre de malalties [7, 28].

2.1.1 Components de la ECM

La ECM està formada per dues grans classes de macromolècules: les proteïnes fibril·lars i els proteoglicans.

Proteïnes fibril·lars

Es poden distingir proteïnes pròpiament estructurals i proteïnes connectores o adhesives [27]. Hi ha diverses proteïnes estructurals que proporcionen característiques variades. El col·lagen de tipus I proporciona rigidesa gràcies a la seva estructura terciària, mentre que l'elastina forma xarxes altament

entrecruades que permeten l'estirament dels teixits [29]. L'elastina i el col·lagen estan estretament associats.

El component més abundant de la ECM en la majoria de teixits és el col·lagen, que a més constitueix fins al 30% de la massa total de proteïna en els animals multicel·lulars [27, 30]. És el principal element estructural de la ECM, proporcionant-li resistència a la tensió i regulant l'adhesió cel·lular i la migració [27]. Hi ha prop de 30 tipus diferents de col·làgens [31]. L'activació constitutiva dels miofibroblasts productors de ECM en les malalties fibròtiques resulta en un augment en la concentració i la quantitat de col·lagen [32].

Un cop ensamblades, les fibres de col·lagen i elastina són altament entrecruades entre sí per l'acció d'enzims com les lisil oxidases, els nivells de les quals es troben incrementats en la fibrosi. L'entrecruament del col·lagen també es produeix pel procés no enzimàtic de la glicació, el qual també es troba augmentat en la fibrosi [27, 32]. L'entrecruament de les fibres contribueix a l'augment de la rigidesa de la matriu [32].

Per altra banda, les proteïnes fibril·lars adhesives, que inclouen per exemple la fibronectina i la laminina, connecten les cèl·lules i la ECM [29]. La fibronectina s'uneix a la ECM i conté dominis necessaris per a la interacció amb les integrines [29]. La fibronectina és important per a l'organització de la matriu intersticial i actua com a mecanoregulador [27]. Les laminines també interaccionen amb les integrines i regulen l'adhesió cel·lular a la làmina basal [29]. La variant de la fibronectina que conté el domini extra-A (ED-A) incrementa l'adhesió per part de les cèl·lules. Aquesta interacció és essencial per a la diferenciació miofibroblàstica mediada per TGF- β . A més la fibronectina influeix en la deposició i l'acumulació del col·lagen tipus I a la ECM fibròtica [33].

Glicosaminoglicans i proteoglicans

La major part de l'espai ocupat per la ECM està format per cadenes de polisacàrids, els glicosaminoglicans (GAG), o per proteoglicans, els quals consisteixen en cadenes de GAG unides covalentment a una proteïna [34]. L'àcid hialurònic és el GAG més simple i no es troba unit a cap proteïna. Entre els proteoglicans es troben aggrecà, decorina i perlecà [34]. Aquestes estructures formen un gel hidratat anomenat substància amorfa que es disposa entre les proteïnes estructurals de la matriu [27, 29].

Els proteoglicans de la ECM tenen una gran varietat de funcions: hidratació, unió i resistència a les forces compressives [27, 34]. Els proteoglicans interaccionen directament amb molts senyals bioquímics com el TGF- β , regulant així els seus efectes [34].

La decorina antagonitza l'activitat del TGF- β en interactuar-hi directament i per tant té un paper protector en la fibrogènesi i quan es redueixen els seus nivells augmenta l'acumulació de ECM [29, 35]. Els sindecans formen part de la membrana cel·lular. El sindecà 2 és sobreexpressat durant la fibrosi i és induït en resposta al TGF- β [36]. El versicà és un proteoglicà amb molts papers en l'homeòstasi dels teixits, podent regular la diferenciació, migració, proliferació i adhesió cel·lulars [37]. La sobreexpressió

d'aquest proteoglicà, que és un component abundant en la matriu fibròtica, porta a una major activació dels miofibroblasts [38, 39].

2.1.2 Metal·loproteïnases de la matriu (MMP)

Les MMP són una família d'endopeptidases que contenen zinc i són dependents de calci. La majoria són enzims secretats, tot i que també n'hi ha alguns que són associats a membrana (MT-MMP)[40, 41]. La família de les MMP humanes consisteix en 23 membres, que es poden dividir segons l'organització dels seus dominis juntament amb la seva especificitat de substrat i similitud de seqüència (Taula 2) [41, 42].

Subgroup	MMP	Name	Substrate
1. Collagenases	MMP-1	Collagenase-1	Col I, II, III, VII, VIII, X, gelatin
	MMP-8	Collagenase-2	Col I, II, III, VII, VIII, X, aggrecan, gelatin
	MMP-13	Collagenase-3	Col I, II, III, IV, IX, X, XIV, gelatin
2. Gelatinases	MMP-2	Gelatinase A	Gelatin, Col I, II, III, IV, VII, X
	MMP-9	Gelatinase B	Gelatin, Col IV, V
3. Stromelysins	MMP-3	Stromelysin-1	Col II, IV, IX, X, XI, gelatin
	MMP-10	Stromelysin-2	Col IV, laminin, fibronectin, elastin
	MMP-11	Stromelysin-3	Col IV, fibronectin, laminin, aggrecan
4. Matrilysins	MMP-7	Matrilysin-1	Fibronectin, laminin, Col IV, gelatin
	MMP-26	Matrilysin-2	Fibrinogen, fibronectin, gelatin
5. MT-MMP	MMP-14	MT1-MMP	Gelatin, fibronectin, laminin
	MMP-15	MT2-MMP	Gelatin, fibronectin, laminin
	MMP-16	MT3-MMP	Gelatin, fibronectin, laminin
	MMP-17	MT4-MMP	Fibrinogen, fibrin
	MMP-24	MT5-MMP	Gelatin, fibronectin, laminin
6. Others	MMP-25	MT6-MMP	Gelatin
	MMP-12	Macrophage metalloelastase	Elastin, fibronectin, Col IV
	MMP-19		Aggrecan, elastin, fibrillin, Col IV, gelatin
	MMP-20	Enamelysin	Aggrecan
	MMP-21	X MMP	Aggrecan
	MMP-23		Gelatin, casein, fibronectin
	MMP-27	CMMP	Unknown
	MMP-28	Epilysin	Unknown

MMPs are categorized according to the organization of their peptide domains, their substrate specificity, and their sequence similarity (8,12,17,22–24,85–87). MMP, matrix metalloproteinase; MT-MMP, membrane-type matrix metalloproteinase.

Taula 2. Membres de la família de les MMP [41].

Entre les dianes de les MMP als pulmons trobem molècules de la ECM, factors de creixement, proteases i molècules d'adhesió [40]. Les col·lagenases degraden predominantment els col·làgens intersticials de tipus I, II i III. Les gelatinases degraden gelatina i els col·làgens de la membrana basal. Les estromelisines digereixen un ampli rang de substrats, com el col·lagen de tipus IV, proteoglicans, laminina, gelatines i fibronectina [43].

Les MMP estan regulades fortament a nivell transcripcional i post-transcripcional [44]. Aquests enzims són secretats en forma inactiva (latent), que s'anomena zimogen o pro-MMP. La seva activació, generalment per altres proteases, implica l'eliminació del pro-domini, resultant en una reducció en la massa molecular [41]. L'activitat de les MMP també és regulada per diversos inhibidors, sent els més importants els TIMPs, els quals també són proteïnes secretades, però poden estar situats a la membrana associats a les MT-MMP [41, 44].

Les MMP estan implicades en el remodelat dels teixits durant el desenvolupament embrionari, la migració cel·lular i la curació de teixits entre altres. Una mala regulació de l'activitat de les MMP, per exemple deguda a un desequilibri entre les MMP i els seus inhibidors endògens, resulta en dany als teixits i en alteracions funcionals [40, 41].

Algunes MMP són anti-fibròtiques mentre que altres poden tenir funcions pro-fibròtiques. Moltes vegades els mecanismes pels quals aquests enzims redueixen o promouen la fibrosi no té relació directa amb la proteòlisi directa de la ECM, sinó que es produeix a través de l'influència en activitats cel·lulars com la proliferació o la supervivència, la modulació de l'expressió gènica o de diversos aspectes de la senyalització com ara la inflamació [45, 46].

2.2 Els fibroblasts i els miofibroblasts

Tot i trobar-se en la majoria de teixits, especialment els que tenen un marcat component epitelial i vascular (com la pell, el pulmó, el fetge i el ronyó), els fibroblasts són cèl·lules encara poc caracteritzades [47]. Principalment s'identifiquen per la seva localització i morfologia. Són cèl·lules mesenquimals que, en cultiu, presenten una morfologia fusiforme i absència de marcadors específics [48]. Es caracteritzen per l'expressió de vimentina en absència de desmina i alfa-actina del múscul lliu (α -SMA) [48].

Els fibroblasts produeixen tots els components de la ECM i, també juguen papers importants com el manteniment i reabsorció (per degradació) de la ECM, la reparació del dany, inflamació i angiogènesi [29]. Així, a més de produir els elements que formen la ECM, generen els enzims necessaris per a l'assemblatge i l'entrecruament de les fibres de la matriu, així com les MMP i els TIMP [30]. D'aquesta manera poden controlar l'arquitectura del teixit i el ritme de recanvi de la matriu, un procés essencial per a la resolució després d'un dany.

Quan els fibroblasts s'activen, la seva proliferació s'incrementa i es diferencien cap a miofibroblasts, els quals produeixen majors quantitats de ECM [29]. Els miofibroblasts no són presents habitualment en els teixits sans, sinó que s'incrementen en grans nombres després d'un dany i juguen un paper crític en la resposta de reparació [49]. Normalment els miofibroblasts desapareixen un cop han facilitat la resolució del dany en un teixit, presumiblement mitjançant mecanismes de desdiferenciació i d'apoptosi [49]. No obstant en alguns casos i per raons que encara no es coneixen bé, la seva activació es descontrola i persisteixen de manera inadequada, produint una resposta fibròtica patològica [29, 49].

Hi ha nombroses teories sobre els diversos possibles orígens dels miofibroblasts, que encara és un tema força controvertit. Els miofibroblasts poden originar-se a partir de diverses cèl·lules precursors entre les que s'inclouen els fibroblasts residents en el teixit, les cèl·lules epitelials, les cèl·lules endotelials, els pericits i els fibròcits (Figura 2) [29, 50, 51].

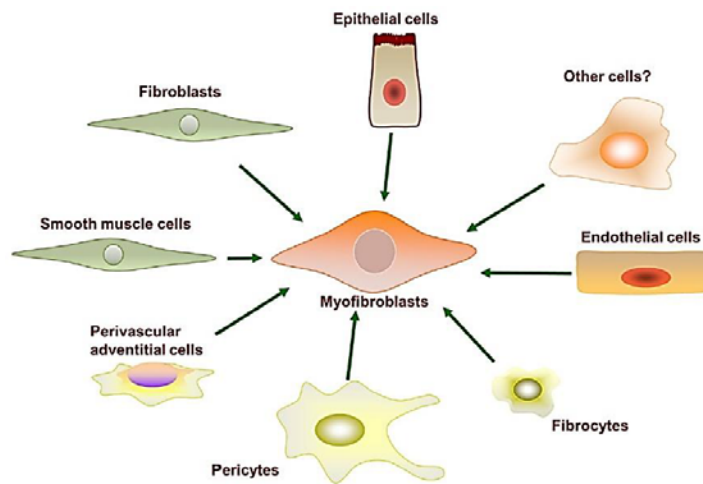


Figura 2. Origen dels miofibroblasts. Els miofibroblasts poden diferenciar-se a partir d'una varietat de cèl·lules precursors [29].

Es considera que els miofibroblasts poden diferenciar-se a partir de cèl·lules epitelials mitjançant el procés de transició epiteli-mesenquima (EMT). Aquest fenomen estaria caracteritzat per la regulació a la baixa dels marcadors epitelials, com E-cadherina i citoqueratines, i per l'augment dels marcadors mesenquimals, com vimentina i alfa actina de múscul llis (α -SMA), així com la degradació de la membrana basal i la migració de les cèl·lules cap al compartiment intersticial [22]. Per altra banda, els fibròcits són cèl·lules mesenquimals circulants que han estat implicades en la immunopatogènesi de nombroses malalties en les que es produeix fibrosi i remodelat del teixit [52].

La diferenciació a partir de fibroblasts residents en el teixit (transició fibroblast-miofibroblast) és la més ben caracteritzada. Hi ha diversos factors que poden induir l'activació de fibroblasts, com ara factors de creixement o citoquines, per exemple el TGF- β . També altres estímuls com la interacció amb la ECM o una elevada rigidesa del microentorn poden activar els miofibroblasts [53]. En una primera fase del procés de diferenciació en cultiu, els fibroblasts residents comencen a expressar fibres d'estrès que estableixen connexions amb la matriu a través de les integrines i es coneixen com a proto-miofibroblasts. Finalment aquests es diferencien a miofibroblasts, que expressen l' α -SMA (Figura 3).

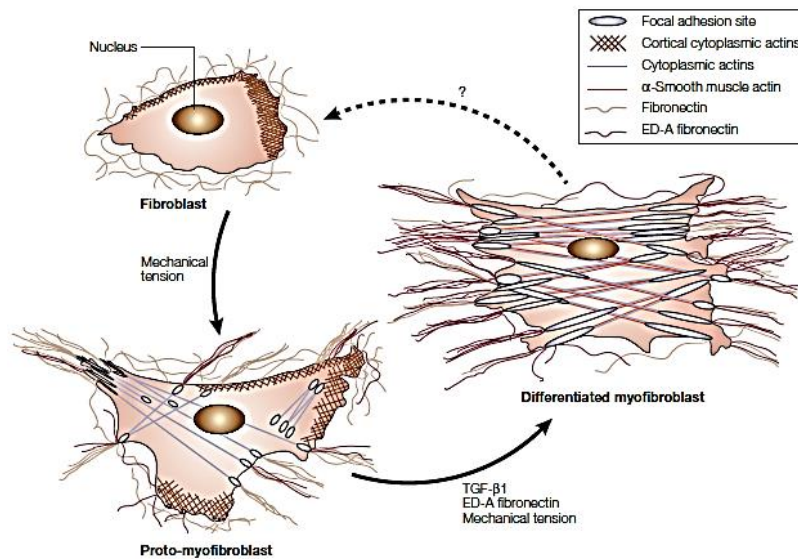


Figura 3. La diferenciació dels miofibroblasts [54].

El miofibroblast és el principal efector de la fibrosi ja que presenta una major taxa de síntesi i secreció de ECM i presenten resistència a l'apoptosi [48, 55]. A més, el fenotip miofibroblàstic en cultiu es caracteritza per una morfologia més extensa i per l'adquisició d'un aparell contràctil amb fibres d'estrès que contenen α -SMA i expressen la variant de la fibronectina ectodomini (ED)-A FN [54]. Les propietats contràctils dels miofibroblasts són importants per a controlar la resolució del dany i l'arquitectura dels teixits ja que els facilita la manipulació de les fibres de la ECM i la contracció de la cicatriu [30, 54].

El miofibroblast és una cèl·lula mecànicament activa que contribueix a les alteracions de la mecànica dels teixits. És una cèl·lula mecanosensible, ja que el seu fenotip activat es pot induir per forces externes [53, 56] relacionades amb la deformabilitat (rigidesa) de la ECM. Una rigidesa incrementada de la matriu resulta en una major expressió de α -SMA i una deposició incrementada de matriu, potencialment com a part d'un cicle de retroalimentació positiva [56]. Així, un increment en la rigidesa de la matriu augmenta la proliferació i la contractilitat dels miofibroblasts, que a través de l'acumulació de ECM i la seva contracció porta al seu torn a una major rigidesa [57]. Per altra banda, alguns estudis han demostrat que un substrat més tou resulta en la reversió del miofibroblast, mentre que altres treballs suggereixen que el miofibroblast té memòria mecànica i pot retenir el fenotip quan canvien les característiques mecàniques de l'entorn [57, 58]. Així mateix, diversos estudis mostren que els efectes de la rigidesa de la matriu podrien ser independents dels factors profibròtics solubles com el TGF- β , o que fins i tot podrien promoure de manera selectiva els efectes d'aquests factors [28].

Les integrines són importants per a l'activació dels miofibroblasts a través de la rigidesa del substrat. Aquestes poden potenciar les senyals de factors solubles específicament. Es sap que el subconjunt de les integrines que contenen la subunitat α v juguen un paper en l'activació de la forma latent de TGF β 1, la major part de la qual es troba unida en la matriu extracel·lular [16]. També, la subunitat integrina beta 1 és important per a la diferenciació de miofibroblasts, ja que és necessària per a que es doni

l'expressió de fibres d'estrès amb α -SMA i la producció de ECM, en part a través d'un mecanisme dependent de TGF- β [59, 60].

2.3 TGF- β , l'activador del programa fibrogènic

Els TGF- β formen part de la superfamília del TGF- β i són pèptids multifuncionals i pleiotròpics [61]. En mamífers hi ha tres isoformes del TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3, que tot i expressar-se de forma específica per teixit, senyalitzen a través dels mateixos receptors de membrana. El TGF- β 1 és la isoforma més freqüent i expressada de manera gairebé ubiqua en tots els teixits. A més, és la citoquina fibrogènica més important, ja que promou el desenvolupament de la fibrosi en tots els òrgans parenquimals [22].

El TGF- β es secreta en forma de complex latent inactiu, de forma que no es pot unir als seus receptors. El complex latent inactiu s'uneix a components de la ECM a través de proteïnes d'unió a TGF- β latent, quedant emmagatzemats en grans quantitats [22, 30]. L'alliberament de la forma bioactiva del TGF- β requereix la desunió del complex de la ECM (que és induïda per proteases), així com la disrupció dels components del complex latent (per canvis conformacionals que poden ser induïts per la unió de proteïnes, espècies reactives d'oxigen, integrines, proteòlisi o un pH àcid) [22, 30].

Diversos estudis han assenyalat la influència de l'elasticitat de la matriu en la activació del TGF- β latent i també en la seva senyalització [62, 63]. Per exemple les forces mecàniques poden activar el TGF- β latent produït pels miofibroblasts. Per aquesta activació són necessaris la integrina $\alpha\beta$ 5 i un citoesquelet organitzat amb fibres d'estrès funcionals [64, 65].

Els membres de la família del TGF- β senyalitzen a través de diferents combinacions de receptors transmembrana: de tipus I (TbRI) i de tipus II (TbRII). Aquests receptors són serin/treonin quinases que formen complexos heteromèrics en resposta a la unió del lligand, el que permet la seva transfosforilació i per tant l'activació de les quinases del receptor de tipus I [22]. La via canònica de senyalització del TGF- β inclou la família d'activadors transcripcionals Smad, les quals es transloquen al nucli on activen o reprimeixen la transcripció gènica en funció del reclutament de complexos coactivadors. A més el TGF- β pot senyalitzar per vies no canòniques a través de proteïnes MAPK, que regulen la diferenciació, proliferació i supervivència cel·lular i apoptosi. El TGF- β pot activar les 3 vies de MAPK conegudes: quinasa regulada per senyals extracel·lulars (ERK), MAPK p38, i quinasa c-Jun-N-terminal (JNK) [22] (Figura 4).

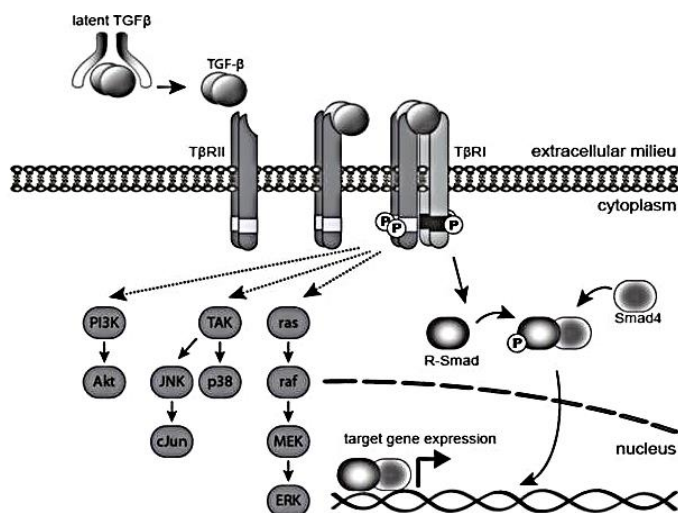


Figura 4. Model de la senyalització de TGF-β [66].

El TGF-β està implicat en un ampli rang de funcions, regulant processos com la resposta immune, la deposició de la ECM i la diferenciació i la proliferació cel·lular [22]. Així, regula l'homeòstasi i té múltiples funcions durant el desenvolupament, la cicatrització de ferides i la reparació de teixits [26]. Cal destacar que els nivells d'aquesta citoquina són marcadament elevats en el desenvolupament de la fibrosi. No només hi ha una major producció sinó també una major activació de la forma latent [26]. Els miofibroblasts activats i les cèl·lules epitelials apoptòtiques són les principals fonts de TGF-β [26]. També és un quimioattractant molt potent per a cèl·lules mieloides i macròfags, els quals un cop activats esdevenen una gran font de TGF-β.

Gairebé totes les cèl·lules expressen receptors de TGF-β1 pel que aquesta citoquina afecta a tots els nivells del procés fibròtic. En les cèl·lules epitelials el TGF-β promou apoptosi i EMT [26]. En fibroblasts, el TGF-β és un factor crític en la regulació del fenotip i la funció [22, 54]. En fibroblasts TGF-β estimula la proliferació i la transdiferenciació cap a miofibroblasts [22, 26, 54]. A més, promou la deposició de ECM, en augmentar la síntesi de proteïnes de matriu i alterar l'equilibri entre senyals conservadores i degradadores de la matriu [22]. El TGF-β estimula de manera molt potent la transcripció de col·lagen tipus I i també podria incrementar la seva estabilitat post-traducciona mitjançant el seu entrecreuament [22, 67]. També té un efecte conservador de la matriu ja produïda, a través de la supressió de l'activitat de les MMP o de la inducció de la síntesi d'inhibidors de proteases [22].

Per últim, cal mencionar que el factor de creixement del teixit connectiu (CTGF) és un factor fibrogènic important, ja que es sintetitza en resposta a la senyalització del TGF-β. Estimula la diferenciació miofibroblàstica i la síntesi de col·lagen. A més s'uneix directament al TGF-β, fent que s'incrementi la seva activitat a través d'un augment en la seva afinitat pels receptors [22, 26].

3. LA FIBROSI PULMONAR IDIOPÀTICA

La fibrosi pulmonar és un procés paradigmàtic dins dels processos de desregulació mecànica on els fibroblasts són cèl·lules clau. Així, una característica essencial de la fibrosi pulmonar és una acumulació

excessiva de ECM en el pulmó, que porta a un enduriment progressiu i que compromet la seva capacitat per dur a terme l'intercanvi de gasos de forma normal. Els pacients afectats típicament presenten una dificultat per a respirar que apareix de forma insidiosa, ja que en els primers estadis el procés passa desapercebut.

La fibrosi pulmonar pot estar associada a un gran nombre de malalties subjacents (com malalties reumatològiques) o a exposicions ambientals (com en el cas de l'asbestosi), o pot ser de natura idiopàtica (és a dir de causa desconeguda). Les anomenades malalties pulmonars intersticials difuses (ILD) engloben aquelles afeccions pulmonars, agudes o cròniques, que presenten graus variables d'inflamació i fibrosi [68]. Dins d'aquesta família de malalties es troba la fibrosi pulmonar idiopàtica (IPF), que és una malaltia molt greu, ja que causa la mort en poc temps i actualment és incurable, a diferència d'altres tipus de fibrosi pulmonar.

3.1 El pulmó

3.1.1 Estructura i components dels pulmons

Els pulmons són els òrgans responsables de l'intercanvi de gasos en l'organisme, al permetre el pas de l'oxigen al torrent sanguini i la sortida del diòxid de carboni cap a l'exterior. L'anatomia del pulmó consta de dos bronquis principals que, un cop dins el pulmó, es divideixen en bronquíols, els quals continuen ramificant-se fins arribar als sacs alveolars, formats per alvèols, estructures esfèriques on hi té lloc l'intercanvi de gasos [69] (Figura 5).

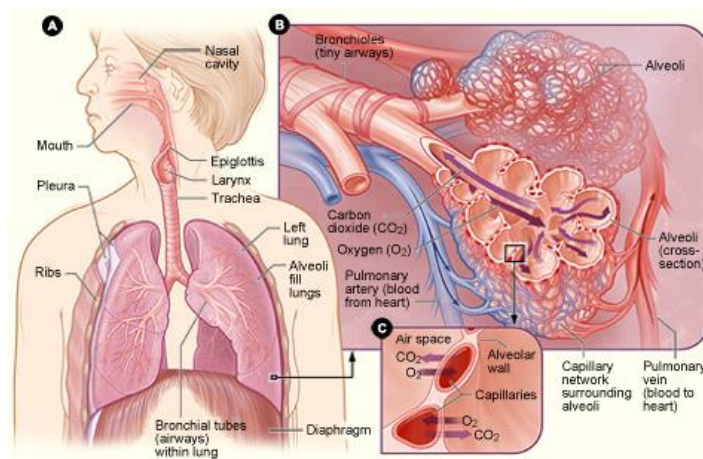


Figura 5. Anatomia del sistema respiratori, mostrant els bronquis i els pulmons (A), una ampliació dels alvèols (B) i un esquema de l'intercanvi de gasos (C) [70].

Formant part del parènquima pulmonar, els alvèols són la part terminal de l'arbre respiratori. Cada alvèol està envoltat per una fina xarxa de capil·lars i la seva superfície interna està recoberta per una capa de cèl·lules epitelials, les cèl·lules alveolars o pneumòcits. Les cèl·lules alveolars de tipus I recobreixen el 95% de l'alvèol i a través seu té lloc l'intercanvi de gasos, segurament facilitat per la seva forma aplanada [71]. Les cèl·lules alveolars de tipus II tenen funcions secretora, proliferadora i immune, tasques que permeten mantenir la funció normal dels alvèols. Tenen forma cuboïdal i

produeixen grans quantitats de surfactant [71]. Les cèl·lules endotelials, que formen els capil·lars i estan en estret contacte amb les cèl·lules alveolars, són crítiques per a l'intercanvi de gasos [71].

L'interstici pulmonar és el teixit i l'espai al voltant dels alvèols, entre la membrana basal de l'epiteli alveolar i l'endoteli capil·lar. Aquest teixit connectiu dona suport al parènquima i està format per les cèl·lules intersticials i per la ECM [29]. Els fibroblasts són les cèl·lules intersticials que donen suport a l'estructura alveolar a través de la secreció de la ECM (Figura 6) [71].

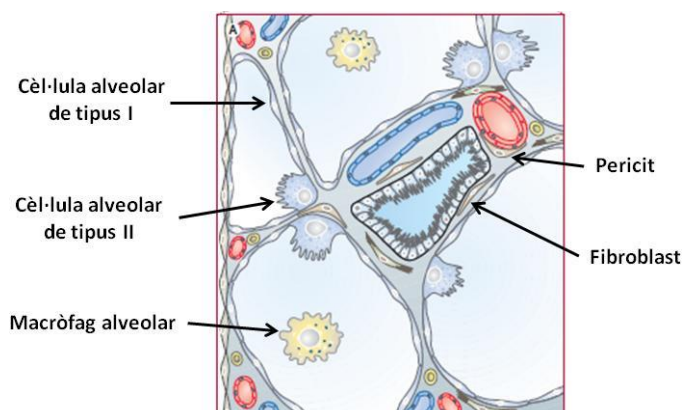


Figura 6. Microarquitectura del pulmó, amb els espais alveolars envoltats per l'epiteli alveolar i l'interstici on es troben els fibroblasts. Adaptat de [72].

3.1.2 La fibrogènesi pulmonar

El pulmó, donada la seva immensa superfície i la funció d'intercanvi de gasos, és la primera línia de defensa contra desafiaments ambientals perjudicials que inclouen factors físics, químics i biològics. Així, són freqüents els danys al llarg de la vida, i els processos de reparació i remodelat són essencials per restaurar la funció pulmonar normal [73]. La visió general de la fibrosi pulmonar és que l'acumulació de la ECM i el remodelat de l'arquitectura pulmonar es produeixen com a conseqüència d'un dany a l'epiteli alveolar juntament amb la presència de cèl·lules mesenquimals pulmonars alterades. Així, els estudis mecanístics més recents s'han centrat en el paper de la interacció entre les cèl·lules epitelials danyades i les cèl·lules mesenquimals [23].

A més de ser les responsables de l'intercanvi de gasos als pulmons, les cèl·lules epitelials pulmonars recobreixen les vies aèries i les superfícies alveolars, actuant com a primera línia de defensa en la protecció del pulmó en front d'agents externs [26, 73]. Algunes de les estratègies protectores d'aquestes cèl·lules inclouen la secreció de mucus i surfactants, els moviments ciliars i el transport de fluid o electròlits [73]. Es creu que els danys repetits o que no es resolen correctament a l'epiteli alveolar poden actuar com a desencadenants de la fibrosi pulmonar [49, 52].

Quan es produeix un dany, les cèl·lules epitelials afectades són eliminades a través dels processos de necrosi i apoptosi, deixant una superfície descoberta, amb la funció de barrera afectada. Per tal de restaurar les funcions comença un procés de regeneració en el que les cèl·lules progenitores migren, proliferen i es diferencien en cèl·lules epitelials per tornar a recobrir la superfície alveolar [73]. Durant el procés d'apoptosi, les cèl·lules epitelials secreten citoquines i quimiocines que activen vies de

transducció de senyals en les cèl·lules veïnes fent que aquestes alliberin citoquines pro-fibrogèniques com el TGF- β , CTGF i el factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α). El dany a les cèl·lules epitelials està associat sovint amb el dany a les cèl·lules endotelials, les quals també secreten factors pro-fibrogènics [26].

La mort de les cèl·lules epitelials activa els macròfags del teixit, els quals inicien la resposta inflamatòria, amb el reclutament de cèl·lules que alliberen encara més factors proinflamatoris. L'alliberament de TGF- β per part de les cèl·lules inflamatòries contribueix també a l'activació dels miofibroblasts. No obstant el paper de la inflamació en la progressió de la fibrosi varia en diferents òrgans i depèn de les condicions patològiques [26].

3.1.3 Les propietats mecàniques dels pulmons

Les propietats mecàniques del teixit pulmonar són determinants molt importants per al comportament general del sistema respiratori [74]. Les característiques biomecàniques del teixit connectiu són fonamentals pel funcionament de qualsevol òrgan i determinen com les forces que actuen sobre els òrgans produeixen canvis a nivell cel·lular [74]. Les macromolècules més importants en determinar les propietats mecàniques de la ECM són el col·lagen, l'elastina i els proteoglicans [75].

Els miofibroblasts indueixen forces locals en la xarxa de fibres, el que pot fer canviar les propietats mecàniques del teixit, però en qualsevol cas, el to de les cèl·lules intersticials influeix en les propietats viscoelàstiques del pulmó només de manera moderada [75, 76]. La funció més important d'aquestes cèl·lules és el remodelat i la reparació del teixit. Així, encara que contribueixin poc a les propietats biomecàniques del teixit en resposta a forces o estímuls a curt termini, són responsables del manteniment i el remodelat de la composició i l'estructura del pulmó a llarg termini [75].

S'han realitzat diverses mesures de la rigidesa dels pulmons en diverses espècies i per tècniques diferents (mecànica oscil·latòria de teixits, microscòpia de força atòmica). S'ha observat que la duresa depèn de la tècnica usada per a fer les mesures, de l'espècie i de l'edat de l'organisme. En general, basant-nos en les mesures realitzades per diversos grups, podríem considerar la duresa normal del pulmó humà al voltant de 1-10 kPa [59, 77-80].

3.1.4 La mecànica del pulmó fibròtic

En el pulmó fibròtic es produeix un enduriment considerable que ha estat constatat per diversos grups. En general, l'increment en la rigidesa del teixit pulmonar fibròtic podria estar al voltant del factor 3 en global, mentre que en zones localitzades aquest increment en la rigidesa del pulmó podria ser molt superior (fins a 45 kPa) [59, 76, 78, 81].

El teixit cicatricial modula el caràcter de les cèl·lules sanes del teixit, en estimular la diferenciació dels precursors cap a miofibroblasts. Aquesta senyal mecànica per a la diferenciació miofibroblàstica estableix un cercle viciós. L'activitat dels miofibroblasts, que depositen i remodelen una excessiva ECM, són la causa de que hi hagi una major contractura i enduriment del teixit. A més l'activitat del TGF- β és parcialment controlada per les forces contràctils dels miofibroblasts i per la duresa del teixit.

Aquests descobriments obren vies per evitar la progressió de la fibrosi a través de la interferència amb els mecanismes de percepció i transmissió de les forces dels miofibroblasts [63].

3.2 La fibrosi pulmonar idiopàtica

La IPF es defineix com una forma crònica i progressiva de ILD fibrosant, de causa desconeguda, que afecta principalment a adults d'edat avançada i està limitada als pulmons. Es caracteritza per un empitjorament progressiu de la funció respiratòria i està associada a una mala prognosi. [82].

3.2.1 Epidemiologia

És la forma més comuna de malaltia pulmonar fibròtica, representant entre un 19% i un 39% dels casos de ILD [83]. La incidència i la prevalença de la IPF són difícils de determinar degut a la falta d'uns criteris diagnòstics uniformes, els quals no es van establir fins fa poc [82, 84]. Així doncs, la seva incidència es trobaria entre 4,6 i 7,4 casos per cada 100.000 individus i la seva prevalença es situa entre 13 per cada 100.000 individus en dones i 20 per cada 100.000 en homes. D'acord amb aquestes dades, s'estima que a Espanya hi hauria unes 7500 persones afectades per IPF [85]. Donades aquestes xifres d'incidència, la IPF es considera una malaltia rara [83].

La IPF es presenta típicament en la sisena i la setena dècades de la vida, pel que es considera una malaltia associada a l'envelliment. Normalment s'ha diagnosticat més en homes que en dones i la majoria dels afectats tenen historial de tabaquisme. No hi ha una distribució geogràfica característica de la IPF i es desconeix si la incidència i la prevalença estan influïdes per factors ètnics, racials o geogràfics [82]. És important destacar que sembla ser que tant la incidència com la prevalença de la IPF mostren una tendència a l'augment. Així, al llarg dels últims anys s'ha observat un increment en la prevalença, probablement degut a l'optimització dels mètodes diagnòstics i a l'augment en l'esperança de vida [85, 86].

3.2.2 Història natural i simptomatologia

La IPF és una malaltia mortal, amb una història natural variable i impredecible en el moment del diagnòstic. No hi ha símptomes sistèmics i afecta només als pulmons. Té un inici insidiós que s'acostuma a caracteritzar per una tos seca i dispnea d'esforç progressiva. L'inici dels símptomes és lent però van empitjorant amb el temps [85]. La IPF progressa de manera implacable i sovint insidiosa pel que pot ser difícil de detectar usant només la simptomatologia, les troballes radiològiques o l'espirometria. El temps entre l'inici dels símptomes i el diagnòstic és variable i pot estar entre 6 mesos i 2 anys [85].

Tot i que alguns pacients poden romandre asimptomàtics durant 2-3 anys, la major part presenten símptomes, amb un empitjorament progressiu de la funció pulmonar al llarg dels anys que finalment ocasiona una insuficiència respiratòria [82]. En altres casos es donen períodes de relativa estabilitat amb períodes d'agudització, que són causants d'una alta morbi-mortalitat. Per últim, en una minoria de pacients es dona una progressió més ràpida (forma accelerada de la malaltia). No se sap si les diferents formes de presentació representarien fenotips diferents de la malaltia, però el que està clar

és que no hi ha remissions espontànies. [82, 85]. Per altra banda, cal destacar que la IPF és una malaltia amb mal pronòstic i una supervivència baixa. La supervivència promig dels individus afectats és d'entre 2 i 5 anys des de l'inici dels símptomes i la supervivència als 5 anys és del 30-50 % [82, 85].

3.2.3 Diagnòstic i tractament

Per a establir un diagnòstic de la IPF s'ha de presentar un patró histològic de pneumònia intersticial usual (UIP) i addicionalment s'han d'excloure causes conegudes de malalties pulmonars intersticials, incloent altres formes de pneumònies intersticials i malalties associades amb exposicions ambientals, medicació o malalties sistèmiques. Els pacients han de presentar una restricció de la funció pulmonar i/o un intercanvi de gasos alterat i anormalitats en les radiografies o les tomografies d'alta resolució [82, 84].

Hi ha molt poques teràpies efectives per la IPF, a excepció del transplantament pulmonar. Fins fa uns anys la majoria d'estratègies terapèutiques es basaven en eliminar o suprimir el component inflamatori mitjançant l'ús de corticosteroids, immunosupressors com l'azatioprina, tractaments que no resultaven eficaços [87].

En canvi amb l'ús dels medicaments anti-fibròtics sí que s'han obtingut beneficis. En l'última dècada han augmentat els assaigs clínics per la IPF, portant a alguns desenvolupaments interessants. Recentment la pirfenidona ha esdevingut el primer tractament aprovat específicament per al tractament de la IPF en diversos llocs del món. El 2011 va ser aprovada per l'Agència Europea del Medicament pel tractament de la IPF d'intensitat lleu-moderada. Es tracta d'una molècula petita amb propietats anti-fibròtiques, anti-oxidants i anti-inflamatòries que inhibeix el TGF- β [85, 87]. Encara que no es coneix el mecanisme d'acció precís, es considera que inhibeix múltiples vies implicades en la patogènesi de la IPF [88]. El fàrmac inhibeix la proliferació fibroblàstica, la producció de TGF- β i la síntesi de col·lagen [85, 87]. El tractament amb pirfenidona redueix el risc de progressió de la malaltia un 30%, millorant la prognosi dels pacients [87, 88].

La perspectiva terapèutica actual, amb aquest nou desenvolupament juntament amb els assaigs clínics en curs, està esperançant als pacients i metges de cara al futur. Però encara queda molt fins a trobar fàrmacs que puguin prevenir la destrucció progressiva del pulmó i fins i tot revertir-ne la fibrosi un cop aquesta s'ha desenvolupat.

3.2.4 Potencials factors de risc i factors genètics

Tot i que és una malaltia d'etiologia desconeguda, s'han descrit diversos factors de risc potencials. Entre aquests s'inclouen el tabaquisme i les exposicions ambientals (major risc per l'exposició a pols metàl·lics i de fusta). Per altra banda, tot i que no hi ha evidències suficients per considerar que infeccions virals cròniques (especialment el virus Epstein-Barr, virus de l'hepatitis C) siguin factors causants, la seva contribució està sent estudiada. També s'ha implicat l'aspiració crònica secundària al reflux gastroesofàgic [82].

Podria ser que hi hagi factors hereditaris que contribueixin al risc de desenvolupar IPF, però no s'han identificat marcadors genètics específics. Les evidències més clares són els casos de formes familiars de IPF, on almenys hi ha dos en una família biològica primària. Aquestes formes representen menys d'un 5% dels casos [84]. Les alteracions genètiques més rellevants són les mutacions en els gens que mantenen la longitud dels telòmers, en la proteïna C del surfactant i en la mucina 5 B [85]. En casos esporàdics s'han vist polimorfismes en gens de citoquines, enzims, molècules profibròtiques (TGF- β 1), gens de la via de coagulació, surfactant i MMPs [82, 85].

3.2.5 Fisiopatologia de la IPF

Patró histològic

La IPF està associada amb el patró histològic de UIP, el qual es caracteritza per un patró no uniforme amb àrees de pulmó histològicament normal alternades amb àrees de fibrosi (figura 7) [82]. El pulmó presenta una distorsió de l'arquitectura normal amb cicatrius i panalització, amb àrees de col·lapse alveolar. La inflamació és lleu i irregular i les àrees fibròtiques estan formades principalment per col·lagen dens amb focus dispersos de fibroblasts proliferants, anomenats focus fibroblàstics. Aquests es troben recoberts per cèl·lules alveolars de tipus II hiperplàsiques, les quals es consideren indicadors de la progressió de la malaltia [82, 84].

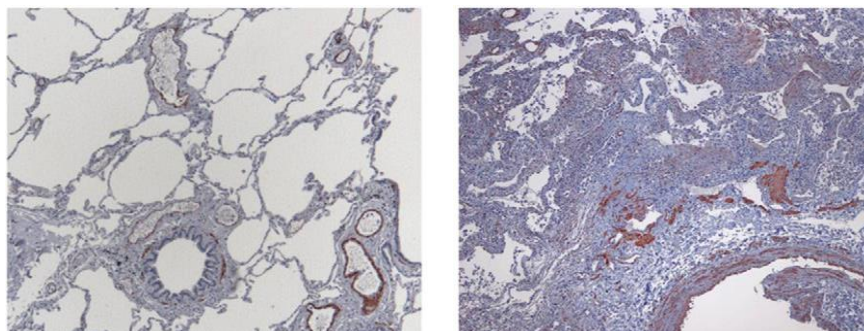


Figura 7. Tinció de α -SMA d'un pulmó normal (esquerra) i un pulmó amb patró de pneumònia intersticial usual (dreta) [89].

Mecanismes cel·lulars

Al llarg de l'última dècada s'ha descrit la possible alteració de diverses vies o mecanismes en la fisiopatologia de la IPF. Aquestes inclourien la coagulació [90], l'apoptosi [91], l'angiogènesi [92], el dany oxidatiu [23, 93], el desenvolupament embrionari [94], la curació de ferides i la EMT [95].

El paper de la inflamació i la immunitat és controvertit. Inicialment es va considerar la inflamació com una troballa consistent dels pulmons amb IPF. En canvi, al llarg de les dues últimes dècades, va passar a ser qüestionat, i es creia que no era una característica important o un requeriment per al desenvolupament de la IPF. El principal argument era que els tractaments anti-inflamatoris no eren efectius per a millorar la funció pulmonar o la supervivència dels pacients [23, 96]. Així, es va passar a emfatitzar les anormalitats epitelials, mesenquimals i de la ECM en detriment de la inflamació per a tenir una visió complexa de la IPF en la que el dany epitelial repetitiu acoblat a una resposta de

cicatrització anormal portarien al desenvolupament de la fibrosi [96]. No obstant, recentment s'ha recuperat l'èmfasi en un paper de la inflamació en la IPF, doncs els resultats de nombrosos estudis impliquen moltes citoquines i molècules relacionades amb la inflamació en els mecanismes profibròtics. Aquests factors afectarien l'estructura de la ECM, la secreció de factors de creixement i la plasticitat cel·lular. [23, 26, 52].

El paradigma actual sustenta que la comunicació creuada entre l'epiteli alveolar i el mesènquima associat estaria regulada de forma anormal en la IPF. Això portaria a una proliferació descontrolada de les cèl·lules productores de ECM i a una reparació aberrant del dany alveolar [96]. Les cèl·lules alveolars de tipus I es perden i són reemplaçades per cèl·lules de tipus II hiperplàsiques. A més, hi ha evidències que la reducció de la llargada dels telòmers per mutacions en gens de la telomerasa, que portaria a una senescència de les cèl·lules alveolars i a la seva incapacitat de autoregenerar-se [49].

En la IPF els miofibroblasts persisteixen de manera inadequada, portant a la seva acumulació en el teixit i al procés de la fibrosi [49]. En general els miofibroblasts estan absents en el pulmó sa. No obstant, una de les característiques clau de la IPF és la presència de cèl·lules positives per α -SMA dins i al voltant dels focus fibroblàstics [30]. La progressió i la severitat de la IPF està associada amb l'extensió ocupada per les regions d'acumulació i proliferació de fibroblasts. En cultiu, els fibroblasts aïllats del teixit pulmonar fibròtic són fenotípicament diferents dels fibroblasts no fibròtics [30]. Tenen uns nivells de proliferació menors que els de pulmons normals, majors nivells d'apoptosi i un perfil de secreció profibròtic [49, 97]. Els fibroblasts fibròtics presenten una major expressió de receptors de quimiocines, una resposta alterada als factors de creixement i capacitat migratòria superior per quimiotaxi [49].

La ECM en la IPF

En la IPF es forma una ECM dura i fibròtica que obstrueix les estructures alveolars normals i impedeix l'intercanvi de gasos [28, 30]. La ECM dels pulmons amb IPF és rica en col·làgens fibril·lars, incloent col·lagen de tipus I i III, proteoglicans com l'àcid hialurònic, i diverses glicoproteïnes, com la fibronectina ED-A [28]. L'equilibri en la regulació de la producció i la degradació de matriu es troba alterat, portant a la depositació excessiva de matriu i a la destrucció del teixit [30]. Els mediadors implicats en aquest procés inclouen factors de creixement, citoquines (com TGF- β) i enzims [30]. Així, els nivells de TGF- β s'han trobat incrementats en les mostres de teixits de models animals de IPF i de pacients de IPF [67].

És important destacar que en la IPF es dona una complexa interacció entre la ECM i les proteïnases de la matriu. Diverses MMP es troben sobreexpressades en els pulmons amb fibrosi [42]. La MMP-1, que pot degradar els col·làgens fibril·lars de tipus I i III, es troba sobreexpressada en els pulmons amb IPF on es produeix una acumulació de col·làgens fibril·lars. Aquest fet paradoxal podria explicar-se perquè s'expressa principalment en les cèl·lules epitelials i està pràcticament absent en el focus fibroblàstics [42, 96]. La MMP-7 també es troba sobreexpressada en la IPF [98-100]. Aquest enzim té una àmplia

especificitat de substrats, sent capaç de degradar membrana basal i altres components de la ECM, a més de processar altres factors (veure taula 2). En els pulmons amb IPF MMP-7 es localitza principalment a l'epiteli alveolar [100]. MMP-2 pot degradar un ampli ventall de substrats de la matriu i altres components. La seva expressió gènica està fortament incrementada en teixits de IPF (en les cèl·lules alveolars hiperplàsiques i també en les mesenquimals dels focus fibroblàstics) i la seva activitat en els rentats bronco-alveolars [101]. A més es creu que la seva expressió, així com la de l'altra gelatinasa MMP-9, estarien implicades en el trencament de la membrana basal [102, 103]. La MMP-3 es troba sobreexpressada en pulmons amb IPF i podria contribuir a la EMT [42]. La seva sobreexpressió en models murins porta a desenvolupar fibrosi pulmonar mentre que els ratolins que no en tenen estan protegits contra l'aparició de la fibrosi [30]. A més, per immunohistoquímica es va detectar que els nivells dels TIMP són elevats en pulmons amb IPF [101]. Així doncs el microentorn del pulmó amb IPF és fortament pro-degradatiu, al contrari del que s'havia pensat inicialment quan es creia que es produïa per la deposició de matriu en una cicatriu passiva. Així, la visió actual és que es tracta d'un procés de remodelat molt actiu metabòlicament on prevaldria un ambient de no degradació de col·lagen fibril·lar [101].

Possiblement l'estudi més exhaustiu dels canvis de la ECM en IPF correspon a l'anàlisi del matrisoma publicat per Booth i col·laboradors el 2012. Aquest grup va definir el matrisoma com el compartiment del proteoma que inclou totes les proteïnes que poden contribuir a la ECM en diverses situacions. Així, mitjançant eines de bioinformàtica i basant-se en l'organització per dominis característica dels gens, aquests investigadors van caracteritzar i predir el conjunt de gens que codificarien per proteïnes de la ECM i per les proteïnes associades a ella [14, 104]. El matrisoma central està format per gairebé 300 proteïnes de la ECM i comprèn entre un 1% i un 1,5% del proteoma. Aquesta llista de proteïnes inclou 43 subunitats de col·lagen, més de 30 proteoglicans i al voltant de 200 glicoproteïnes [14]. A més el matrisoma inclou un gran nombre d'enzims modificadors de la ECM, factors de creixement que s'hi uneixen i proteïnes associades que participen en l'assemblatge i el remodelat [14]. Es van avaluar per espectrometria el matrisoma de mostres de pulmó descèllularitzat. Es van identificar 94 proteïnes, incloent 61 proteïnes centrals (glicoproteïnes, col·làgens i proteoglicans) i 33 proteïnes relacionades amb la ECM. En contrast en les matrius de pulmons de IPF es van trobat 85 proteïnes del matrisoma (64 centrals i 21 relacionades amb el ECM) amb una signatura diferent a la dels pulmons normals [105].

3.2.6 Possibilitats translacionals dels aspectes mecànics de la IPF

La IPF es caracteritza per una sèrie de canvis bioquímics, biomecànics i estructurals progressius. Les alteracions mecàniques que tenen lloc en el teixit són prominents, amb un enduriment que pot superar els 30 kPa [6]. Tanmateix, i l'arquitectura dels pulmons es veu fortament alterada. No obstant, la recerca en el camp de la IPF s'ha centrat en els factors bioquímics [72, 106], mentre que el paper de l'enduriment patològic s'ha mantingut inexplorat.

Els miofibroblasts i el remodelat de la ECM del qual aquests són responsables, són elements clau en el procés que porta a l'enduriment del teixit i la progressió de la malaltia. Les dades actuals sostenen que

el procés cap al desenvolupament de la malaltia es produeix una retroalimentació positiva en el que la depositació i entrecreuament excessius dels components de la ECM juntament amb la contracció del teixit per part dels miofibroblasts es traduiria en un enduriment. Alhora, aquest canvi en les propietats biomecàniques del microentorn sostindria una activació anòmala dels miofibroblasts, portant a una major acumulació de ECM endurida i a una cronificació de l'enduriment. Per tant, s'establiria un cercle viciós d'activació de miofibroblasts i destrucció de teixit.

Identificar els aspectes de la mecanoregulació que es troben alterats de manera específica en els pulmons amb IPF és un repte i alhora podria ser una forma d'ampliar els coneixements sobre aquesta malaltia i descobrir elements rellevants per a la iniciació i progressió del procés que porta a la destrucció irreversible de l'òrgan. Per tant l'estudi dels canvis en les vies de senyalització i els patrons d'expressió gènica que tenen lloc en els fibroblasts de IPF amb l'enduriment del teixit podria ser útil per a la identificació de potencials dianes terapèutiques o biomarcadors específics.

3.3 Altres malalties pulmonars fibròtiques

A banda de la IPF, que es la ILD més letal, hi ha altres malalties que comporten el desenvolupament de fibrosi en el pulmó. Segons el consens internacional de la *American Thoracic Society* i l'*European Respiratory Society* per a la classificació de les ILD, establert el 2002 i actualitzat el 2013, aquestes es poden separar segons si els mecanismes etiològics són coneguts o no (taula 3).

<i>De causa coneguda o associades</i>	<i>Pneumònies intersticials idiopàtiques</i>
Associades a malalties del col·lagen	Fibrosi pulmonar idiopàtica (IPF)
Causades per pols orgàniques (Ex: alveolitis al·lèrgica extrínseca), fàrmacs, radioteràpia	Pneumònia intersticial no específica
Sarcoïdosi	Pneumònia organitzativa criptogenètica (COP)
Proteïnosi alveolar	Pneumònia intersticial aguda
Amiloïdosi	Bronquiolitis respiratòria amb malaltia pulmonar intersticial
Altres ILD	Pneumònia intersticial descamativa

Taula 3. Classificació de les ILD [68, 107].

Així, algunes són de causa coneguda i poden estar associades a una malaltia sistèmica o genètica coneguda, com la pneumònia organitzativa criptogenètica, i d'altres poden ser causades per exposicions a factors ambientals, com l'alveolitis al·lèrgica extrínseca. Per tal d'il·lustrar les diferències amb la IPF, a continuació descrivim aquestes dues malalties pulmonars fibròtiques.

3.3.1 Pneumònia organitzativa criptogenètica

La pneumònia organitzativa criptogenètica (COP) s'anomena així perquè el patró histològic presenta una organització dels alvèols, els quals presenten uns dipòsits de teixit granular. La seva etiologia és desconeguda. La distribució és igual pels dos sexes i hi ha més no-fumadors afectats que fumadors. L'edat d'aparició promig és de 55 anys [68, 108]. El patró histològic de la pneumònia organitzativa és dispers i caracteritzat principalment per l'organització dels ductes alveolars i els alvèols. Hi ha un

infiltrat inflamatori intersticial lleu associat, metaplàsia de cèl·lules de tipus II i un augment en el nombre de macròfags [68].

La majoria dels pacients és recuperen completament amb l'administració de corticosteroids orals i una petita proporció dels pacients es recupera de manera espontània. En alguns casos evolucionen cap a fibrosi progressiva. En rares ocasions els afectats progressen cap a la fallida respiratòria i la mort. El pronòstic és bo amb una supervivència descrita entre 73-98% als 5 anys [68, 108].

3.3.2 Alveolitis al·lèrgica extrínseca (EAA)

L'alveolitis al·lèrgica extrínseca (EAA) és també coneguda com a pneumonitis per hipersensibilitat (HP). Aquesta ILD és la conseqüència d'un procés inflamatori que es produeix degut una reacció immunològica en resposta a una sèrie d'antígens orgànics inhalats en persones susceptibles, pel que pot existir certa predisposició genètica [68, 109]. Es desconeix la seva prevalença i incidència reals, que varien amb el tipus d'antigen, però es creu que està infradiagnosticada [110]. Els antígens més freqüents són proteïnes animals i vegetals, microorganismes (fongs, bacteris, protozous) i productes orgànics de baix pes molecular. Per exemple: proteïnes sèriques, excrements, pells, palla, cereals, fusta, aliments. Per tant les poblacions amb major risc són grangers, cuidadors d'aus, veterinaris, treballadors de la indústria tèxtil i de plàstics i individus en contacte amb aigües contaminades o sistemes de ventilació. La major part de casos són el resultat d'exposicions ocupacionals, en les que hi ha nombrosos antígens involucrats [109, 110].

L'EAA es pot presentar de maneres diferents. En la forma aguda es presenten els símptomes poques hores després de l'exposició a altes concentracions d'antigen i es resol després d'unes setmanes sense estar en contacte amb l'antigen. La forma subaguda es dona per l'exposició contínua o intermitent a baixes concentracions d'antigen i la resolució és més lenta que en la forma aguda. Per últim, la forma crònica d'EAA és deguda al contacte persistent o recurrent amb l'antigen a molt baixa concentració i fa una evolució a fibrosi pulmonar, amb un deteriorament clínic, radiològic i funcional permanent. El tractament consisteix en l'eliminació de l'exposició a l'agent causant i en alguns casos en l'administració de corticoides [68, 109].

4. MODELS PRECLÍNICS EN L'ESTUDI DE LA IPF

4.1 Models animals

Hi ha molt pocs models animals de IPF i cap d'ells recapitula la natura progressiva de la malaltia ni la histologia de UIP [52]. Tot i que aquests no han permès trobar una teràpia efectiva, han contribuït a generar un valuós coneixement sobre els mecanismes patogènics de la fibrosi [111]. Alguns agents exògens que poden generar fibrosi en models animals són: sílice, fluoresceïna isotiocianat, asbestos i radiació [49, 52]. La sobreexpressió de mediadors fibrogènics, com el TGF- β , b TGF- α es poden usar per modelar la fibrosi pulmonar [52].

No obstant, el model més utilitzat de fibrosi pulmonar és el d'instil·lació intratraqueal de bleomicina, un agent quimioterapèutic que indueix dany epitelial, inflamació i finalment fibrosi [52]. La principal crítica al model ha estat que, a diferència de la IPF, la fibrosi que apareix no és progressiva, ja que pot presentar certa regressió en les setmanes posteriors al dany [52]. No obstant, s'ha vist que tot i haver-hi una certa reparació, al cap de 6 mesos, el dany pulmonar no es ressol completament i que per tant podria ser més útil del que es pensava [112].

Per tant, a més de les limitacions habituals dels models animals, com la necessitat d'invertir molt de temps i diners, en el cas de la IPF s'hi afegeix la dificultat per a recapitular les variables biològiques importants de la malaltia.

4.2 Models de cultiu cel·lular per a simular l'enduriment o canvis en la ECM

La majoria dels estudis sobre la IPF *in vitro* s'han dut a terme emprant cultius convencionals en plaques de plàstic. Els sistemes de cultiu estàndard presenten una sèrie de limitacions, principalment la pèrdua parcial de les funcions cel·lulars degut a l'ús d'un microentorn no fisiològic (superfícies planes, en 2D i sintètiques), així com la sobreesimplificació del context biològic artificial que pot portar a resultats enganyosos. No obstant, hi ha diversos sistemes de cultiu alternatius basats en gels que reproduïxen les propietats mecàniques i la dimensionalitat dels teixits *in vivo*.

Els gels de matrius natives es formen mitjançant la gelificació de components naturals de la ECM, els quals s'han purificat a partir de teixits animals (muri, boví...), com per exemple fibrina, col·lagen, o una mescla de col·lagen, laminina i altres proteïnes anomenada Matrigel. S'utilitzen per a crear substrats de cultiu en dues o tres dimensions (2D o 3D) [113]. Per exemple el col·lagen tipus I purificat dels teixits es pot reconstituir en una matriu fibril·lar incrementant el pH i la temperatura d'una solució precursora [102]. Així, es poden obtenir cultius 3D, els quals proporcionen a les cèl·lules unes condicions més fisiològiques que les dels cultius tradicionals, ja que contenen les senyals de la ECM i la tridimensionalitat de teixit. A més permeten un major control de les variables, són més econòmics i requereixen menys temps que els models animals.

Una altra opció interessant en el context de les malalties de la mecanobiologia com la IPF és cultivar les cèl·lules en substrats de rigidesa modulable mitjançant substrats polimèrics sintètics. Un sistema àmpliament utilitzat són els hidrogels de poliacrilamida (PAA) [6, 114-116]. Aquests gels es poden recobrir amb proteïnes de la ECM per a proporcionar un substrat biològicament rellevant, amb la duresa apropiada (normal) o incrementada. Aquest sistema permet controlar i separar les senyals químiques de les físiques, a més de la puresa. El gel de poliacrilamida és inert com a superfície adhesiva, pel que les molècules de la ECM s'hi han d'adherir covalentment per a proporcionar lligands a les cèl·lules [113]. La rigidesa dels gels de poliacrilamida es pot variar al llarg del rang fisiopatològic al canviar la concentració de la bis-acrilamida mentre que es manté la concentració d'acrilamida

Un sistema d'implementació més recent és el de les matrius de pulmons descel·lularitzats (normals o amb IPF). Després d'un procés de descel·lularització, els teixits mantenen una estructura 3D rica en

ECM. Es tracta d'una matriu més fisiològica i completa. Aquest teixit descel·lularitzat es pot tallar en llesques amb un vibratom per a crear substrats que retenen la duresa nativa i la composició de la matriu [105]. No obstant, és un procés més car i que requereix temps i disponibilitat d'animals.

4.3 Genòmica i perfilat d'alt rendiment de l'expressió gènica

L'aplicació de les aproximacions "òmiques", incloent anàlisi de RNA codificant i no codificant, l'epigenoma i el microbioma, han permès avançar en els mecanismes, el diagnòstic i el tractament de la IPF [52].

Els microarrays de DNA (o xips de DNA) estan formats per una superfície sòlida a la qual s'hi han unit una sèrie de fragments de DNA disposats en forma de matriu. A cada punt de la matriu hi ha uns fragments (o sondes) amb una seqüència concreta corresponent a un gen particular. La mostra que es vol analitzar es marca amb alguna molècula detectable o un fluoròfor, i el nivell d'unió (o hibridació) de les seqüències diana de la mostra a les sondes del microarray es quantifiquen mesurant la senyal emesa mitjançant un escaneig. Aquesta senyal proporciona una mesura de l'expressió gènica [117]. És una tecnologia d'alt rendiment, ja que permet mesurar en paral·lel i de forma ràpida els nivells d'expressió de tots els gens del genoma forma simultània. Habitualment s'utilitzen per identificar gens que produeixen certes malalties mitjançant la comparació dels nivells d'expressió entre mostres sanes i mostres que estan desenvolupen la malaltia. Els clàssics estudis de perfilat de l'expressió gènica amb microarrays han servit per analitzar des de petits nombre de mostres fins a grans cohorts, permetent la identificació de múltiples gens rellevants [52].

La font més habitual d'estudis genòmics és el teixit pulmonar de pacients, el qual s'extreu pel diagnòstic en el moment de fer una biòpsia, o en una autòpsia. L'inconvenient és la poca disponibilitat de mostres (pocs individus afectats i mètodes invasius) [118]. Un altre repte és aconseguir mostres control, ja que rarament s'obtenen mostres de pulmons normals. Així, els teixits control s'obtenen freqüentment de pulmons histològicament normals en zones allunyades de tumors o de pulmons de donants rebutjats pel transplantament [118].

Una altra aproximació és estudiar en cultiu les cèl·lules primàries aïllades dels pulmons [119, 120]. Les cèl·lules més emprades són els fibroblasts primaris de pulmó, cultivats *ex vivo* sota diverses condicions. Altres mostres més fàcils d'obtenir són les cèl·lules sanguínies (inflamatòries, fibròcits), interessants per la identificació de biomarcadors, o del rentat bronco-alveolar [118].

Es poden distingir dues estratègies en l'anàlisi i la interpretació de les dades genòmiques obtingudes mitjançant les tecnologies de perfilat d'alt rendiment. L'aproximació més comuna per analitzar és centrar-se en gens individuals i després comprovar la seva importància mitjançant assaigs *in vitro* i *in vivo* [121]. Aquests estudis han millorat la comprensió de la malaltia i han identificat candidats terapèutics potencials. Una estratègia complementària emergent és la biologia de sistemes. Aquesta s'utilitza per a estudiar els patrons globals de l'expressió gènica per identificar tendències i correlacions

amb altres processos. La biologia de sistemes pot ser més informativa però és una eina més complexa i que requereix eines computacionals més avançades [122].

Les tecnologies de perfilat d'alt rendiment tenen aplicacions potencials per al diagnòstic, la prognosi i l'estudi de la patogènesi de la IPF. En quant a facilitar el diagnòstic, s'han realitzat diversos estudis per buscar signatures d'expressió gènica específiques de malaltia que distingissin la IPF d'altres formes de ILD. Així, s'han comparat els perfils d'expressió de teixit pulmonar de pacients amb IPF, EAA i pneumònia intersticial no específica, trobant que en la IPF els gens enriquits eren proteïnes de la ECM, de creixement i de diferenciació cel·lular mentre que en la EAA eren els gens inflamatoris [99]. En un altre estudi emprant teixit pulmonar, es van intentar identificar els patrons d'expressió gènica comuns i distintius de la fibrosi pulmonar associada a l'esclerosi sistèmica i de la IPF, veient que un 70% dels gens que distingien la IPF i la fibrosi associada a esclerosi dels pulmons normals eren compartits, i que per tant es distingien només per un nombre petit de gens [123]. Per altra banda, un altre grup va identificar els canvis en l'expressió gènica entre els casos familiars i esporàdics de IPF a partir de mostres de teixit [124].

Pel que fa a l'aplicació dels microarrays en la prognosi de la IPF, les aproximacions genòmiques s'han emprat per a comparar els pacients que exhibeixen predictors clínics de mortalitat i els que no [118]. Per exemple els pacients amb IPF i hipertensió pulmonar tenien un enriquiment en gens de les vies de TGF- β i PDGF [125]. També es va poder identificar una signatura diferent en pacients amb un curs ràpid de la malaltia (menys de 6 mesos de símptomes abans del diagnòstic)[126].

Addicionalment, els estudis amb microarrays han servit per a guanyar coneixement sobre la patogènesi de la IPF. La majoria d'estudis han descrit factors que promouen l'acumulació de fibroblasts en el pulmó i que posteriorment s'han validat a nivell biològic. Per exemple es va descriure com els nivells d'expressió de MMP-7 eren superiors el teixit del pulmó amb IPF [100]. En un altre estudi amb teixit pulmonar es van trobar 178 gens que distingien els pulmons normals i amb IPF i es van centrar en el factor secretat osteopontina, descobrint que augmentava la proliferació i la migració en fibroblasts i cèl·lules alveolars [98]. En un treball que va analitzar l'expressió gènica de diferents tipus cel·lulars obtinguts mitjançant la microdissecció del teixit per làser, es va confirmar l'expressió de MMP-7 i osteopontina a l'epiteli adjacent als focus fibroblàstics [127]. Un altre treball va identificar 350 gens que variaven de manera significativa en fibroblasts aïllats dels pulmons, amb nivells augmentats de Wnt5a, que actuaria a favor de la proliferació i en contra de l'apoptosi d'aquestes cèl·lules [120]. Un altre grup va estudiar mitjançant tècniques genòmiques la hipòtesi que en la IPF es produeixen anormalitats en la vascularització i van identificar en els focus fibroblàstics dels pulmons el factor derivat de l'epiteli pigmentari, una proteïna angiostàtica [128]. Per últim, també es va identificar en el pulmó amb IPF un enriquiment en l'expressió de twist 1, un factor de transcripció implicat en la EMT [129].

En un exemple d'aproximació mitjançant biologia de sistemes, es va fer un anàlisi global de l'expressió gènica en el pulmó amb IPF i van demostrar que hi havia un enriquiment en gens associats al

desenvolupament com per exemple els de les vies de Wnt i TGF- β . Així, van suggerir que la IPF podria ser una recapitulació patològica del desenvolupament embrionari, un procés que normalment es troba inhibit en adults [94].

Per tant, les aproximacions genòmiques a la IPF han perseguit la identificació de gens i xarxes gèniques que puguin promoure el desenvolupament de la fibrosi [118]. No obstant, mentre que la creixent disponibilitat de dades precedents de les tècniques "òmiques" és esperançadora, aquesta no s'ha traduït encara en aproximacions a la medicina personalitzada que siguin més precises i predictives [52]. A més, cal destacar que aquests estudis han ignorat els aspectes mecànics de la IPF.

4.4 Aproximacions genòmiques a la biomecànica en la fibrosi

Per tal d'explotar terapèuticament les anormalitats biomecàniques de les malalties d'una manera sistemàtica aquestes s'han de definir a nivell molecular. L'estratègia dominant per a la identificació d'anormalitats moleculars ha sigut els cribratges que comparen, mitjançant tecnologies d'alt rendiment, el perfil d'expressió o l'epigenètica de mostres de la malaltia i mostres control. Com a resultat s'han obtingut llargues llistes de diferències moleculars, les quals dificulten el poder prioritzar aquestes potencials dianes i centrar-se en les més importants [130, 131].

Tot i que la informació obtinguda d'aquesta manera ha ampliat el coneixement sobre les malalties, no és òptim pel que fa a les malalties de la mecanobiologia com la IPF perquè no ens revelen les funcions biomecàniques de les alteracions moleculars que s'identifiquen. De fet, no està clar si la informació que s'obté pels cribratges convencionals és específica de funció, és a dir és a dir si està relacionada amb una resposta funcional [130-132]. Segons alguns autors aquesta podria ser una de les limitacions associades a la baixa eficiència que en general tenen els cribratges moleculars per la identificació de dianes terapèutiques útils en malalties complexes com la IPF [130]. Per altra banda, cada cop hi ha més consciència que les malalties complexes podrien reflectir l'alteració de les vies de regulació que controlen l'homeòstasi cel·lular i tissular enlloc de provenir simplement del mal funcionament de gens aïllats [130-132].

Així, hi ha una necessitat de desenvolupar estratègies de cribratge innovadores que siguin útils per identificar candidats terapèutics biomecànics en malalties de mecanotransducció i de proporcionar una comprensió més clara sobre les xarxes regulatòries afectades en l'etiologia d'aquestes malalties.

En un estudi que es va centrar en les diferències transcripcionals i traduccionals entre fibroblasts controls i de IPF van veure que els fibroblasts mantenien uns perfils d'expressió diferents en cultiu. A més, van cultivar en matrius de col·lagen de diferent duresa els fibroblasts fibròtics, els quals van exhibir patrons alterats en el reclutament dels ribosomes [133]. Això els hi va permetre emprar el poder de l'anàlisi del genoma a nivell de sistemes per a aportar dades mecanístiques sobre una malaltia fibròtica com la IPF, en aquest cas la identificació d'alteracions en el control de la traducció de proteïnes, la qual va ser dependent de la matriu de col·lagen. No obstant, no es van identificar gens concretament mecanosensibles

. Per comprovar si dureses creixents promouen l'expressió d'un programa fibrogènic, en un altre treball van cultivar fibroblasts normals de pulmó de 3 donants en substrats de 5 dureses diferents (0,1 - 25,6 kPa) i mitjançant un perfilat transcripcional van identificar 124 gens que responien a la duresa. Van concloure que l'enduriment de la matriu activa un programa d'expressió gènica que porta a la proliferació dels fibroblasts i que suprimeix els gens que codifiquen per enzims degradadors de col·lagen. A més es van centrar en el gen de la ciclooxigenasa 2, que atenuava la seva expressió amb rigideses creixents [6].

Malgrat l'existència d'alguns estudis, encara es té una comprensió reduïda dels aspectes aberrants en la mecanobiologia dels fibroblasts i concretament dels miofibroblasts de la IPF, l'estudi dels quals és un repte i alhora una oportunitat per avançar en el coneixement d'aquesta patologia i les possibilitats de prevenir-la o aturar-ne el desenvolupament.

Objectius

OBJECTIU PRINCIPAL

Desenvolupar un cribratge biomecànic aplicable a les patologies associades a un enduriment anormal del teixit, i utilitzar-lo en la IPF per identificar nous processos regulatoris i potencials dianes terapèutiques o biomarcadors.

OBJECTIUS ESPECÍFICS

1. Disseny i optimització d'un sistema de cribratge biomecànic
 - 1.1. Optimitzar un mètode de cultiu sobre substrats de diferents rigideses (3D o 2D) que permeti simular el rang fisiopatològic d'interès i mantenir les propietats dels fibroblasts fora del pulmó i que alhora sigui adequat per a un cribratge d'alt rendiment, minimitzant els costos, temps i variabilitat.
 - 1.2. Establir el disseny més adequat per a l'estratègia de cribratge biomecànic, incloent el tipus de cèl·lules, nombre de mostres i tipus de substrats.
2. Determinar, mitjançant l'anàlisi bioinformàtic de microarrays d'expressió, els perfils transcripcionals de fibroblasts primaris de tres classes de pacients (control, fibròtic i fibròtic no IPF) cultivats en gels de poliacrilamida (PAA).
3. Anàlisi del cribratge biomecànic per a determinar els gens i les anotacions funcionals que siguin mecanosensibles i específiques de la IPF. Definir el transcriptoma mecànic, que anomenem "mecanotranscriptoma", dels fibroblasts de pulmó i les alteracions específiques d'aquest en fibroblasts de IPF.
4. Identificar potencials dianes moleculars i/o biomarcadors a través de la validació experimental de les signatures específiques de la IPF.
5. Caracterització selectiva a nivell biològic d'alguna de les dianes identificades. Estudi de la seva regulació mitjançant el TGF- β o receptors de la ECM.

Mètodes

1. FIBROBLASTS DE PULMÓ

1.1 Fibroblasts pulmonars de línia cel·lular

Els fibroblasts humans de pulmó de la línia CCD19-Lu (ATCC número CCL-210) van ser adquirits a través de l'*American Type Cell Collection*. Les cèl·lules es van usar entre els passatges 3 i 10 per tal de garantir un fenotip estable.

1.2 Fibroblasts pulmonars primaris

L'obtenció de les mostres procedents de pacients va ser possible a través de la col·laboració amb els Serveis de Pneumologia, Oncologia Mèdica, Cirurgia Toràcica i Patologia de l'Hospital Clínic de Barcelona. Els estudis van ser aprovats pels comitès ètics de l'Hospital Clínic de Barcelona i de la Universitat de Barcelona i tots els pacients havien donat prèviament el seu consentiment informat.

Les mostres de pulmons control es van obtenir a partir de pacients amb pneumotòrax o amb càncer de pulmó. Els pacients amb pneumotòrax es van sotmetre a una pleuròdesi quirúrgica per al tractament de pneumotòrax espontanis recorrents. Els pacients amb càncer de pulmó estaven afectats per un carcinoma de pulmó de cèl·lula no petita i es van sotmetre a una resecció quirúrgica curativa. En aquest cas es van utilitzar porcions de teixit lliure de tumor a partir del lobus pulmonar reseccionat, el qual es trobava almenys a 5 cm de distància respecte a la massa tumoral.

Les mostres de pulmons amb fibrosi pulmonar es van obtenir a partir de pacients diagnosticats amb IPF, AAE crònica o COP fibrosant. Els teixits van ser obtinguts per biòpsia pulmonar quirúrgica amb videotorascòpia amb l'objectiu de realitzar els diagnòstics histològics.

Tots els fibroblasts primaris de pulmó es van obtenir a partir d'explants de teixit seguint un protocol descrit anteriorment per Gabasa i col·laboradors [134, 135]. Per als experiments els fibroblasts es van utilitzar entre els passatges 4 i 6.

1.3 Cultius cel·lulars

Els fibroblasts CCD-19Lu i els fibroblasts primaris es van mantenir en medi de cultiu compost per Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) complementat amb 10% de sèrum boví fetal (FBS)(Gibco), 100 UI/mL de penicil·lina, 100 µg/mL d'estreptomicina, 2,5 µg/mL d'amfotericina B (Sigma) i 1X d'insulina-transferrina-seleni-A (ITS) (Gibco).

2. GELS DE COL·LAGEN 3D

La preparació de gels de col·lagen 3D es va dur a terme en fred (sobre gel) i en condicions estèrils, en una cabina de flux laminar. Es va utilitzar col·lagen de tipus I procedent de dermis bovina en forma de solució àcida a una concentració del 0,5% (Koken). La solució es va diluir amb DMEM a una concentració final de col·lagen de 4 mg/ml i es va neutralitzar amb NaOH, ajustant el pH al voltant de 7,5.

Tot seguit es va recobrir el fons dels pous de plaques de 24 pous amb una fina capa de gel de col·lagen, per tal que quan posteriorment es diposités el col·lagen amb les cèl·lules no quedessin en contacte directe amb el plàstic i les cèl·lules no poguessin detectar l'elevada duresa del plàstic. Es va mesclar la quantitat de cèl·lules adient amb el col·lagen per tal de sembrar 200.000 cèl·lules per gel. La mescla homogeneïtzada es va dipositar en els pous de la placa multi-pous prèviament recoberts. Per gelificar el col·lagen es va mantenir en un incubador de cultius a 37°C durant 30 minuts i aleshores es va afegir el medi de cultiu sense sèrum (SFM) i complementat amb 0,25 mM d'àcid L-ascòrbic (Sigma).

Al cap de 24 hores, alguns dels gels es van desenganxar de les parets del voltant suaument amb l'ajuda d'una espàtula estèril. Es va canviar el medi per, segons correspongués, medi amb o sense TGF- β 1 (R&D Systems) a una concentració final de 5 ng/ml. Els cultius es van mantenir durant 4 dies més en aquestes condicions.

3. GELS DE POLIACRILAMIDA

3.1 Preparació de gels de poliacrilamida

Per a la preparació de gels de poliacrilamida es van seguir la base del mètode publicat per Yeung [136], que ha estat àmpliament utilitzat en el camp de la biomecànica [9]. Es van optimitzar les condicions metodològiques per tal d'adaptar el mètode a les nostres necessitats.

El procés global des de la preparació dels gels fins al cultiu cel·lular es recull en la figura 8.

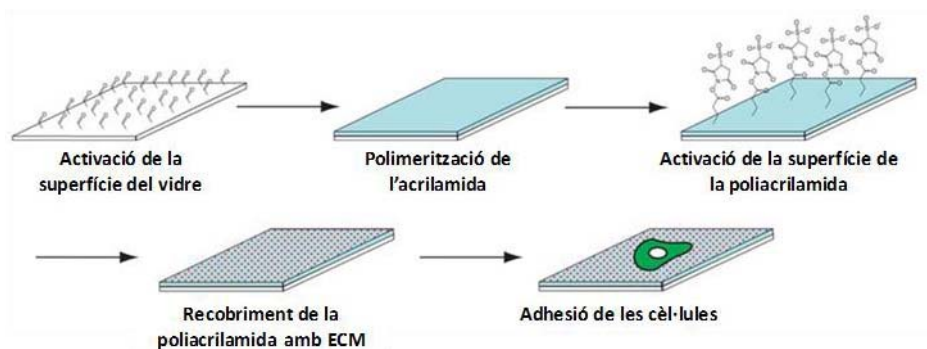


Figura 8. Representació de la preparació de gels de PAA i el recobriments amb ECM (Adaptat de [137]).

Els gels de diferents dureses definides es van preparar a partir polimerització d'una solució d'acrilamida i bis-acrilamida entre dos cobeobjectes de vidre de 33 mm de diàmetre, formant un sandvitx.

Prèviament els cobeobjectes de vidre van ser modificats químicament per permetre la correcta polimerització i adhesió de la poliacrilamida i la posterior separació dels vidres del gel. El cobeobjectes inferior es va tractar amb una solució de 3-(Trimetoxisilil)propil metacrilat (Sigma) per permetre d'adhesió permanent de la poliacrilamida després de la polimerització. Per altra banda el vidre superior es va tractar amb *Repel Silane* (Amersham) per tornar-lo hidrofòbic i permetre la seva separació del gel un cop polimeritzat.

Es van preparar solucions de concentracions variables d'acrilamida i bis-acrilamida (BioRad) Les proporcions (%) de acrilamida i bisacrilamida per cada duresa es recullen en la taula 4.

Duresa (kPa)	0,5	1,2	5,2	21,1	33,6
Acrilamida (%)	3,0	7,5	7,5	12,0	12,0
Bis-acrilamida (%)	0,22	0,04	0,15	0,34	0,60

Taula 4. Proporcions d'acrilamida i bis-acrilamida per la preparació de gels de PAA.

Per fer polimeritzar les solucions es va afegir 0,05% de persulfat d'amoni (Bio-Rad) i 0,05% de tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma) i es van barrejar bé les mesclures. Immediatament després es van pipetejar 200 µL de solució al centre de cada cobreobjectes de inferior i es va tapar curosament amb el cobreobjectes superior. Es va deixar que les solucions polimeritzessin durant 1 hora a temperatura ambient i cobrint el sandvitx amb una placa de plàstic per protegir de l'exposició a l'oxigen i evitar que aquest pogués inhibir la polimerització [138]. Un cop acabada la polimerització, es van cobrir els sandvitxos amb PBS i es va aixecar el cobreobjectes de dalt amb l'ajut d'unes pinces.

Per a cada experiment es va mesurar el mòdul elàstic de Young de dos dels cinc gels mitjançant microscòpia de força atòmica.

3.2 Mesures de microscòpia de força atòmica

El mòdul elàstic de Young (E) dels gels de poliactilamida es va mesurar mitjançant un microscopi de força atòmica (AFM). Es va usar un microscopi de força atòmica acoblat a un microscopi invertit tal i com s'ha descrit prèviament [9]. Breument es van realitzar mesures de força-desplaçament (F-z) usant micropalanques de baixa constant elàstica ($k=0,03$ N/m) (Microlever, Veeco). Es van calcular les corbes de força-indentació (F- δ) corresponents a les corbes F-z. Es va ajustar un model de contacte elàstic adequat a la geometria de la punta de la micropalanca a les corbes de F- δ , sent E un paràmetre de l'ajust. Finalment es va obtenir E i la indentació sobre la mostra a partir de les corbes F-z, tal i com es va descriure anteriorment [9] mitjançant el programa Matlab® 7.0 (The MathWorks).

3.3 Recobriment dels gels amb col·lagen de tipus I

La superfície dels gels de poliactilamida no és un material adequat per cultivar-hi cèl·lules, donat que la poliactilamida és químicament inert. Per aquest motiu s'hi ha d'unir molècules de la ECM, com per exemple col·lagen o fibronectina, les quals permetran l'adhesió cel·lular. Atesa la gran quantitat de gels de poliactilamida a preparar, es van provar diferents mètodes de recobriment per tal d'identificar-ne el més adequat en termes de qualitat del recobriment i temps consumit.

3.3.1 Sulfo-SANPAH:

Es va derivatitzar la superfície dels gels de poliactilamida amb l'agent entrecruant heterobifuncional N-Sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino) hexanoat (Sulfo-SANPAH) (Proteochem). Es van aplicar 200 µl d'una solució 4 mM de Sulfo-SANPAH sobre els gels i es va fotoactivar mitjançant l'aplicació de llum ultravioleta (254 nm) a una distància d'aproximadament 2 cm de la superfície dels

gels durant 10 minuts. Aleshores els gels es van rentar amb HEPES o PBS per eliminar el Sulfo-SANPAH no unit i es van esterilitzar amb llum ultravioleta durant 20 minuts. Finalment es van incubar els gels amb una solució 0,1 mg/mL de col·lagen de tipus I (Millipore) a 4°C i durant 18 hores.

3.3.2 NHS-acrilat

El compost N-hidroxisuccinimidil (NHS) s'incorpora al 20% en la mescla d'acrilamida i bis-acrilamida abans de la inducció de polimerització de la poliactilamida. Aleshores, el NHS co-polimeritza amb l'acrilamida i la bis-acrilamida i queda incorporat en el gel. Finalment es van incubar els gels amb una solució 0,1 mg/ml de col·lagen de tipus I (Millipore) a 4°C i durant 18 hores.

3.3.3 Acrilamida carregada positivament

El compost clorur d'acrilamidopropil-trimetilammoni (Sigma-Aldrich) es va barrejar amb l'acrilamida normal en una relació de 70% d'acrilamida normal amb 30% de d'acrilamidopropil-trimetilammoni. Posteriorment es va procedir a preparar els gels de poliactilamida com descrit anteriorment. El clorur d'acrilamidopropil-trimetilammoni introdueix una càrrega positiva en el gel que permet la unió de proteïnes. Finalment es van incubar els gels amb una solució 0,1 mg/ml de col·lagen de tipus I (Millipore) a 4°C i durant 18 hores.

3.4 Cultiu dels fibroblasts en els gels de poliactilamida

Un cop es van preparar gels de poliactilamida i es van recobrir amb ECM, s'hi van cultivar les cèl·lules. Es van fer servir dos suports diferents per cultivar les cèl·lules sobre els gels de poliactilamida.

En la fase d'obtenció d'RNA per a l'estudi de microarrays, es va voler delimitar la zona d'adhesió de les cèl·lules exclusivament a la superfície del gel, ja que el microarray és una tècnica tan sensible que volíem assegurar-nos que totes les cèl·lules estiguessin cultivades sobre la superfície del gel i no en el vidre que envolta el gel, el qual té un E molt per sobre de l'ordre de magnitud dels gels de poliactilamida. Per això es va fixar un anell de polipropilè estèril mitjançant el greix *vacuum grease* (DowCorning) al voltant de cada gel de poliactilamida. Els gels amb l'anell es van introduir en una placa de cultiu de 34 mm (figura 9). En la fase de validació dels resultats dels microarrays i de caracterització de les dianes, donada l'elevada quantitat de material requerida i en conseqüència de cultius a realitzar, es va establir un sistema en el que els gels de poliactilamida es van introduir en els pous de plaques de 6 pous. D'aquesta manera es podien realitzar cultius a una escala major.

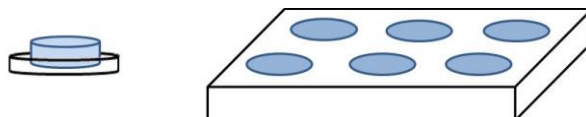


Figura 9. Sistema de cultiu en gels de PAA, amb plaques individuals o multi-gel.

En tots els sistemes el protocol de cultiu va ser el mateix. Els fibroblasts es van sembrar sobre els gels de poliactilamida recoberts de col·lagen tipus I a una densitat de $8 \cdot 10^3$ cèl·lules/cm². Es van sembrar en SFM complementat amb 0,25 mM d'àcid L-ascòrbic (Sigma) i durant 5 dies, mentre que no s'indiqui

d'una altra manera. Després de 4 hores, un cop les cèl·lules s'havien adherit completament i presentaven la seva morfologia allargada característica, es va afegir 2,5 ng/ml de TGF- β 1 (R&D Systems). El medi es va renovar cada 2-3 dies.

3.5 Inhibició del receptor I de TGF- β

Es va emprar l'inhibidor de la tirosina quinasa del receptor I de TGF- β (TGFBR1), LY364947 (Calbiochem), concentracions a (3 μ g/ml) o vehicle (DMSO).

3.6 Inhibició de la integrina β 1

Per inhibir la funció de les integrines β 1 dels fibroblasts cultivats en els gels de poliacrilamida, es va usar l'anticòs bloquejant de la funció integrina β 1 AIB2, generosament prestat per la Dra. Valerie Weaver de la *University of California San Francisco*. Com a control negatiu es va emprar una IgG1 de rata del mateix isotip (Becton Dickinson). Els fibroblasts es van cultivar en presència de 3 μ g/ml de AIB2 o de IgG control.

4. ZIMOGRÀFIA

El medi condicionat pels fibroblasts es va recollir i després d'afegir-hi l'inhibidor de proteases Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche) es va concentrar mitjançant un sistema d'ultrafiltració Amicon® (Millipore), el qual es va seleccionar amb una mida de porus que permetés retenir totes les metal·loproteïnases que es podrien detectar.

Posteriorment les mostres es van separar per electroforesi en gels de gelatina al 10% (Invitrogen) durant 90 minuts a 125 volts. Es van renaturalitzar les proteïnes amb el tampó renaturalitzant (Invitrogen) i finalment revelar l'activitat gelatinasa amb tampó desenvolupador (Invitrogen) a 37 °C durant 18 hores. Com a control negatiu es va afegir EDTA a 10 mM al tampó desenvolupant.

Els gels dels zimogrames es van tenyir amb blau de Coomassie i es van escanejar. Es va fer un anàlisi densitomètric mitjançant Image J (National Institutes of Health) [139].

5. EXTRACCIÓ D'RNA

5.1 Preparació de lisats cel·lulars

Els gels de col·lagen sencers contenint les cèl·lules es van homogeneïtzar amb el tampó de lisi RLT (Qiagen) i un 0,05% de β -mercaptoetanol en agitació forta durant 20-30 minuts. D'altra banda, els fibroblasts sobre els gels de poliacrilamida es van lisar usant tampó de lisi RLT (Qiagen) amb un 0,05% de β -mercaptoetanol i es van ajuntar els lisats procedents dels replicats experimentals. Els lisats cel·lulars es van mantenir en fred immediatament després de la lisi.

5.2 Purificació de l'RNA

Es van homogeneïtzar els lisats dels fibroblasts mitjançant una columna QIAshredder (Qiagen). Posteriorment es va utilitzar el RNeasy mini kit (Qiagen), a través de la centrifugacions seqüencials en columnes fins a aïllar i purificar l'RNA total en aigua lliure d'RNAses.

5.3 Control de qualitat i quantificació de l'RNA

La concentració i el nivell de puresa de cada mostra de RNA obtinguda es va determinar mitjançant espectrofotometria amb un Eppendorf Biophotometer (Eppendorf) o un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). L'absorbància a 260 nm permet la quantificació del RNA (un valor d' A_{260} igual a 1 equival a 40 µg/mL d'RNA, mentre que els quocients d'absorbància A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} proporcionen informació sobre la puresa de la mostra de RNA.

El RNA per l'estudi amb microarrays a més, va ser analitzat per determinar la seva integritat mitjançant el kit Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) i l'aparell Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

6. PCR QUANTITATIVA EN TEMPS REAL

Quantitats iguals de RNA de cada mostra es van utilitzar per sintetitzar cDNA a partir del RNA purificat mitjançant el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) i seguint les instruccions del fabricant.

Els reactius per fer la transcripció inversa, incloent el tampó RT, la mescla de dNTP, els encebadors aleatoris, la transcriptasa inversa MultiScribe™ Reverse Transcriptase i inhibidors d'ARNases, es van mesclar amb les mostres de RNA i la reacció es va dur a terme en un termociclador (Techne) a 37 °C durant 2 hores i 15 minuts.

Les reaccions de PCR en temps real (RT-PCR) es van dur a terme per triplicat usant la TaqMan® Gene Expression Master Mix i parells TaqMan® d'encebadors i sondes específics per a cada gen (Taqman® Gene Expression Assay, Applied Biosystems). Les reaccions de PCR es van fer durant 40 cicles (15 segons a 95°C i 1 minut a 60°C) en un termociclador 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

L'expressió gènica relativa es va calcular usant el mètode comparatiu Ct. Es va fixar un llindar comú en la fase exponencial de les corbes d'amplificació de la PCR per a cada gen i el valor corresponents al cicle llindar (Ct) es va obtenir i promitjar pels replicats. Es va calcular l'expressió gènica relativa en relació al gen endogen de referència (POLR2, ARN polimerasa II) com a $2^{-\Delta Ct}$ [140].

Les referències dels assaigs Taqman® Gene Expression Assay emprats estan recollits en la taula següent:

Gen (Símbol)	Referència assaig Taqman®
COL1A1	Hs00164004_m1
DUSP10	Hs00200527_m1
GREM1	Hs01879841_s1
IGFBP3	Hs00426289_m1
MAMDC2	Hs00299196_m1
MMP1	Hs00233958_m1
MMP2	Hs01548724_m1
MMP7	Hs00159163_m1
PAPPA	Hs01032307_m1
POL2R	Hs00172187_m1
VCAN	Hs00171642_m1
WFDC1	Hs00221849_m1

Taula 5. Sondes Taqman® emprades per a la RT-PCR.

7. MICROARRAYS D'RNA

7.1 Processat dels microarrays

El processat de l'RNA i la hibridació dels microarrays es va dur a terme a les instal·lacions de la Plataforma de Genòmica de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

A partir de 100 ng d'RNA total de cada mostra es van marcar i fragmentar mitjançant el kit 3'IVT Express Kit (Affymetrix) en l'aparell Biomek FXP (Beckman Coulter). El procediment es basa en l'amplificació lineal del RNA utilitzant la tecnologia de transcripció inversa (RT-IVT). Partint d'un RNA de bona qualitat, es fa una reacció de transcripció inversa i es sintetitza una primera cadena de DNA complementari (cDNA), que posteriorment és convertit en cDNA de doble cadena. Aquest cDNA de doble cadena s'utilitza com a motlle per a la transcripció *in vitro* (IVT), a través de la qual es sintetitza el aRNA (o cRNA) amb la incorporació de nucleòtids marcats amb biotina. L'RNA marcat és purificat mitjançant esferes magnètiques i analitzat quantitativament (mitjançant Nanodrop) i qualitativament (mitjançant Bioanalyzer 2100), i finalment és fragmentat abans de la seva hibridació sobre la placa dels *arrays*.

Per a cada mostra, es van emprar 6 µg del RNA marcat i fragmentat obtingut, per a la hibridació sobre cada microarray de la placa *Genome U219 Array Plate* (Affymetrix) mitjançant el kit *Hybridization, Wash, and Stain Kit*. La hibridació es realitza a 45 °C durant 16 hores i un cop finalitzada es procedeix als rentats i al processament dels microarrays mitjançant una estació fluídica.

Finalment es van escanejar les imatges dels microarrays en un aparell *Gene Titan* (Affymetrix) d'acord amb el protocol estàndard d'Affymetrix. Les imatges són visualitzades a través d'un ordinador i analitzat mitjançant un software per a comprovar que han passat tots els controls de qualitat d'Affymetrix.

7.2 Control de qualitat i anàlisi bioinformàtic

L'anàlisi bioinformàtic dels microarrays es va realitzar amb la col·laboració del grup d'Alexandre Perera, de la Universitat Politècnica de Catalunya, i utilitzant algorismes desenvolupats per aquest grup.

Les dades dels microarrays es van preprocessar usant la funció `expresso` del paquet de R `affy` [141]. El soroll de fons es va corregir mitjançant el mètode robust multi-array average (RMA) [142]; la normalització de les dades es va realitzar seguint el mètode quantiles [143]. Es van aplicar un filtre de variabilitat (rang interquartil de les sondes $\geq 0,5$) i un llindar d'intensitat (nivell d'intensitat per sonda $\geq \log_2(100)$ en com a mínim el 25% de les mostres). Es va usar el false discovery rate (FDR) com a mètode de correcció de test múltiple per a la significança estadística.

L'objectiu del model de mecanosensibilitat va ser trobar els gens l'expressió dels quals es veu modificada per variacions en la duresa del substrat. Es va ajustar un model mixt linear seguint l'expressió [141]

$$y_{ijkl} = (\beta S)_{ik} + (Zu)_{ijl} + e_{ijkl}$$

On y_{ijk} és la intensitat de la sonda i , pacient j , duresa k i classe l . Els efectes aleatoris (variable u) es van considerar com a aniuats, on els pacients estan associats a una classe (Control, IPF, ILD no IPF). La variable S_k fa referència a una mesura de la duresa del substrat. Hi ha un pendent (paràmetre β) per a cada sonda. La variable e_{ijk} conté els residuals del model. Per a cada model es va realitzar un test estadístic avaluant si el paràmetre β era diferent de 0 i les sondes significatives es van considerar com sensibles a la duresa (mecanosensibles).

Per a identificar els gens que distingien classes es va realitzar un t-test aparellat de dues cues per a cada comparació entre dues classes i per cada gen.

L'interactoma es va construir mitjançant *data mining* les interaccions entre gens usant l'eina bioinformàtica STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) [144]. STRING és una base de dades d'interaccions entre proteïnes. Les interaccions són inclouen associacions directes (físiques) i indirectes (funcionals) i són conegudes o predites a partir de diferents fonts: context genòmic, experiments d'alt rendiment, coexpressió i coneixement previ.

L'anàlisi de les dades per identificar gens que distingeixen classes, sense tenir en compte la rigidesa del substrat es va realitzar mitjançant un test ANOVA, utilitzant les 5 mostres de cada pacient com a rèpliques.

8. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNA PER ELISA

El medi condicionat de les cèl·lules (sobrenedant) es va complementar amb un còctel inhibidor de proteases (Merck), es va centrifugar per eliminar les restes de cèl·lules i es va concentrar usant columnes d'ultrafiltració Amicon (Millipore).

Les concentracions de les proteïnes IGFBP-3 i PAPP-A es van determinar mitjançant assaigs d'immunoabsorció lligats a enzims (ELISA) seguint les instruccions del fabricant (R&D Systems).

La concentració de les proteïnes es va normalitzar per densitat promig de cèl·lules en cada condició experimental al final de l'experiment. Per a determinar la densitat cel·lular, els nuclis de les cèl·lules es van tenyir amb Hoechst 33342 (Molecular Probes) mitjançant la incubació amb 0.2 µg/ml d'aquest colorant durant 20 minuts ens condicions estàndards de cultiu (37 °C, 5% de CO₂ i atmosfera humida). Es van prendre imatges per microscòpia de fluorescència amb un *Eclipse TE2000 microscope* (Nikon), un objectiu 10X i amb una càmera EM-CCD C9100a (Hamamatsu) i usant el software Metamorph (Molecular Devices). Per a cada condició experimental es van obtenir 10 imatges en posicions aleatoritzades i el número de nuclis en cada imatge es va analitzar mitjançant el programa Image J (National Institutes of Health) [139].

9. IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Els fibroblasts es van fixar amb paraformaldehid al 4% durant 20 minuts i es van permeabilitzar i bloquejar 0.2% de Tritó X-100 (Sigma) i 1% de BSA (Sigma) durant 1 hora.

Les cèl·lules es van incubar amb un anticòs primari contra DUSP-10 (Abcam), a una dilució 1/375 durant 18 hores a 4 °C i posteriorment amb un anticòs secundari conjugat a Alexa Fluor® 488 (Invitrogen), a una dilució 1/200, durant 2 hores a temperatura ambient. El DNA dels nuclis es va tenyir amb Hoechst 33342 (Molecular Probes).

Es van obtenir imatges de fluorescència en 9 posicions aleatòries de cada rèplica experimental amb un microscopi Eclipse TE2000 (Nikon) amb un objectiu 10X mitjançant una càmera EM-CCD C9100a (Hamamatsu) i el software Metamorph (Molecular Devices). Les imatges es van processar amb el software Image J (National Institutes of Health)[139]. Es va corregir la fluorescència de fons i es va determinar la intensitat total (I) i el número de cèl·lules (N) per cada imatge. Per a cada condició experimental, les dades de I en front de N es van ajustar per mínims quadrats a una funció lineal amb MATLAB (Mathworks) per calcular la intensitat de proteïna DUSP10 marcada per cèl·lula com al pendent ajustat.

10. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Les comparacions entre dos grups es van dur a terme mitjançant el test t d'Student, a menys que s'especifiqui el contrari. Es van considerar com a estadísticament significatives els p valors < 0,05. Els valors es mostren com a mitjana i desviacions estàndard o error estàndard de la mitjana.

Resultats

1. ESTUDI EXPLORATIU DE MARCADORS DEL MICROENTORN EN IPF MITJANÇANT GELS 3D DE RIGIDESA VARIABLE

Com a primera aproximació a la regulació mecànica de marcadors del microentorn en la IPF, es van cultivar fibroblasts primaris de pulmons normals (pneumotòrax) i de pulmons d'afectats de IPF dins de matrius tridimensionals de col·lagen de tipus I de rigidesa variable. Es van escollir els gels 3D de col·lagen atès que proporcionen un microentorn més fisiològic que els cultius 2D. Es van emprar dues dureses diferents mitjançant gels flotants (0,3 kPa) i gels adherits (0,8 kPa) al plàstic de les plaques de cultiu [9, 11, 45]. Els cultius es van mantenir durant tres dies i en presència o absència de TGF- β 1.

1.1 Expressió de components de la matriu extracel·lular fibròtica

Es va estudiar, mitjançant RT-PCR en temps real, l'expressió dels gens de la ECM col·lagen tipus 1 alfa 1 (COL1A1) i versicà (VCAN), els quals estan habitualment sobreexpressats en la fibrosi pulmonar, inclosa la IPF.

Quan a l'expressió de COL1A1, en les mostres de fibroblasts de IPF es van trobar majors nivells basals d'expressió que en els fibroblasts control, al voltant de 2 vegades més. Aquests resultats són consistents amb que la via d'expressió d'aquest gen es trobi augmentada en els fibroblasts fibròtics (figura 10).

En absència de TGF- β 1, es va observar un augment del 30% en l'expressió de COL1A1 amb la major duresa dels gels 3D en les cèl·lules control, i del 21% en les de IPF. Per tant l'expressió de COL1A1 és mecanosensible, un efecte que es va poder observar malgrat la reduïda diferència en la rigidesa dels gels flotants i adherits. En presència de TGF- β 1, l'enduriment de la matriu va comportar una major expressió de COL1A1 tant en fibroblasts control (61% d'increment) com en fibroblasts de IPF (112%). La combinació dels dos factors profibròtics, TGF- β 1 i enduriment, va permetre assolir una major expressió de COL1A1, observant-se per tant una resposta sinèrgica. El tractament amb TGF- β 1 va induir de manera potent, tal i com era d'esperar l'expressió de COL1A1 [145]. No obstant, aquest augment va dependre de la classe de fibroblasts, essent en fibroblasts control del 284% i del 117% en fibroblasts de IPF, en gels tous (flotants).

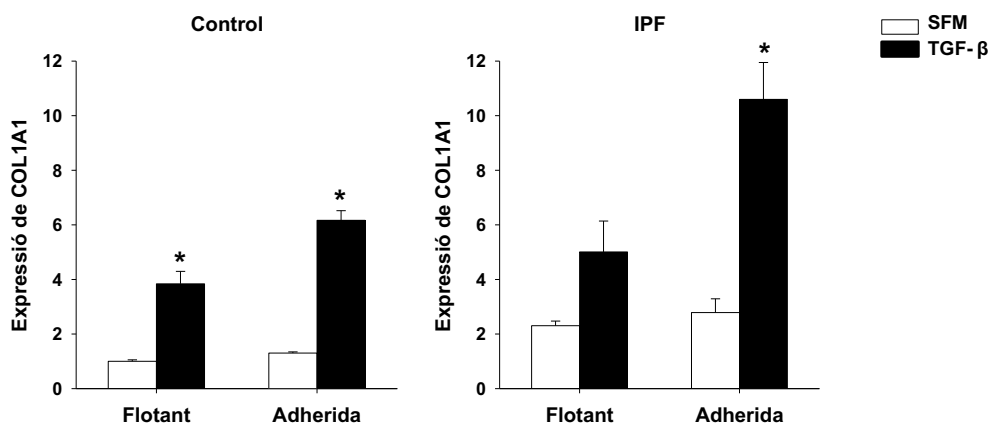


Figura 10. Nivells d'expressió de COL1A1 mesurats per RT-PCR. Es mostra el promig \pm SEM de n=3. * $p < 0,05$ respecte control flotant sense TGF- β 1.

Pel que fa a l'expressió del proteoglicà VCAN en condicions basals, es van trobar uns nivells 8 vegades superiors d'expressió en fibroblasts de IPF que en cèl·lules control (figura 11). El tractament amb TGF- β 1 va induir l'expressió de VCAN en totes les condicions. En fibroblasts control, la inducció va ser del $\sim 300\%$ i $\sim 400\%$ en gels flotants i adherits respectivament. En el cas dels fibroblasts de IPF aquesta inducció va ser menor que en fibroblasts control i va ser més reduïda en els substrats més rígids, gairebé un 50% menor. A diferència del COL1A1, no s'observà un efecte de mecanosensibilitat ni de sinèrgia entre la duresa i l'enduriment.

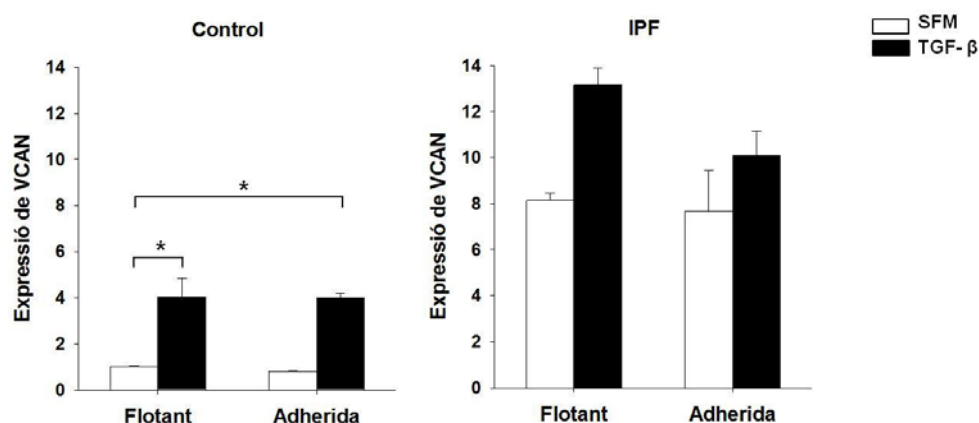


Figura 11. Nivells d'expressió de VCAN mesurats per RT-PCR. Es mostra el promig \pm SEM de n=3. * $p < 0,05$ respecte a flotant sense TGF- β 1.

1.2 Expressió de proteases de la matriu

Es va estudiar, mitjançant RT-PCR, l'expressió del mRNA de les proteases de la ECM MMP-1, MMP-2 i MMP-7, la sobreexpressió de les quals en la IPF ha estat extensament documentada en la literatura [100].

L'expressió de MMP-7 en els fibroblasts primaris va ser pràcticament indetectable per PCR quantitativa pel que no es van poder determinar els seus nivells, confirmant que aquest enzim és expressat per tipus cel·lulars del pulmó diferents dels fibroblasts [100].

Els nivells d'expressió de MMP-1 van ser al voltant de 6 vegades més elevats en IPF que en control (figura 12). A diferència de l'observat amb el COL1A1, es va detectar una tendència a uns nivells més baixos d'expressió en els gels més durs. En els fibroblasts control es va observar una relació antagònica entre TGF- β 1 i enduriment, on el TGF- β 1 va induir l'expressió de MMP-1 un $\sim 140\%$ en els substrats tous però no en els més rígids, on es va reduir un 41%. En canvi, en fibroblasts de IPF no es va observar un efecte del TGF- β 1 però sí de la variació en la rigidesa, on la seva reducció va disminuir al voltant d'un 50% l'expressió de MMP-1, indicant una possible resposta aberrant en fibroblasts de IPF.

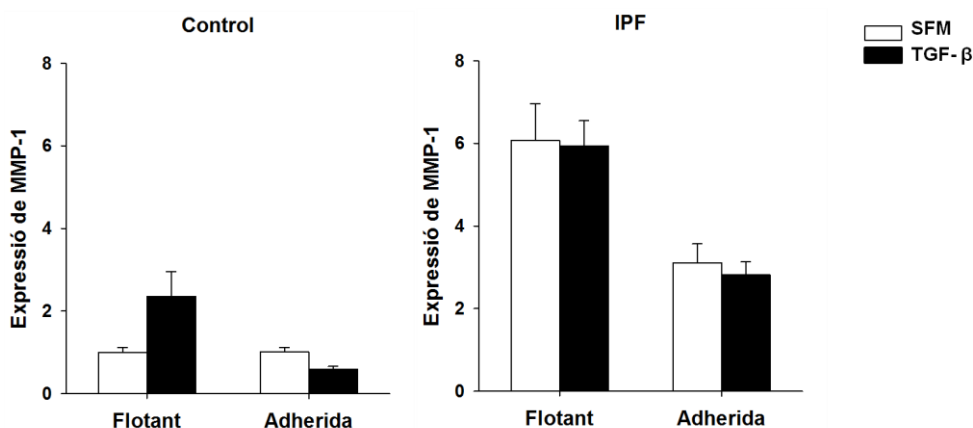


Figura 12. Nivells d'expressió de MMP-1. Els resultats mostren el promig \pm SEM de $n=3$.

Finalment, en general es van trobar uns nivells més elevats d'expressió de MMP-2 en les mostres de fibroblasts procedents de IPF, al voltant de 1,6-2,0 vegades (figura 13). A diferència de la MMP-1, el patró de regulació per la citoquina profibròtica i la variació en l'elasticitat de la matriu 3D va ser força similar en les cèl·lules fibròtiques i les control. Es va poder observar una lleu inducció per part del TGF- β 1 però no es va veure cap sinèrgia per les característiques mecàniques dels gels de col·lagen.

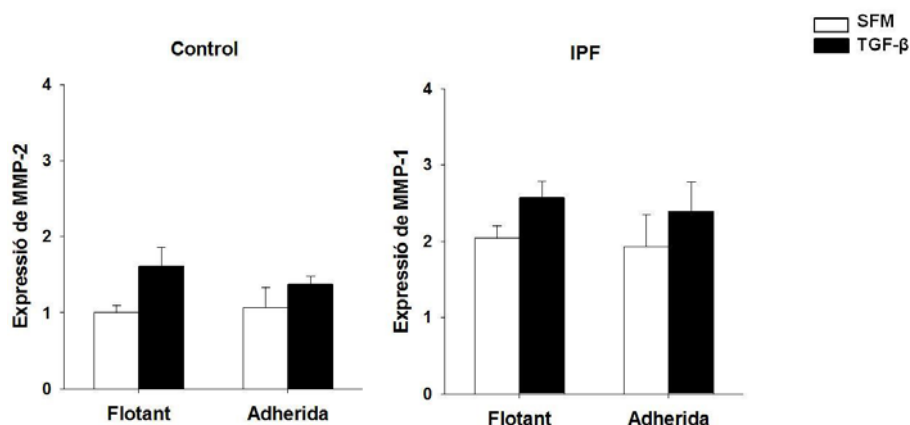


Figura 13. Nivells d'expressió de MMP-2. Es mostra el promig \pm SEM de $n=3$.

1.3 Nivells i activitat de metal·loproteïnases

Per corroborar si hi havia diferències en la secreció i el nivell d'activació de les metal·loproteïnases de la matriu es va fer un anàlisi per zimografia del medi condicionat en els cultius dels fibroblasts en gels 3D. Es van detectar bandes a 72 i 66 kDa, corresponents a la pro-MMP2 i la MMP-2 activa. En els gelatinogrames no es van detectar bandes a 92 i 88 kPa que correspondrien a les formes inactiva i activa de la MMP-9.

Es va quantificar el nivell d'activació de la MMP-2, calculant la relació de la MMP-2 activa amb la MMP-2 total (Figures 14 i 15). Es va poder veure un patró d'activació similar en fibroblasts control i de IPF, on l'activació de MMP-2 era superior en presència de TGF- β 1 i lleugerament superior en els gels més rígids. Es va observar una tendència cap a uns majors nivells d'activació d'aquesta proteasa en els fibroblasts fibròtics.

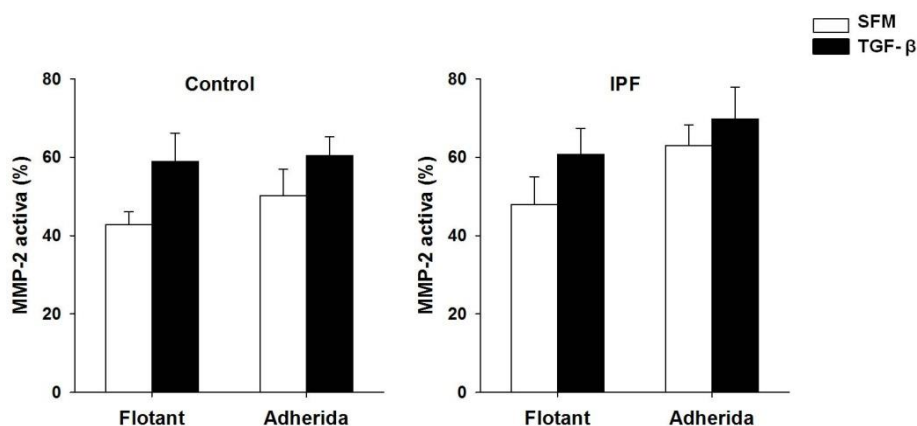


Figura 14. MMP-2 activa en relació a MMP total (%). Es mostra el promig ± SEM de n= 3.

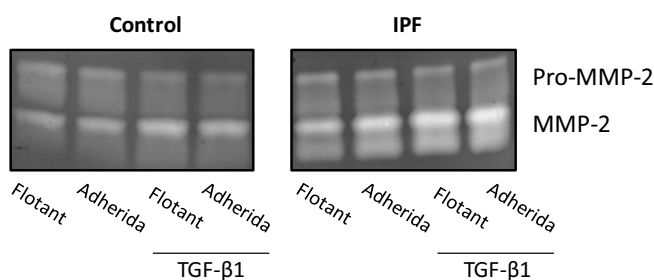


Figura 15. Imatges representatives de zimogrames de gelatina mostrant pro-MMP-2 i MMP-2 activa.

Aquestes observacions són qualitativament consistents amb les dades de PCR i suggereixen una relació aberrant entre TGF-β1 i enduriment en la IPF.

1.4 Limitacions dels gels de col·lagen de tipus I

En resum, aquest estudi preliminar demostra que la mecanosensibilitat és selectiva, és a dir, només afecta alguns gens com COL1A1 i MMP1. A més, aquesta pot ser tan potenciadora (COL1A1) com inhibidora (MMP-1) de l'expressió. Per altra banda, suggereix que l'efecte de l'enduriment i el TGF-β1 són en bona mesura independents. Cal destacar també que les dades suggereixen que els fibroblasts de IPF tenen respostes aberrants tan a l'enduriment com a TGF-β1.

Malgrat les avantatges que proporciona l'ús de les matrius 3D de col·lagen, les quals permeten estudiar les cèl·lules en condicions més fisiològiques, ens trobem amb una limitació, que és la rigidesa màxima que es pot aconseguir amb aquest sistema. El gel de màxima concentració possible que podem preparar donada la concentració de la solució comercial de col·lagen és de 4 mg/ml. Un gel de 4 mg/ml adherit a una placa de cultiu té una duresa aproximada de 0,8 kPa, unes 3 vegades més rígid que un gel flotant de la mateixa concentració [45, 146]. Així, tot i que amb aquest sistema de matrius 3D aconseguim modular la duresa del substrat amb un factor 3, el rang en el que ens movem queda molt per sota de les dureses patològiques pròpies dels pulmons amb fibrosi pulmonar, els quals anirien des de al voltant de 3 kPa fins a 45 kPa [6].

Aquests resultats ens van motivar a implementar un cribratge biomecànic que cobreixi tot el genoma i a optimitzar un mètode de cultiu en gels de duresa variable que cobreixi tot el rang fisiopatològic de la IPF.

2. DISSENY D'UNA ESTRATÈGIA DE CRIBRATGE BIOMECÀNIC

2.1 Definició d'una estratègia general de cribratge biomecànic

Per entendre com funcionen els sistemes complexos és útil determinar com aquests responen a la modulació d'una variable externa [131]. Aquest principi general podria ser aplicable a un sistema tan complex com són les xarxes regulatòries implicades en el desenvolupament de les malalties en les que hi ha una alteració de la mecanobiologia. Així, la hipòtesi de treball d'aquesta tesi va ser que la realització d'un cribratge biomecànic podia ser una bona estratègia per aconseguir informació sobre els processos mecanobiològics rellevants en al desenvolupament de la malaltia, així com per a identificar potencials dianes terapèutiques i/o biomarcadors que estiguin veritablement associats amb la malaltia.

El primer objectiu per a testar aquesta hipòtesi va ser dissenyar una nova aproximació de cribratge biomecànic, basada en una estratègia de cribratge convencional però incorporant-hi la vessant mecànica. En aquesta aproximació el sistema que s'estudia és un model cel·lular de la malaltia i la variable que modulem externament és la rigidesa del substrat (Figura 16).

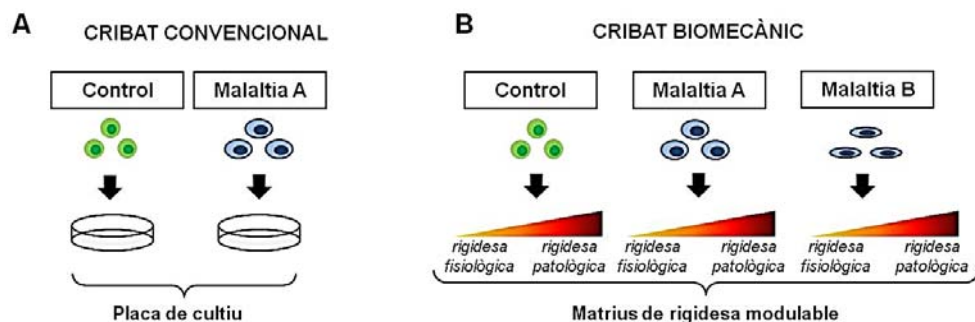


Figura 16. Esquema de les estratègies de cribratge convencional (A) i biomecànic (B).

Posteriorment es realitza un perfilat transcripcional d'alt rendiment seguit d'un anàlisi computacional emprant eines de bioinformàtica i biologia de sistemes per tal de d'inspeccionar els gens i les vies regulatòries que responen de manera diferencial a la rigidesa de la matriu en cada estat patològic.

En un cribratge convencional això ens portaria a una llista d'alteracions que distingirien les cèl·lules de la malaltia de les cèl·lules control. En canvi en el nou cribratge biomecànic plantejat esperàvem obtenir una llista de canvis transcripcionals que siguin modulats per la rigidesa de la matriu, i que a més es puguin interpretar com a normals, específics de les malalties A o B o comuns als dos tipus de patologies. Una altra avantatge del cribratge biomecànic és que a diferència del cribratge convencional on la interpretació funcional de les dades no està definida a priori, en el cribratge biomecànic la interpretació funcional informa sobre l'adaptació dels fibroblasts a la rigidesa de la matriu. A més,

s'obindrà una especificitat per la malaltia d'interès que quedaria definida entre les dues malalties relacionades pròximament, mentre que el un cribratge convencional l'especificitat de la malaltia sovint és incerta.

En aquest cribratge biomecànic *in vitro* es proposa emprar models cel·lulars representatius tant de teixits normals com procedents d'almenys dues malalties relacionades. Les cèl·lules es cultiven utilitzant biomaterials la rigidesa dels quals ha de ser modificable. Aleshores s'obtenen els perfils d'expressió gènica. Així, la rigidesa de la matriu és la variable externa i es mesura el seu impacte en l'expressió gènica.

2.2 Aplicació del cribratge biomecànic a la IPF

Es va triar com a model cel·lular més adequat el fibroblast, donat que és el tipus cel·lular responsable del remodelat de la ECM i de l'enduriment del teixit. Es van establir tres classes diferents de fibroblasts primaris de pulmó. Primer, la classe de la malaltia d'interès (IPF). Segon la classe control, on les condicions fisiopatològiques havien de ser el més normals possible. Tercer, mostres d'una altra patologia diferent però relacionada clínicament amb la IPF. En aquesta classe es va decidir incloure mostres de pulmons que presentessin una fibrosi intersticial reversible, és a dir amb un diagnòstic diferent de la IPF. Amb aquest enfoc s'espera que pel fet d'incloure dos o més malalties relacionades i comparar-les amb mostres control es puguin distingir els processos patològics que són específics de la patologia d'interès dels que són compartits entre les malalties relacionades

Una primera classe de fibroblasts es va obtenir a partir de pulmons diagnosticats amb IPF. La segona classe, de fibroblasts control, van ser obtinguts a partir del teixit no afectat de pulmons de pacients amb adenocarcinoma pulmonar. Per últim, la tercera classe de fibroblasts procedia de pulmons afectats per malalties pulmonars intersticials diferents de la IPF però que cursen amb fibrosi pulmonar, per tal d'identificar l'especificitat de la IPF envers a aquestes malalties. Donada la disponibilitat de mostres que hi havia al grup de Pneumologia de l'Hospital Clínic de Barcelona – IDIBAPS del Dr. Antoni Xaubet, vam aconseguir mostres de pacients diagnosticats d'EAA crònica i de COP. Es van escollir aquestes malalties perquè desenvolupen fibrosi intersticial i, a diferència de la IPF, es resolen quan es retira l'estímul causal conegut o en resposta al tractament farmacològic amb anti-inflamatoris corticosteroides.

En cadascuna de les 3 classes es van incloure 5 pacients. Es va intentar que les mostres incloses fossin el més homogènies possible dins de la disponibilitat que teníem al nostre abast, per tal de reduir al màxim les fonts de variabilitat en l'expressió gènica no degudes a la patologia pròpiament. Les principals característiques clíniques dels pacients que es van incloure en l'estudi estan recollides en la taula 6.

		Control	IPF	Fibròtic no IPF
Sexe	Masculí/Femení	5/0	5/0	2/3
Raça	Caucàsic	5	5	5

Edat mitja (anys)		69 ± 8	63 ± 6	57 ± 4
Tabaquisme	Mai	0	0	3
	Ex-fumador	0	5	1
	Actual	5	0	n.d.
Diagnòstic clínic		ADC no afectat (5)	IPF (5)	COP (2); EAA(3)

Taula 6. Característiques de les mostres del cribratge. ADC: adenocarcinoma; COP: Pneumònia organitzativa criptogènica; EAA: alveolitis al·lèrgica extrínseca; n.d.: no disponible.

No obstant va resultar difícil mantenir l'homogeneïtat en totes les característiques degut a la reduïda disponibilitat de mostres. Aquesta és conseqüència de la baixa prevalença de les malalties pulmonars intersticials i de que les biòpsies diagnòstiques han estat substituïdes per tècniques més avançades de criobiòpsia, les quals proporcionen una quantitat molt menor de teixit. Donada la seva baixa disponibilitat, es van utilitzar totes les mostres disponibles de EAA crònica i de COP fibrosant.

Els talls histològics del teixit pulmonar se van analitzar en el servei d'anatomia patològica de l'Hospital Clínic i es van triar mostres de teixit de pacients que presentaven el menor grau possible d'emfisema i de fibrosi per tal que els fibroblasts usats en la classe control fossin el més normals possibles.

Un cop definida la llista de mostres a utilitzar, es va aleatoritzar l'ordre de la seva utilització per a realització dels cultius per tal d'evitar que la introducció d'algun factor experimental es pogués modificar al llarg del temps i produir algun biaix en les dades.

La rigidesa de les matrius on es van cultivar les cèl·lules havia de permetre cobrir el rang fisiopatològic propi del teixit en qüestió. En el cas del pulmó, des de rigideses normals, al voltant de 1 kPa, fins a les rigideses pròpies de la fibrosi, amb un màxim al voltant de 40 kPa [6].

2.3 Optimització del disseny basat en biomaterials

2.3.1 Preparació de gels de poliacrilamida d'una duresa definida

Vam decidir utilitzar gels de poliacrilamida (PAA) de rigideses discretes distribuïdes al llarg del rang que va desde el que es considera la rigidesa normal del pulmó fins a la rigidesa patològica del pulmó amb fibrosi pulmonar. L'objectiu va ser aconseguir preparar gels amb mòduls elàstics de Young (E) d'entre 0,5 i 40 kPa.

Per tal d'optimitzar les condicions de preparació dels gels de PAA de dureses definides vam seguir com a referència un treball publicat anteriorment [136]. Com que no es van reproduir exactament les mateixes dureses nominals, sobretot en els gels de dureses superiors als 10 kPa, es van testar diferents factors podien influir en la polimerització de l'acrilamida, incloent la humitat durant la polimerització, la desgasificació, el diàmetre i gruix dels gels, el temps de polimerització i la concentració d'acrilamida, bis-acrilamida, persulfat d'amoni i TEMED. Es van fer mesures preliminars de microscòpia de força atòmica (AFM) per veure l'impacte d'aquestes variables en la rigidesa dels gels i es va apreciar que el

factor més determinant van ser les concentracions relatives entre l'acrilamida i la bis-acrilamida. La rigidesa final dels diferents gels, determinada mitjançant AFM es mostra a la figura 17.

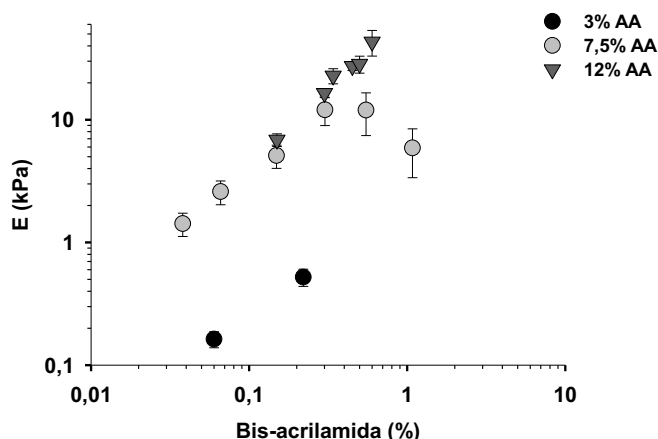


Figura 17. Mesures per AFM del mòdul de Young dels gels de PAA en un rang d'acrilamida per a diferents percentatges de bis-acrilamida.

El valor màxim de E que es va aconseguir va ser de al voltant de 40 kPa, el qual està dins del rang de la fibrosi pulmonar i no es pot aconseguir amb els gels 3D. Vam considerar que cinc valors discrets de rigideses creixents al llarg del rang que havíem definit per a fer el cribratge ens donaria informació suficient per identificar gens mecanosensibles. Les cinc dureses escollides per realitzar el cribratge biomecànic van ser 0,5 kPa, 1,2 kPa, 5,2 kPa, 21,1 kPa i 33,6 kPa.

2.3.2 Anàlisi qualitatiu de l'optimització del mètode de recobriment dels gels de PAA

Es va optimitzar el mètode per recobrir la superfície dels gels de PAA amb una fina capa d'un component de la ECM per permetre l'adhesió cel·lular i simular al màxim possible les condicions fisiològiques. Es va triar el col·lagen tipus I perquè és el principal component de la ECM de l'interstici pulmonar on resideixen els fibroblasts [147, 148].

Després de realitzar un anàlisi bibliogràfic sobre els mètodes disponibles a la literatura sobre com recobrir els gels inerts de PAA amb proteïnes d'interès es van triar 3 mètodes, els quals es van avaluar.

a) Mètode basat en PAA carregada positivament:

Un derivat de l'acrilamida carregat positivament s'incorpora en la mescla d'acrilamida i bis acrilamida abans de la polimerització. Un cop polimeritzat el gel, les càrregues positives incorporades isotròpicament per tot el gel haurien de permetre l'adsorció de les proteïnes d'interès a la superfície del gel mitjançant interaccions electrostàtiques no-específiques abans del cultiu cel·lular [149].

b) Mètode basat en el NHS-acrilat:

S'incorpora un grup reactiu NHS de manera isotròpica en tot el volum del gel. Posteriorment el col·lagen reacciona de manera específica amb el NHS. El NHS crea un compost intermediari que és altament reactiu i permet la unió covalent entre els grups amino del gel de PAA i els grups carboxílics del col·lagen [150].

c) Mètode basat en el Sulfo-SANPAH:

És el mètode clàssic de recobriment de gels de PAA [136]. Es fa un primer recobriment de la superfície del gel de PAA amb l'agent entrecruador Sulfo-SANPAH, el que permet l'adhesió del col·lagen després de ser activat mitjançant llum ultravioleta.

Totes les proves per a la optimització del sistema es van realitzar amb fibroblasts normals de pulmó (línia cel·lular CCD-19Lu) a una densitat de 10.000 cèl·lules/cm². S'analitzà l'aplicabilitat de cada mètode en termes de viabilitat cel·lular (observació de les cèl·lules i tinció amb calceïna), homogeneïtat del recobriment amb col·lagen (col·lagen fluorescent), reproduïbilitat i temps de preparació (taula 7).

	<i>Acrilamida positiva</i>	<i>NHS-acrilat</i>	<i>Sulfo-SANPAH</i>
Homogeneïtat	-	-	+
Viabilitat cel·lular	-	-	+
Reproductibilitat	+	-	+
Cost-efectivitat	+	+	-
Temps de preparació	+	+	-

Taula 7. Resum dels resultats en l'optimització del mètode de recobriment dels gels de PAA.

El mètode de l'acrilamida amb càrrega positiva es va descartar degut a que en els gels més tous (amb dureses inferiors a 10 kPa) es produïen fractures (figura 18) que poden alterar les propietats mecàniques locals del gel, i que a més feien que les cèl·lules mostressin una viabilitat molt baixa. El mètode que utilitza NHS-acrilat es va descartar per la manca d'homogeneïtat del recobriment de col·lagen i la manca de reproductibilitat. Finalment es va triar el mètode que utilitza el sulfo-SANPAH com a agent entrecruant ja que va donar els millors resultats d'homogeneïtat del recobriment i de la viabilitat cel·lular.

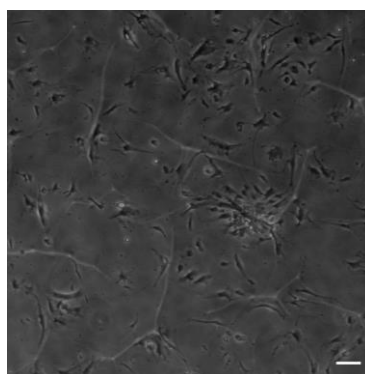


Figura 18. Gel de PAA positiva de 3 kPa amb fractures. Barra d'escala: 100 µm.

A més, es va optimitzar el suport per la preparació dels gels de PAA i el cultiu de les cèl·lules. Calia dissenyar un sistema que garantís que el 100% de les cèl·lules sembrades sobre els gels de PAA fossin estimulades de la mateixa manera (en termes de senyals mecàniques i bioquímiques), per la qual cosa es van provar diferents suports per la preparació dels gels i el cultiu de les cèl·lules, incloent cobreobjectes de vidre i plaques de plàstic amb el fons de vidre. Finalment es va utilitzar un sistema

en el que els gels de PAA estaven envoltats per una anell de plàstic i dins d'una placa de cultiu estèril (figura 9).

2.4 Selecció de la plataforma de microarrays

Es van avaluar les tecnologies de microarrays disponibles a les plataformes de transcriptòmica de l'entorn de Barcelona. Les tecnologies més robustes i accessibles en el seu moment eren Agilent Technologies i Affymetrix. Es van avaluar les avantatges i inconvenients de cada tipus i l'adequació al tipus d'experiment i volum de mostres, així com el cost. Els microarrays de Agilent Technologies es basen en la síntesi de sondes de 60 nucleòtids sobre una superfície de vidre i poden ser d'un o dos colors i hi havia disponible un format per a processar 4 microarrays en un vidre, per tant 4 mostres alhora. Affymetrix per la seva banda utilitza sondes de 25 nucleòtids sobre un xip i només amb el format d'un color. Les seqüències de les sondes dels microarrays poden estar localitzades a la regió 3' de cada gen o al llarg de tot el transcrit. Affymetrix disposava d'un sistema en format de placa que permet analitzar fins a 96 mostres de cop.

Finalment es va triar Sistema Affymetrix® Human Genome U219 Array Plate, disponible a l'IDIBAPS, que consta de 96 microarrays en format de placa. Permet fer el processat de múltiples mostres en paral·lel i de manera automatitzada, reduint la manipulació humana. D'aquesta manera es poden obtenir dades específiques, reproduïbles i de forma cost-efectiva. Per a cada gen es fan múltiples mesures independents amb sondes en la regió 3'. Cada microarray consta de més de 530.000 sondes, cobrint més 36.000 transcrits i variants que representen més de 20.000 gens (anotacions per UniGene o RefSeq), cobrint tot el genoma anotat. Es va usar aquest sistema perquè era el més cost-efectiu de tots, reduint el cost un 50% respecte als altres sistemes. A més, al permetre examinar totes les mostres simultàniament (les alternatives no ho permetien), facilita la eliminació de la variabilitat inter-array.

2.5 Control de qualitat del RNA

Després de l'obtenció de cadascuna de les mostres de RNA purificat a partir dels fibroblasts cultivats en els gels de PAA es va procedir a la quantificació i el control de qualitat de les mateixes. Totes les mostres van complir amb els requeriments mínims de qualitat per al processat mitjançant microarrays. Aquests inclouen un quocient entre l'absorbància a 260 nm i a 280 nm entre 1,8 i 2,0 i un número de integritat del RNA (RIN) superior a 8. Els valors mitjans de totes les mostres d'RNA es poden veure a la taula 8.

Concentració (ng/ μ l)	Puresa (A_{260}/A_{280})	Integritat (RIN)
92,7 \pm 48,7	2,0 \pm 0,1	9,6 \pm 0,5

Taula 8. Quantificació i control de qualitat de les mostres de RNA processades per microarrays. Promig i desviació estàndard.

3. CRIBRATGE BIOMECÀNIC

3.1 Normalització, control de qualitat i filtrat

Un cop obtingudes les dades crues a partir dels microarrays, es van passar els controls de qualitat recomanats per Affymetrix a la Unitat de Genòmica de l'IDIBAPS. Posteriorment es va dur a terme una normalització de les dades mitjançant el mètode estàndard RMA per a corregir la variabilitat tècnica. Aleshores es va realitzar un control de qualitat de les dades obtingudes, el resultat del qual es va representar en forma de diagrames de caixes (figura 19), els quals representen la distribució de la intensitat normalitzada de la senyal dels microarray. Vam observar que per a tots els microarrays les distribucions de senyal van ser similars, sense cap mostra que mostrés diferències pel que la qualitat de les dades era acceptable per a realitzar l'anàlisi bioinformàtic posterior.

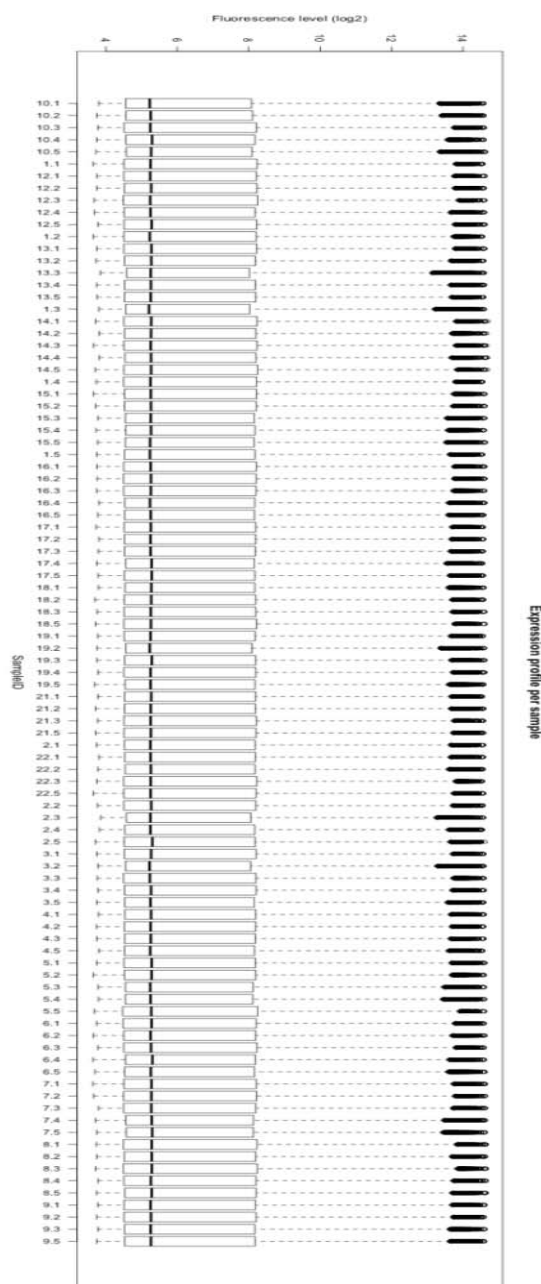


Figura 19. Distribució d'intensitats dels microarrays. Cada diagrama de caixes correspon a una mostra. Els promigs es mostren alineats i tenen un rang molt similar.

Posteriorment es va aplicar un filtrat de presència per eliminar les sondes que no presentaven suficient senyal. De les 46.457 sondes inicials, van tenir senyal per sobre del llindar 4.486, un 9,66%. Aquest conjunt de sondes representa l'univers sobre el que posteriorment es van fer tots els càlculs bioinformàtics.

Per últim, es va dur a terme un control de qualitat basat en un *clustering* no supervisat de les dades d'expressió de la classe IPF amb les classes control i ILD no IPF. A tall d'exemple es mostren els resultats obtinguts per als substrats més rígids, de 33,6 kPa (figura 20). Es va observar que es podien classificar bé totes les mostres segons la classe de fibroblasts a la que pertanyien, indicant que les diferències entre classes eren globalment superiors a la variabilitat dins d'una classe.

3.2 Anàlisi qualitatiu de les possibles mecanorespostes

A priori, cal esperar trobar sondes que no siguin mecanosensibles, i que puguin distingir o no dues classes entre sí (tipus A i B, figura 21). De la mateixa manera s'espera trobar sondes que siguin mecanosensibles i que puguin o no diferenciar entre dues classes diferents segons la seva expressió (tipus C i D, figura 21). Ens interessa centrar la nostra atenció en els gens que són mecanosensibles i que poden diferenciar la classe IPF de les altres (tipus D). Cal esperar que aquest grup sigui el més rellevant biomèdicament, ja que podria incloure un grup reduït de potencials dianes moleculars.

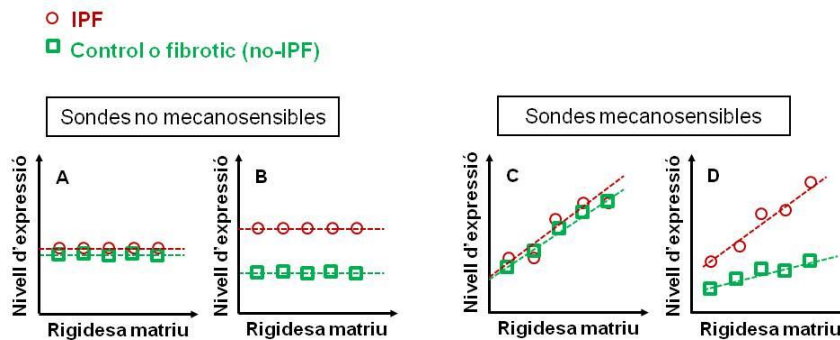


Figura 21. Possible comportament de l'expressió de les sondes del microarray quan a la resposta mecanosensible i a la distinció entre diferents classes.

3.3 Anàlisi del mecanotranscriptoma

3.3.1 Anàlisi quantitatiu de gens mecanosensibles i que distingeixen classes

En el cas més senzill, convé que la dependència amb la rigidesa sigui lineal ja que això permet utilitzar els models estadístics més simples. No obstant, un estudi anterior [6] mostrava dependències no lineals de tipus logarítmic entre expressió i rigidesa del substrat. D'acord a aquests antecedents, es va aplicar el logaritme a la intensitat de la senyal mesurada amb els microarrays i a la rigidesa dels substrats. Amb aquesta transformació log-log es van poder identificar gens l'expressió dels quals tenia un comportament comparable als prèviament esperats (figura 22).

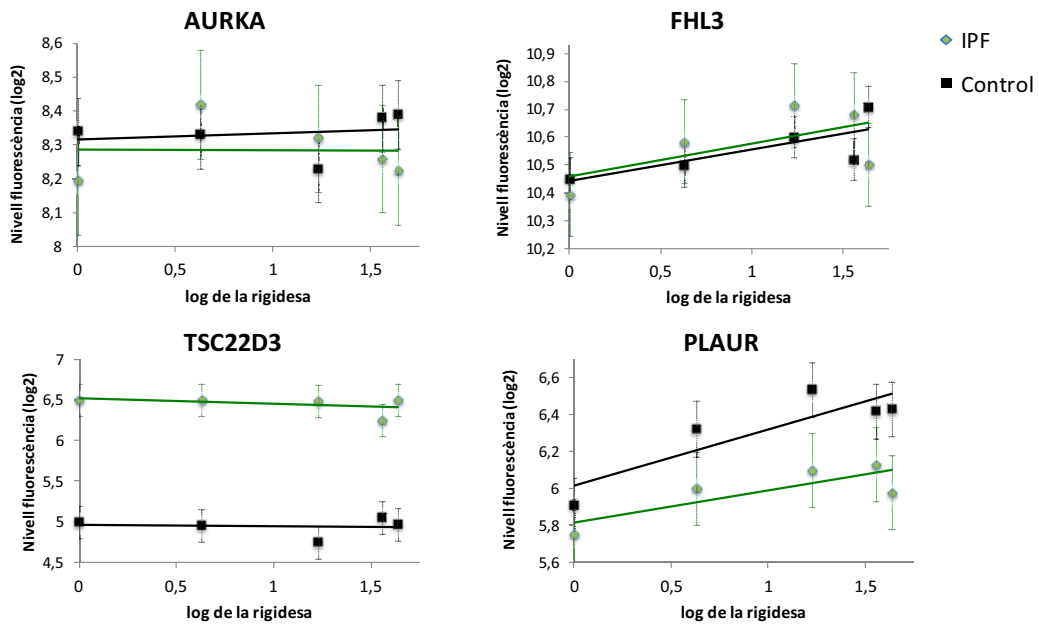


Figura 22. Exemples de mecanorespostes detectades.

Es va realitzar un test de mecanosensibilitat per detectar les sondes mecanosensibles. Per fer-ho, un cop aplicada la transformació log-log, per a cada sonda del microarray s'ajustà una recta al valor d'expressió en funció del valor de rigidesa del substrat i es va obtenir el pendent d'aquesta recta. Es van considerar com a mecanosensibles les sondes en les que aquest pendent fos significativament diferent de zero (tipus C i D). Aquest model lineal va permetre identificar 72 sondes mecanosensibles (1,6% de l'univers de sondes, figura 23), ordenades segons el p valor (taula 9). Aquestes sondes corresponien a 63 gens que podem considerar mecanosensibles. Així, es va revelar que l'enduriment de la matriu controla la transcripció d'un nombre reduït de gens, que constitueixen el transcriptoma mecànic o mecanotranscriptoma.

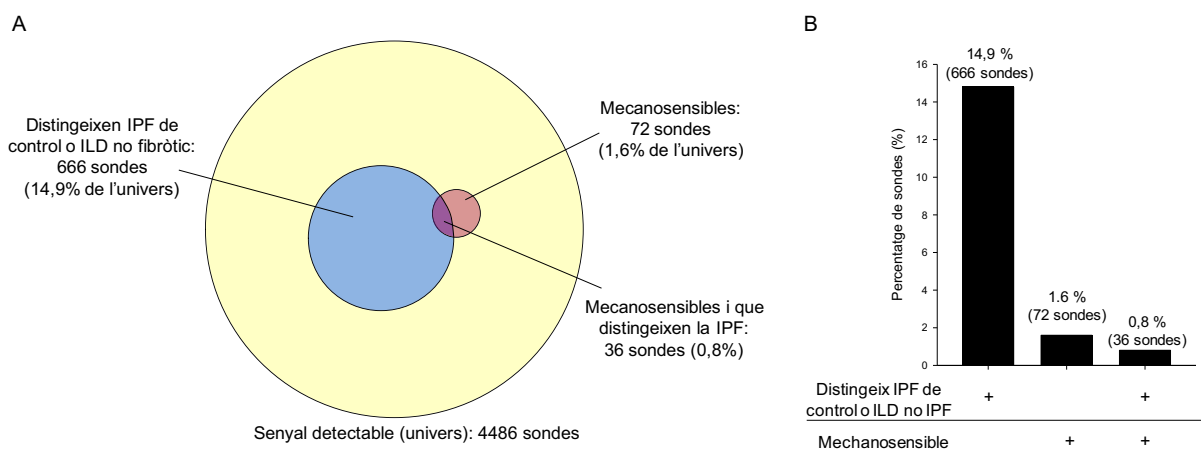


Figura 23. Distribució de les sondes dins l'univers analitzat. (A) mostra l'àrea ocupada per les sondes dins de l'univers analitzat; (B) mostra la mateixa informació.

Posteriorment es va realitzar un test de classe. En aquest test, es va realitzar una prova t de Student aparellada de dues classes. Es van identificar els gens l'expressió dels quals era significativament diferent i podia distingir entre la classe IPF de les classes control o ILD no IPF. Així, es van identificar

666 sondes (14,9% de l'univers de sondes) amb una expressió diferent entre les classes IPF i control o entre ILD no IPF, és a dir, que eren capaces de distingir la classe IPF de les altres dues (tipus B i D).

Finalment, tenint en compte el solapament entre les sondes mecanosensibles i les que poden distingir la IPF d'almenys una de les altres dues classes (tipus D), vam identificar 24 sondes, un 0,5% de l'univers de sondes. Aquest conjunt és el que considerem més rellevant, ja que podria incloure potencials dianes o biomarcadors.

	<i>Sonda</i>	<i>Símbol</i>	<i>p valor (FDR)</i>	<i>IPF vs Control</i>	<i>IPF vs ILD no IPF</i>	<i>Control vs ILD no IPF</i>	<i>Identificat en altres cribratges</i>
1	11734418_s_at	MAMDC2	1,64E-04	+		+	+
2	11735171_at	TM4SF20	6,08E-04	+		+	+
3	11729170_x_at	DUSP10	1,94E-03	+	+	+	+
4	11727601_a_at	WFDC1	3,44E-03				
5	11715793_a_at	ACTG2	5,97E-03				+
6	11717067_a_at	GREM1	5,97E-03	+		+	+
7	11715794_x_at	ACTG2	8,04E-03				+
8	11721135_s_at	IGFBP3	8,04E-03	+			
9	11717066_at	GREM1	9,53E-03	+		+	
10	11735152_a_at	SLC8A1	0,013	+		+	
11	11727016_s_at	PAPPA	0,016	+		+	+
12	11744315_at	SGK223	0,016				
13	11722758_at	NPR3	0,017	+			+
14	11730677_a_at	RNF150	0,017				+
15	11748016_a_at	ACTG2	0,017				+
16	11719265_a_at	MLPH	0,018			+	+
17	11720489_a_at	ACTC1	0,018				+
18	11730424_at	APCDD1L	0,019	+			
19	11727017_s_at	PAPPA	0,022	+		+	+
20	11731555_at	SYNPO2	0,022			+	+
21	11727015_s_at	PAPPA	0,023	+		+	+
22	11754776_x_at	CCDC74A	0,023	+			+
23	11720760_x_at	IVNS1ABP	0,024			+	+
24	11746931_a_at	INHBA	0,028	+			+
25	11720230_at	TES	0,029			+	+
26	11734311_s_at	CNN1	0,029				+
27	11743908_a_at	CTPS1	0,029			+	
28	11744226_a_at	SPA17	0,029			+	
29	11763854_a_at	CD9	0,029	+		+	+
30	11763855_x_at	CD9	0,029			+	+
31	11716684_a_at	MYO1D	0,029	+		+	+
32	11727018_s_at	PAPPA	0,029	+		+	+
33	11730580_s_at	HECW2	0,029			+	+
34	11731554_a_at	SYNPO2	0,029			+	+
35	11748991_a_at	CDK5RAP2	0,029	+		+	+
36	11756294_a_at	JAM2	0,029	+			
37	11756773_a_at	FRMD5	0,030			+	+
38	11746506_a_at	SPP1	0,034			+	+
39	11744755_x_at	FHL3	0,035	+	+	+	
40	11746588_a_at	ALDH1B1	0,035			+	+
41	11728512_a_at	TRAF5	0,038			+	+
42	11743193_a_at	PARD6G	0,038				+
43	11754887_a_at	MSRB3	0,038			+	+
44	11763704_a_at	SAT1	0,038	+		+	
45	11757642_a_at	FHOD1	0,040	+			
46	11763785_x_at	KCNN4	0,041	+		+	+
47	11724687_a_at	PCSK5	0,043	+		+	
48	11724882_x_at	TUFT1	0,043			+	+
49	11724951_s_at	CPEB2	0,043	+			

50	11728234_a_at	CLDN1	0,043	+			+
51	11746940_a_at	CD9	0,043			+	+
52	11756706_a_at	DPP4	0,043	+		+	
53	11757621_a_at	MYLK	0,043			+	+
54	11717582_a_at	RGCC	0,044			+	
55	11721237_a_at	LHFPL2	0,044	+		+	
56	11743337_at	PPAPDC2	0,044			+	
57	11724370_at	KIAA1644	0,044	+	+	+	
58	11724788_at	KIF3A	0,044	+		+	
59	11726051_a_at	FMO3	0,044				
60	11730032_at	MKX	0,044			+	+
61	11740782_a_at	RNF128	0,044			+	+
62	11742818_a_at	PLAUR	0,044			+	+
63	11752931_x_at	GBP1	0,044				
64	11754984_s_at	MYH10	0,044				+
65	11715766_a_at	DUSP1	0,046	+			
66	11755050_s_at	PLCB4	0,046				
67	11754918_s_at	HMGCS1	0,046	+		+	+
68	11754977_x_at	CTSB	0,046	+			+
69	11742308_s_at	TPM1	0,049				+
70	11725332_a_at	CTSL	0,049				+
71	11730533_a_at	COL13A1	0,049			+	+
72	11752570_a_at	RIN2	0,049			+	+

Taula 9. Sondes mecanosensibles. p valor corregit per FDR del 10% i el resultat del test de classe. També s'indiquen aquells que apareixen en altres estudis de cribratge [100, 126, 151-153].

Els gens identificats com a mecanosensibles en els gels 3D de col·lagen (figures 10 i 11), COL1A1 i MMP-1, no van aparèixer entre els gens mecanosensibles del mecanotranscriptoma obtingut amb cultius 2D de PAA i microarrays. Malgrat això, les dades dels microarrays van mostrar la mateixa tendència mecanosensible que la observada en els cultius 3D per RT-PCR. Tot i que aquestes diferències no van ser estadísticament significatives, les tendències van ser qualitativament consistents. A més, els anàlisis realitzats per altres membres del meu grup han revelat una expressió mecanosensible en fibroblasts cultivats en gels de PAA i mesurat per RT-PCR.

3.3.2 Relació entre el mecanotranscriptoma i la IPF: anàlisi bibliogràfic

Per discernir quins gens del mecanotranscriptoma han estat relacionats amb la IPF, es va fer una cerca bibliogràfica. Aquesta va revelar que dels 63 gens del identificats com a mecanosensibles en aquest estudi, 39 apareixen entre dades de microarrays que comparen teixit o fibroblasts normal i de IPF (taula 9) [100, 126, 151-153].

Per altra banda, per alguns d'aquests gens i les corresponents proteïnes del mecanotranscriptoma la seva implicació en la patogènesi de la IPF ha estat caracteritzada, concretament GREM1 (gremlina) [154], IGFBP-3 (proteïna d'unió als factors de creixement similars a la insulina 3) [155], la osteopontina [98] i més recentment KCNN4 ($K_{Ca3.1}$) [156].

3.3.3 Clustering del mecanotranscriptoma

Es va fer un *clustering* no supervisat a partir dels gens del mecanotranscriptoma normalitzant els valors de totes les dureses pel valor d'expressió en el substrat més tou (figura 24).

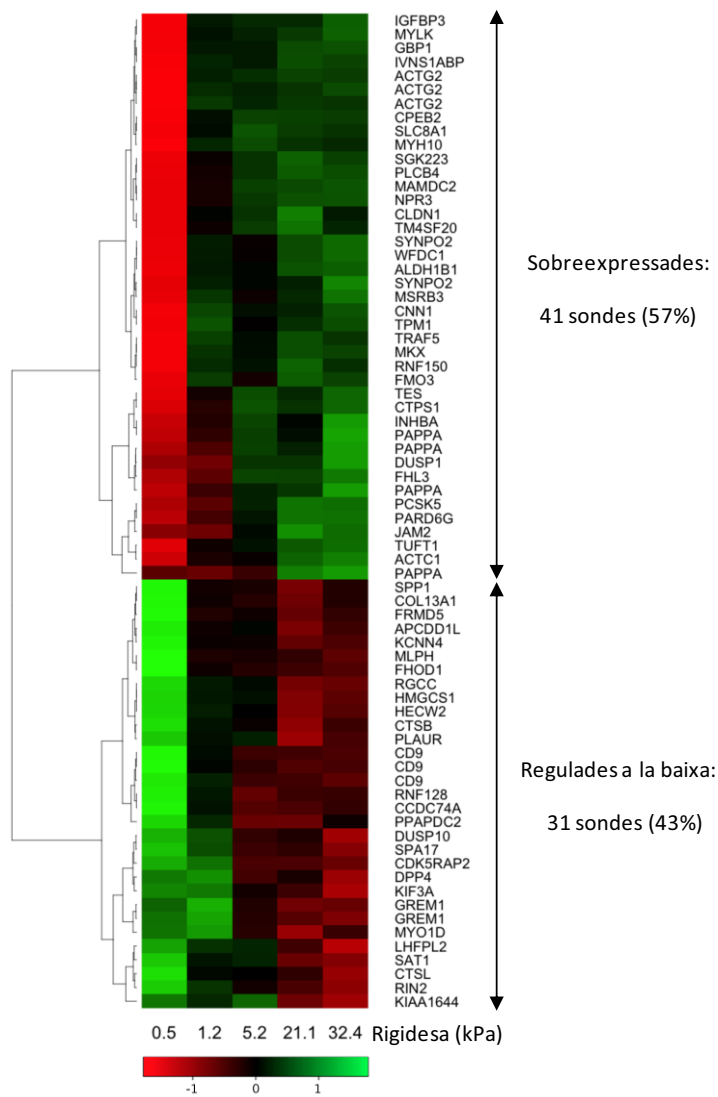


Figura 24. Heatmap del clustering dels gens del mecanotranscriptoma.

Del mecanotranscriptoma, l'expressió de 41 sondes (un 57%) va ser augmentada amb la duresa de la matriu, mentre que en 31 de les sondes (43%) l'expressió gènica es va regular a la baixa.

3.3.4 Enriquiment de cromosomes en gens sensibles a la rigidesa de la matriu

Tenint en compte la distribució de gens en cada cromosoma [157], es va observar que la distribució dels gens identificats com a mecanosensibles al llarg dels 23 cromosomes era, encara que es va apreciar un enriquiment en els cromosomes 9 i 15 (figura 25).

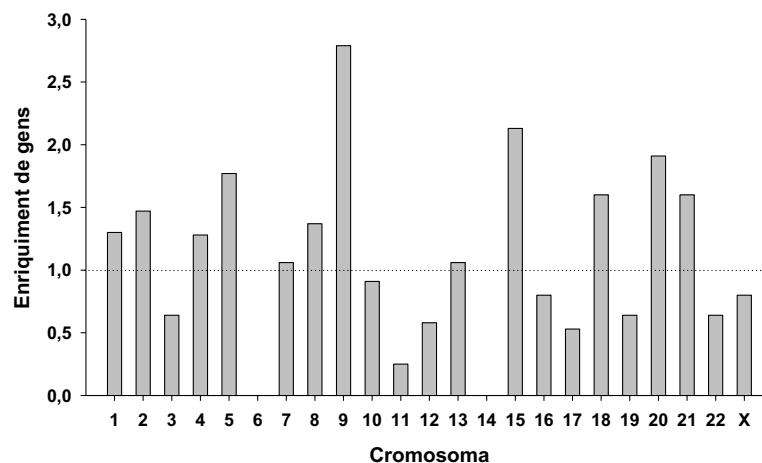


Figura 25. Distribució dels gens mecanosensibles al llarg dels 23 cromosomes. Enriquiment de gens: quocient entre la freqüència trobada i la freqüència esperada.

3.3.5 Localització cel·lular de les dianes mecanosensibles

Es va realitzar un anàlisi bibliogràfic per a determinar la localització principal de les proteïnes corresponents als gens del mecanotranscriptoma [158].

A partir d'aquest anàlisi, vam trobar que els gens mecanosensibles identificats es troben principalment en el microambient dels fibroblasts de pulmó, sent proteïnes secretades o de la ECM, així com proteïnes localitzades a la membrana i components del citosquelet, relacionats amb actina i miosina (taula 10). Dels 63 gens mecanosensibles, 8 van correspondre a components del matrisoma [104].

Localització principal	Nº de gens (%)	Gens
Matrisoma (ECM) i altres components del microambient	12 (19%)	COL13A1, CTSB, CTSL, GBP1, GREM1, IGFBP3, INHBA, PAPP, PCSK5, SPP1, TUFT1, WFDC1
Membrana cel·lular	19 (30%)	APCDD1L, CD9, DPP4, FRMD5, KCNN4, KIAA1644, LHFPL2, MAMDC2, NPR3, PARD6G, PLAUR, PPAPDC2, RNF128, RNF150, SAT1, SLC8A1, TES, TM4SF20, TRAF5
Citosquelet (actomiosina)	11 (17%)	ACTC1, ACTG2, CNN1, FHOD1, IVNS1ABP, MYH10, MYLK, MYO1D, SYNPO2, TPM1, FHL3
Citosquelet (altres)	3 (5%)	CDK5RAP2, KIF3A, MLPH
Adhesions cel·lulars	3 (5%)	CLDN1, JAM2, SPA17
Citoplasma (mitocòndria)	2 (3%)	ALDH1B1, MSRB3
Citoplasma (no especificat/altres)	7 (11%)	CPEB2, CTPS1, FMO3, HMGCS1, PLCB4, RIN2, SGK223
Nucli	5 (8%)	DUSP1, DUSP10, HECW2, MKX, RGCC
No disponible	1 (2%)	CCDC74A

Taula 10. Localització principal de les proteïnes mecanosensibles.

3.3.6 Gens regulats per TGF- β

Per a analitzar fins a quin punt els components del mecanotranscriptoma estan també regulats per TGF- β 1, vam examinar dades d'expressió gènica de gens que haguessin estat identificats com a regulats per aquesta citoquina en publicacions anteriors. Dels 63 gens identificats com a

mecanosensibles en l'anàlisi bioinformàtic del microarray, en trobem 20 (un 31,7%) la transcripció dels quals ha estat prèviament identificats com a regulada per TGF- β 1 (Taula 11). En un 85% d'aquests gens, l'efecte induït per la duresa en el nostre estudi i pel TGF- β 1 en estudis anteriors van ser coincidents.

<i>Gen</i>	<i>Símbol</i>	<i>Efecte de la duresa</i>	<i>Efecte del TGF-β1</i>	<i>Evidència de resposta a TGF-β</i>
actin, alpha, cardiac muscle 1	ACTC1	↑	↑	[159]
actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	ACTG2	↑	↑	[159]
calponin 1, basic, smooth muscle	CNN1	↑	↑	[159, 160]
CDK5 regulatory subunit associated protein 2	CDK5RAP2	↓	↓	[160]
claudin 1	CLDN1	↑	↓	[160]
CTP synthase 1	CTPS1	↑	↑	[119, 159]
cathepsin L	CTSL	↓	↓	[160]
dipeptidyl-peptidase 4	DPP4	↓	↓	[160]
dual specificity phosphatase 1	DUSP1	↑	↑	[161]
dual specificity phosphatase 10	DUSP10	↓	↓	[160]
flavin containing monooxygenase 3	FMO3	↑	↓	[160]
3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1	HMGCS1	↓	↓	[160]
insulin-like growth factor binding protein 3	IGFBP3	↑	↑	[159]
inhibin, beta A	INHBA	↑	↑	[160]
influenza virus NS1A binding protein	IVNS1ABP	↑	↑	[160]
lipoma HMGIC fusion partner-like 2	LHFPL2	↓	↓	[160]
myosin light chain kinase	MYLK	↑	↑	[159]
natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C)	NPR3	↑	↑	[160]
plasminogen activator, urokinase receptor	PLAUR	↓	↑	[119]
tropomyosin 1 (alpha)	TPM1	↑	↑	[119]

Taula 11. Gens mecanosensibles descrits com a regulats per TGF- β 1 i direcció del canvi induït.

El baix grau de solapament entre el mecanotranscriptoma i el transcriptoma regulat per TGF- β 1 en fibroblasts suggereix que l'enduriment no està potenciant els efectes del TGF- β 1 a nivell transcripcional, sinó que s'estaria comportant com a un factor independent que actuaria per ell mateix com a un estímul.

3.3.7 Interactoma del mecanotranscriptoma

Cada cop hi ha més consciència que les malalties complexes, com la IPF, es desenvolupen com a conseqüència de l'alteració de xarxes regulatòries que controlen l'homeòstasi cel·lular i tissular enlloc de considerar que les malalties responen únicament al mal funcionament de gens aïllats [130-132]. Per tal d'entendre millor les xarxes regulatòries associades al mecanotranscriptoma, vam construir l'interactoma dels elements de la taula 9.

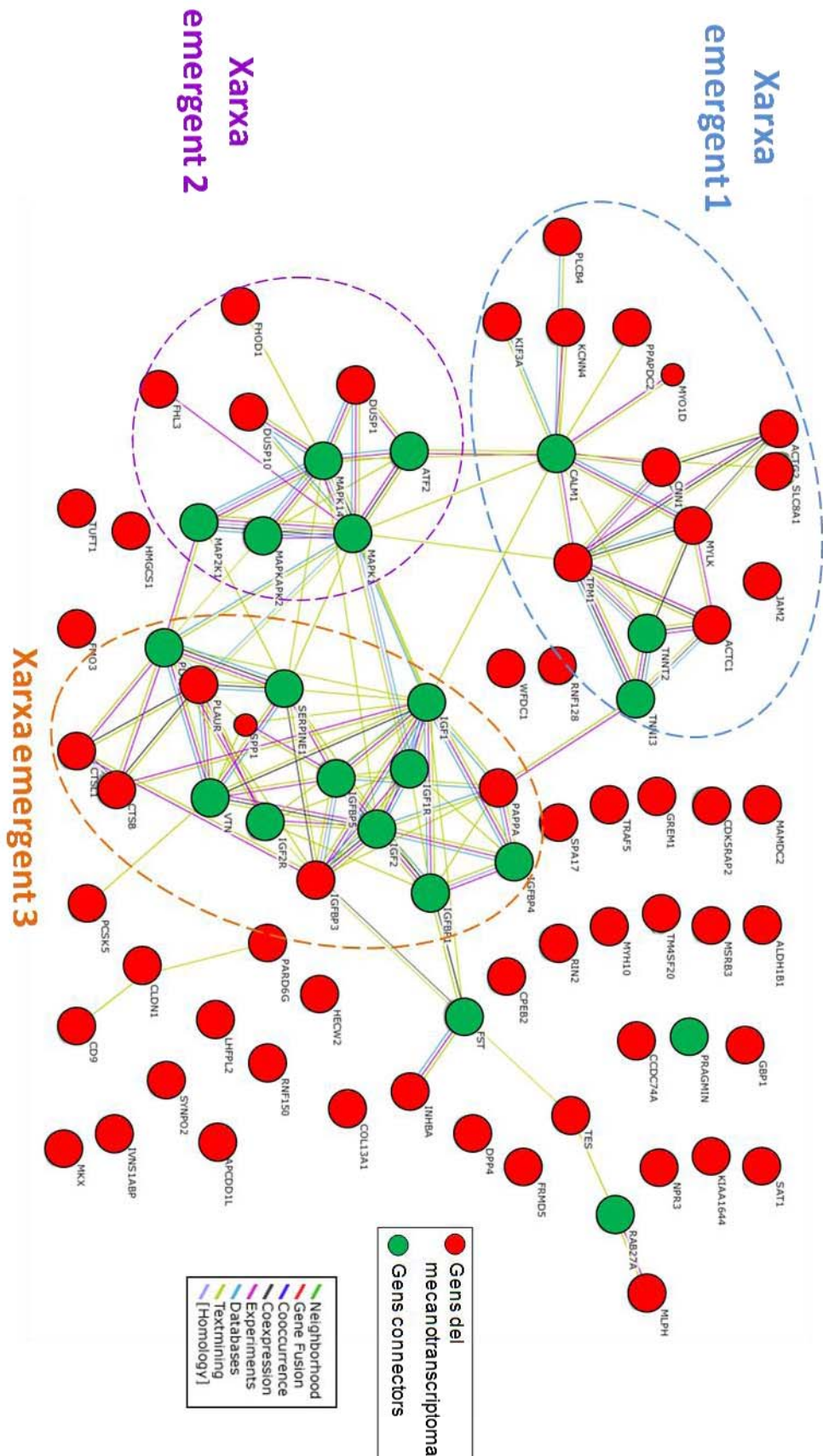


Figura 26. Interactoma segons veïns del mecanotranscriptoma dels fibroblasts de pulmó.

La figura 26 mostra l'interactoma del mecanotranscriptoma. La xarxa d'interaccions està definida a través de les interaccions a dos veïns (0, 1 o 2 intermediaris) dels components del mecanotranscriptoma. Els nodes vermells de la xarxa són els gens mecanosensibles que hem identificat a partir de l'anàlisi dels microarrays. Els nodes verds són els gens o proteïnes que apareixen quan es connecten els gens mecanosensibles amb fins a 2 intermediaris. Cada línia entre nodes representa una interacció prèviament descrita entre dos gens. El color de la línia indica el tipus d'evidència d'interacció a partir de diferents bases de dades. Com més línies hi ha entre dos nodes, hi ha més evidència d'interacció directa entre els dos elements connectats. La distància entre els nodes és proporcional a l'evidència d'interacció, de manera que com més curta és la distància més evidència hi ha de la interacció. En el càlcul del grau d'evidència hi té més pes la informació obtinguda per dades experimentals.

A partir d'examinar l'interactoma, vam poder distingir 3 subxarxes, les quals podem anomenar xarxes regulatòries emergents.

La xarxa regulatòria emergent 1 inclou elements relacionats amb el citosquelet d'acto-miosina i la contractilitat dels miofibroblasts. Es tracta de proteïnes clàssicament relacionades amb la mecanobiologia i amb l'activació dels miofibroblasts, incloent actines i miosines (ACTC1 i MYLK), així com proteïnes associades a actina, com la tropomiosina (TPM1), la calponina (CNN1), pel que la seva presència en el mecanotranscriptoma no resulta sorprenent.

Dins la xarxa regulatòria emergent 2 hi trobem proteïnes quinases activades per mitògens (MAPK) i les seves fosfatases. Les MAPK estan subjectes a regulació negativa per part de proteïnes fosfatases específiques, les més importants de les quals pertanyen a la família de les fosfatases amb especificitat dual (DUSP) [162]. Vam trobar que aquestes fosfatases es troben enriquides en el mecanotranscriptoma dels fibroblasts de pulmó.

La tercera xarxa regulatòria del mecanotranscriptoma inclou proteïnes relacionades amb el factor de creixement similar a la insulina (IGF) i proteases del sistema de fibrinòlisi. S'hi inclouen el receptor d'uroquinasa, també anomenat activador del plasminogen de tipus uroquinasa (uPA) (PLAUR) i l'osteopontina (SPP1), una fosfoproteïna estructural secretada. L'osteopontina indueix la proliferació i la migració de cèl·lules epitelials i de fibroblasts (en el cas dels fibroblasts a través d'integrines) i indueix un microambient que afavoreix la depositació de ECM [98]. Per altra banda trobem les proteïnes d'unió als factor de creixement similars a la insulina 3 (IGFBP-3). Els IGF circulen units a proteïnes transportadores d'alta afinitat, les quals modulen la seva vida mitja i la interacció amb el receptor de IGF. La majoria de IGF-1 es troba unit a la IGFBP-3, que ha estat implicat en IPF, juntament amb IGFBP-5 [155]. Finalment, la pappalisina-1 (PAPPA), també coneguda com a *pregnancy-associated plasma protein A* és una metal·loproteïnasa que degrada els IGFBP. Es creu que està implicada en processos com la cicatrització de ferides o el remodelat ossi i és un important regulador de la biodisponibilitat de IGF [163].

Atesa la seva relació anterior amb els miofibroblasts, l'aparició de la xarxa regulatòria 1 no va resultar sorprenent. En canvi les altres dues xarxes són noves en el camp de la mecanobiologia, el que ens va motivar a analitzar alguns dels seus components en més detall.

4. SELECCIÓ I VALIDACIÓ DE DIANES POTENCIALS

4.1 Validació a nivell de transcrit

Per validar el mecanotranscriptoma, es van fer mesures d'expressió per qRT-PCR de 6 gens seleccionats per tenir els uns p valors de mecanosensibilitat d'entre els més alts (taula 9) i els quals a més inclouen gens que es troben dins de les xarxes regulatòries emergents identificades en l'anàlisi d'interaccions (figura 26). Es va analitzar l'expressió en les dues condicions de duresa extremes (0,5 kPa i 33,6 kPa) (figura 27).

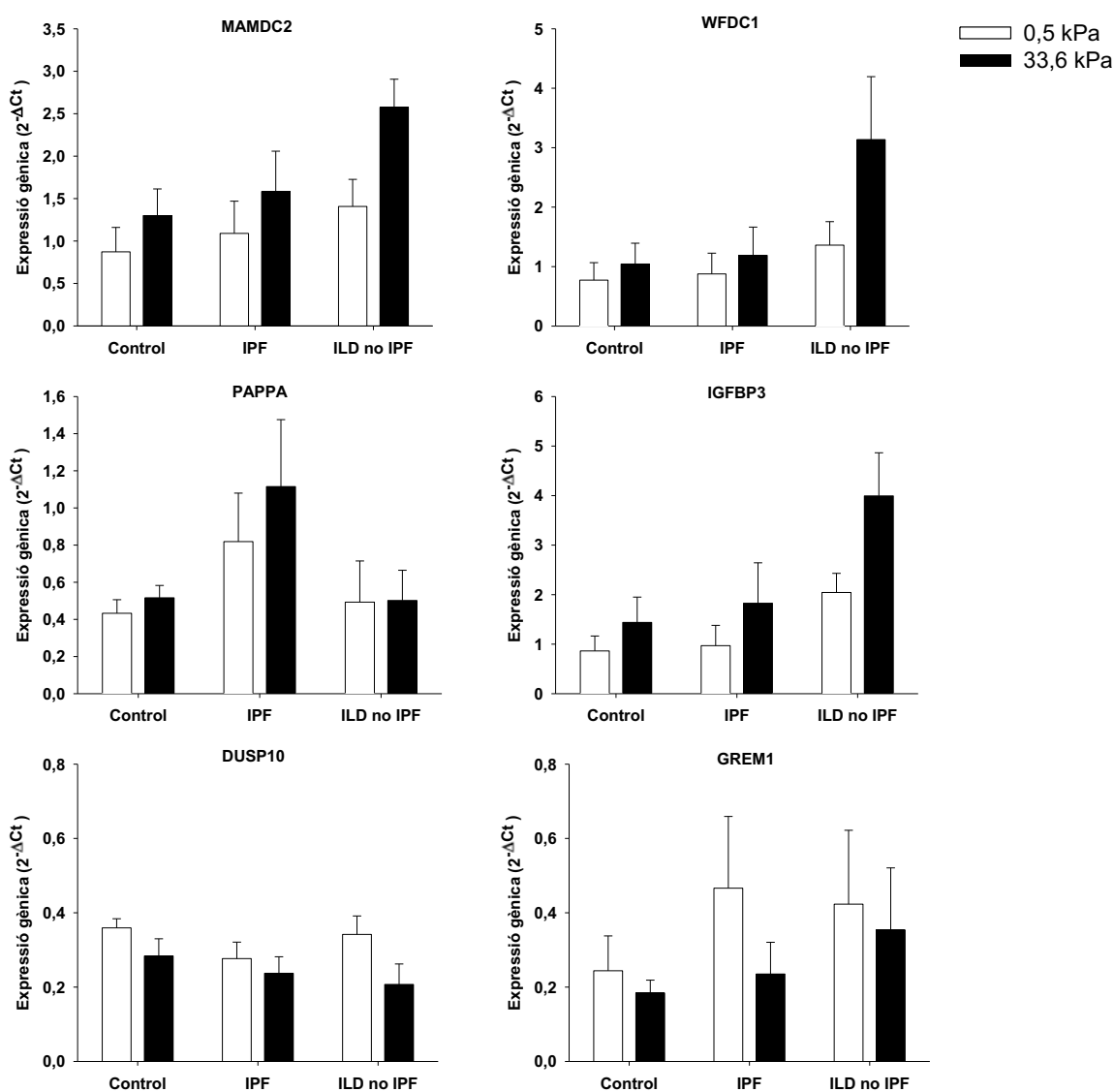


Figura 27. Expressió dels gens validats. Es mostra el $2^{-\Delta Ct}$ i SEM de $n=5$.

Per facilitar la comparació amb les dades d'expressió dels microarrays, es va calcular el canvi relatiu entre l'expressió en 33,6 kPa i 0,5 kPa amb cada tècnica (figura 28). Els resultats de la comparació entre

els valors d'expressió dels 6 gens validats van mostrar una tendència coherent entre les mesures realitzades per RT-PCR i les obtingudes mitjançant els microarrays.

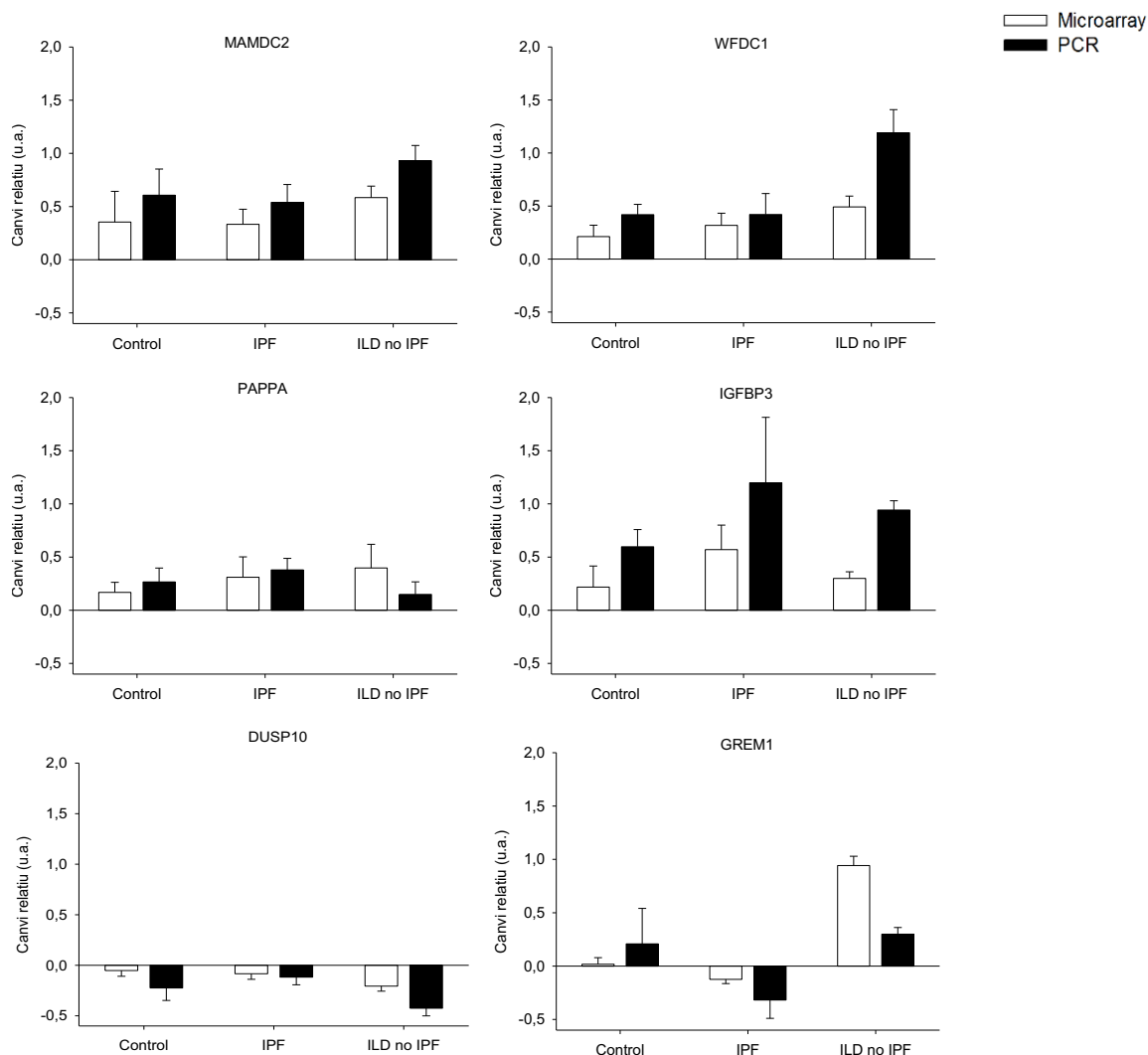


Figura 28. Expressió gènica mitjançant microarrays i RT-PCR. Es mostra el promig i SEM de n=5 del canvi relatiu ((expressió en 33,6 kPa / expressió en 0,5 kPa) – 1).

Finalment, per valorar el grau de correlació entre els valor d'expressió gènica obtinguts mitjançant els microarrays i la RT-PCR, es va representar el valor del canvi relatiu calculat anteriorment pel microarray i per la PCR per cadascun dels gens i classe de fibroblasts (figura 29). En general es va observar una correlació alta ($r^2 = 0.8$).

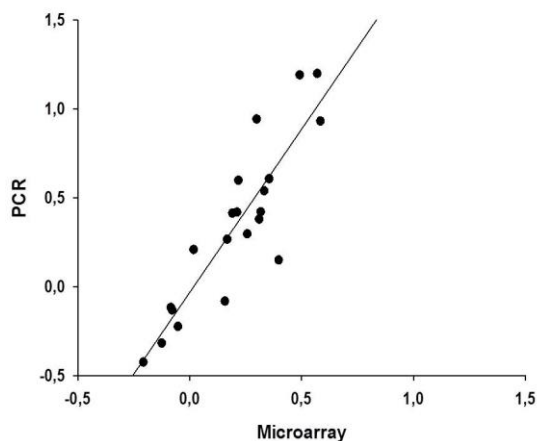


Figura 29. Correlació en el canvi relatiu en l'expressió per microarray i RT-PCR.

4.2 Validació a nivell de proteïna

Es va examinar la mecanosensibilitat a nivell de proteïna de 3 dels 7 gens mecanosensibles, triats prioritzant els que pertanyien a les xarxes regulatòries emergents 2 i 3: DUSP10, PAPP A i IGFBP-3. A més són gens que es troben interconnectats amb la resta d'elements de l'interactoma del mecanotranscriptoma.

4.2.1 DUSP10

La proteïna DUSP10 es va detectar per immunofluorescència (figura 30) i els nivells es van quantificar (figura 31). La resposta dels fibroblasts fibròtics IPF es va diferenciar de la dels fibroblasts control i dels fibroblasts fibròtics no IPF de manera significativa.

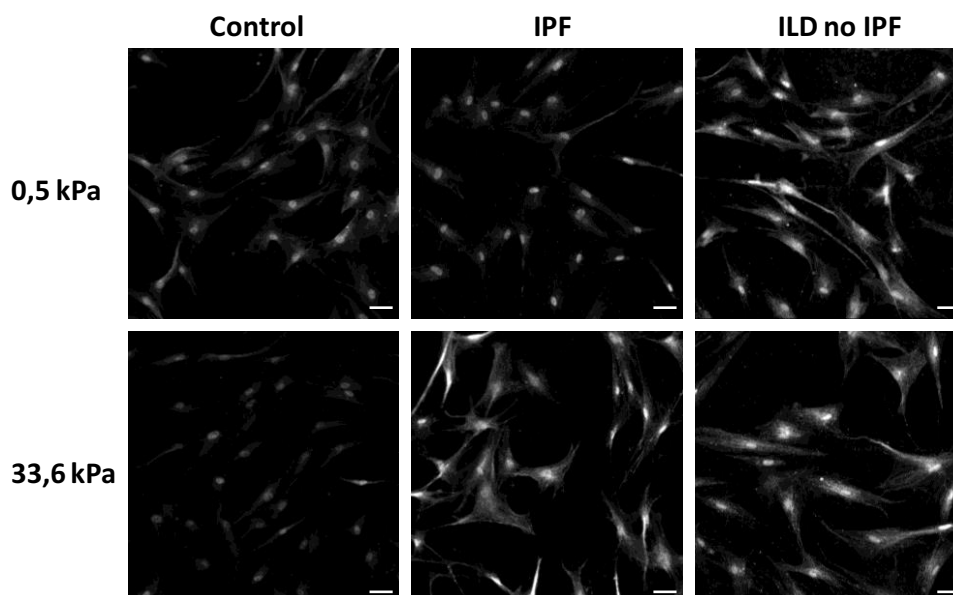


Figura 30. Immunofluorescència de DUSP-10. Imatges representatives. Barra d'escala: 50 μ m

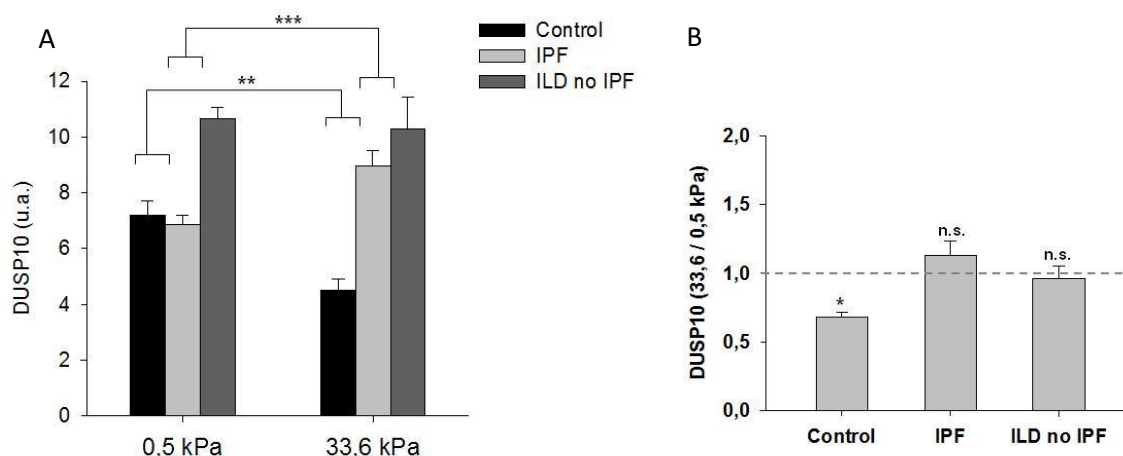


Figura 31. Nivells de proteïna DUSP10. A) Promig i SEM (n= 5). ANOVA de 2 vies: **p <0,01; ***p<0,001. B) Quocients de variació entre els substrats rígids i tous. t test: *p<0,05; n.s.: no significatiu.

Si observem els ràtios dels nivells de la proteïna DUSP10 entre els substrats més durs i els més tous (figura 31) podem veure com els fibroblasts control redueixen els nivells d'aquesta proteïna en els gels més durs, de manera anàloga als nivells de mRNA. En canvi, els fibroblasts IPF incrementen els nivells de DUSP10 en els substrats més rígids, mentre que els fibroblasts procedents de les malalties fibròtiques no IPF van mantenir uns nivells més elevats i que no es van alterar amb la rigidesa del substrat. Les dades mostren una pèrdua de mecanosensibilitat a nivell de proteïna en els pulmons procedents de teixit fibròtic.

4.2.2 PAPP-A

Els nivells de proteïna de PAPP-A (papalisina 1) en el medi condicionat es van detectar i quantificar per ELISA (figura 32). Els fibroblasts IPF van presentar nivells més alts de proteïna que els control en tots els substrats, mentre que els fibròtics no IPF van presentar unes concentracions més baixes que les altres cèl·lules.

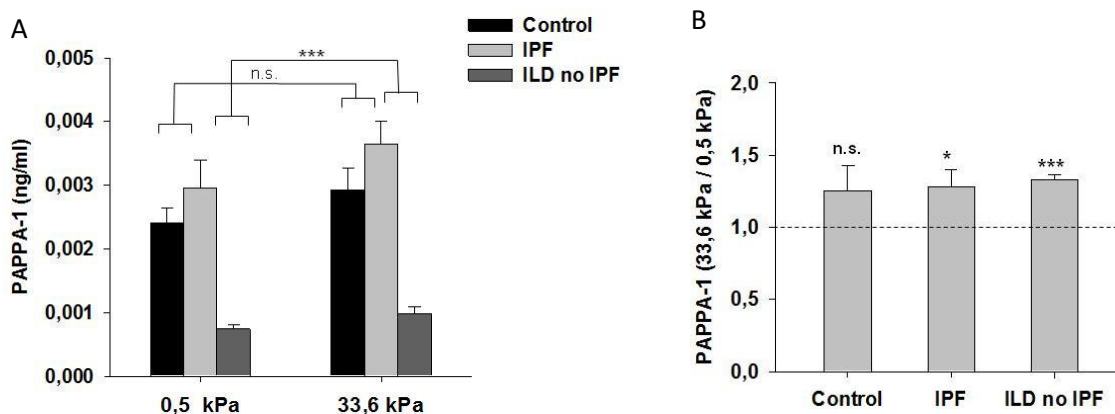


Figura 32. Nivells de proteïna PAPP-A. A) Promig i SEM (n= 5). ANOVA de 2 vies: n.s: no significatiu; ***p<0,001. B) Quocients de variació entre els substrats rígids i tous. t test: n.s.: no significatiu; *p<0,05; ***p<0,001

En les tres classes de fibroblasts es va observar una tendència a majors nivells de PAPP-A en els substrats més rígids, de manera anàloga als canvis observats a nivell transcripcional, indicant que és una proteïna mecanosensible en les tres classes.

4.2.3 IGFBP-3

Els nivells de proteïna de IGFBP-3 en el medi condicionat es van detectar i quantificar per ELISA (figura 33). La concentració de IGFBP-3 i el comportament amb la variació en la rigidesa del substrat en el cas dels fibroblasts de IPF es va diferenciar de manera significativa del de les altres dues classes de fibroblasts. Els nivells de IGFBP-3 van ser més elevats en els fibroblasts de IPF. Cal destacar que els nivells de IGFBP-3 són 3 ordres de magnitud superiors als de PAPP-A.

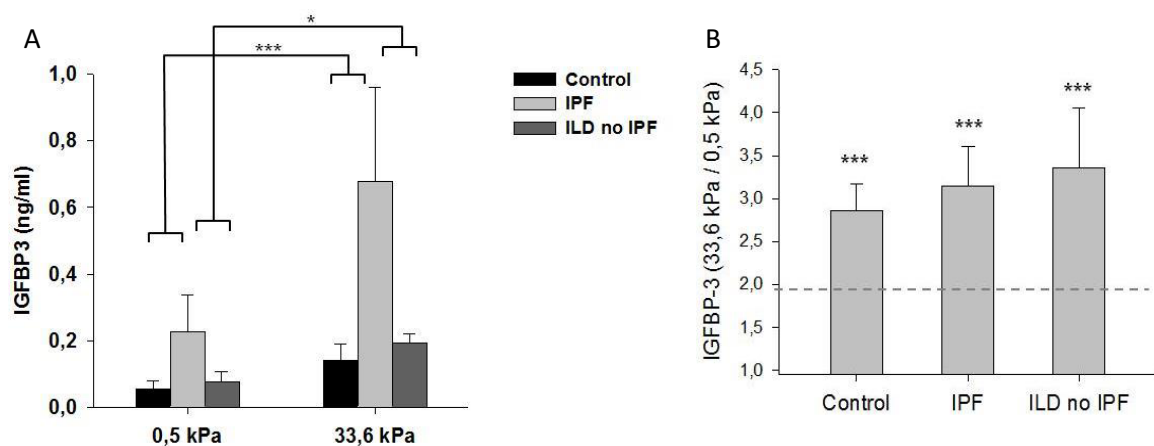


Figura 33. Nivells de proteïna IGFBP-3. A) Promig i SEM (n= 5). ANOVA de 2 vies: *p<0,05; ***p<0,001. B) Quocients de variació entre els substrats rígids i tous. t test: ***p<0,001.

Es va detectar un quocient entre les dues dureses de l'ordre de 3 vegades en tots els tipus de fibroblasts, de manera més marcada que els ratis observats a nivell transcripcional. Aquestes dades indiquen que IGFBP-3 és mecanosensible a nivell transcripcional i que aquesta mecanosensibilitat és augmentada a nivell post- transcripcional.

5. CARACTERITZACIÓ DE IGFBP-3

El fet que IGFBP-3 presentés un factor de mecanosensibilitat 3X en totes les classes de cèl·lules, que la seva concentració fos notablement més elevada en les cèl·lules procedents de pulmons amb IPF i que la concentració fos al voltant de 2 ordres de magnitud més alt que la de PAPP-A en valors absoluts, juntament amb les evidències prèvies que l'associen a la IPF, ens va motivar a centrar-nos en aquesta potencial diana per tal de caracteritzar-la en major profunditat. A tal efecte, es van emprar fibroblasts pulmonars de línia cel·lular CCD-19Lu.

5.1 L'efecte del TGF- β i l'enduriment extracel·lular en IGFBP-3

Es va determinar la concentració de IGFBP-3 present en el medi condicionat dels fibroblasts cultivats en gels tous o en gels rígids i en absència o en presència de TGF- β 1 (figura 34).

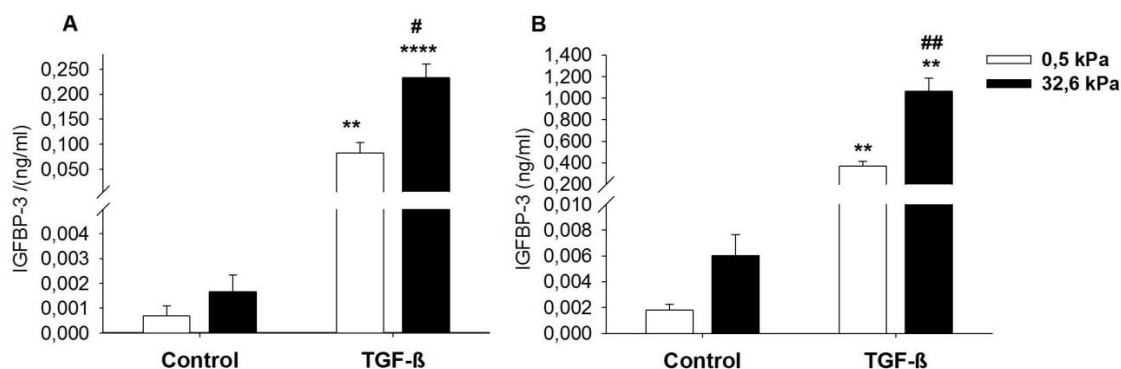


Figura 34. Nivells de proteïna IGFBP-3 en absència o presència de TGF-β1. (A) 2 dies de cultiu i (B) 5 dies. *p<0,05 i ****p<0,0001, efecte del TGF-β1. #p<0,05 i ##p<0,01, efecte de la rigidesa del substrat.

Es va observar un gran augment en els nivells de proteïna IGFBP-3 en els fibroblasts tractats amb la citoquina profibròtica TGF-β1, on la concentració de IGFBP-3 al medi extracel·lular va ser al voltant de 150 vegades més elevada, independentment de la rigidesa del gel. També vam trobar que els nivells de IGFBP-3 van ser significativament majors com més llarg va ser el temps de tractament de les cèl·lules, com es pot observar en la diferència de les escales de les concentracions mesurades a 2 i 5 dies. Comprovem, per tant, que el TGF-β1 és un factor inductor de IGFBP-3 molt important i que el seu efecte es va produir de manera independent de la rigidesa del substrat, ja que es va produir en tots els substrats.

Tanmateix, la inducció en la producció de IGFBP-3 al voltant d'un factor 3 amb la duresa es va produir també de manera independent del TGF-β1, tant al cap de 2 dies de tractament (Figura 35), com al cap de 5. Per tant, aquests resultats indiquen que l'efecte d'un factor és independent a la presència de l'altre factor i que la combinació dels factors TGF-β1 augment és un efecte multiplicatiu.

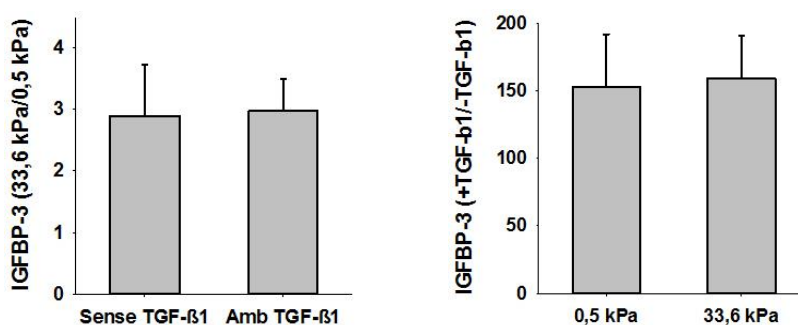


Figura 35. Quocient de l'expressió de IGFBP-3. Entre els gels durs i tous (esquerra) i entre +TGF-β1/- TGF-β1 (dreta) després de 2 dies de tractament.

5.2 Inhibidor del receptor de TGF-β

Donat que el TGF-β estimula de manera tant intensa els nivells de IGFBP-3 en fibroblasts i que es sap que els fibroblasts són capaços de produir TGF-β1 de manera endògena en resposta a l'enduriment del substrat, vam intentar dissociar els efectes purament mecànics dels mediats per una possible potenciació dels nivells de TGF-β1. Així es van incubar les cèl·lules sense afegir-hi el TGF-β1

recombinant i en presència d'un inhibidor selectiu de la tirosina quinasa del receptor I de TGF- β de tipus I (TGF- β RI) i durant 3 dies. Les mesures dels nivells de IGFBP-3 en el medi condicionat dels fibroblasts van revelar que la inhibició de la senyalització a través del receptor TGF- β RI no impedia la inducció del IGFBP-3 en el gel dur (figura 36), indicant que l'efecte de la duresa extracel·lular no requereix l'activitat de la via canònica del TGF- β .

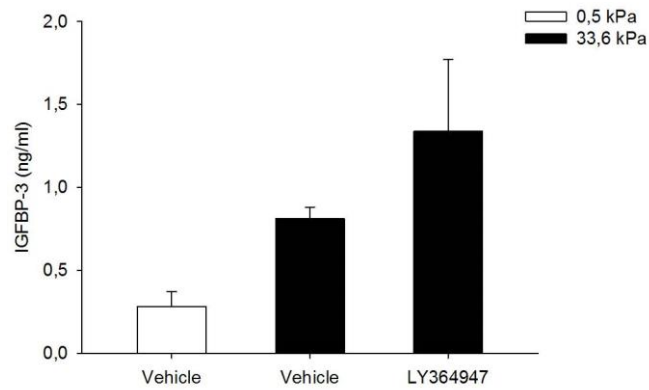


Figura 36. Inhibició del TGF- β RI. Es mostra el promig SEM (n=2).

5.3 Integrina beta 1

Per tal de buscar quin podia ser el mecanosensor cel·lular encarregat de transduir l'estímul mecànic que comporta la inducció de IGFBP-3, vam estudiar les integrines receptores de col·lagen. Els fibroblasts es trobaven adherits a gels de PAA recoberts de col·lagen i els fibroblasts presenten quatre integrines receptores de col·lagen: $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 10 \beta 1$ i $\alpha 11 \beta 1$. Donat que totes elles comparteixen la subunitat $\beta 1$, es va utilitzar un inhibidor específic de la integrina $\beta 1$ per tal de comprovar si aquesta integrina podria estar implicada en la transducció de la senyal de l'enduriment del substrat que comporta una inducció dels nivells de IGFBP-3.

Els fibroblasts cultivats en els gels rígids i tractats amb l'anticòs inhibidor de integrina $\beta 1$ (AIIB2) van presentar una forma i una disposició similar a les cèl·lules incubades amb l'anticòs control (figura 37), indicant que la inhibició de la integrina no va afectar a les seves característiques morfològiques o capacitat d'adhesió al substrat a la concentració utilitzada (3 μ g/ml).

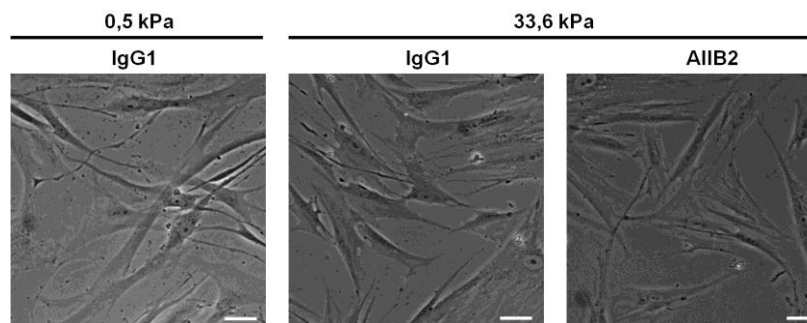


Figura 37. Imatges de fibroblasts en gels tous i rígids amb TGF- $\beta 1$ i en presència de IgG (control) o de l'anticòs inhibidor (AIIB2), després de 5 dies. Barra d'escala: 50 μ m.

Els resultats obtinguts mostren que l'anticòs control IgG1 no va produir cap efecte en els cultius, mentre que l'inhibidor específic contra la integrina $\beta 1$ sí (figura 38). De nou es va observar que els nivells de IGFBP-3 augmentaven amb el temps. La inhibició de la integrina $\beta 1$ va reduir clarament l'augment en els nivells de IGFBP-3 induït pel cultiu en els substrats més rígids.

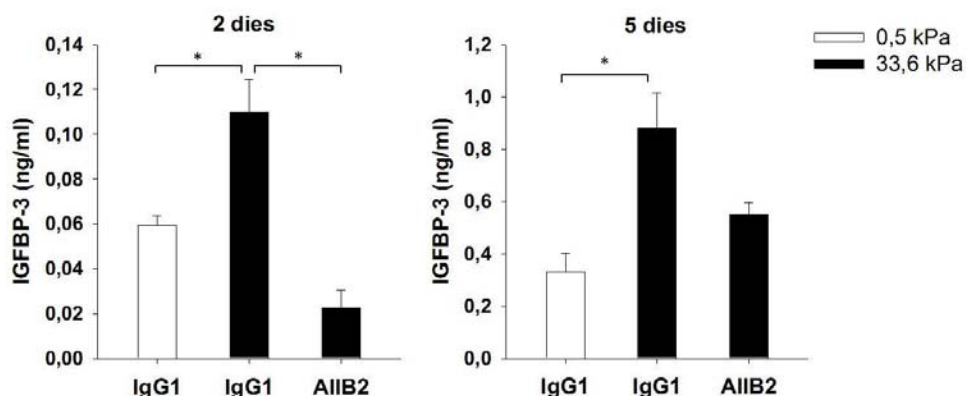


Figura 38. Efecte de la inhibició específica de la integrina $\beta 1$ en fibroblasts de pulmó cultivats en presència de TGF- $\beta 1$ durant 2 i 5 dies. * $p < 0,05$.

6. CRIBRATGE D'ELEMENTS DE LA ECM INDEPENDENT DE LA BIOMECÀNICA

Es va aprofitar que es disposava de les dades d'expressió dels fibroblast per a aprofundir en els canvis en el matrisoma, ja que estant íntimament relacionats amb els canvis en la ECM. Així, es va dur a terme un anàlisi estadístic per determinar els gens l'expressió dels quals fos significativament diferent en entre la classe de fibroblasts IPF i les altres dues sense considerar la mecanosensibilitat.

De la comparació entre la classe IPF i la classe control es van obtenir 2263 sondes diferencialment expressades mentre que 851 sondes van distingir l'expressió dels fibroblasts IPF i ILD-no IPF. Entre aquestes llistes de gens diferencialment expressats, vam analitzar quants pertanyien al matrisoma, i vam trobar que 155 gens que distingien IPF de control i 56 dels que distingien IPF de ILD no IPF corresponien a proteïnes de la ECM o associades, representant un 6,8 i un 6,6% respectivament.

Per últim, es va analitzar la correspondència entre els gens identificats com a diferencialment expressats entre els fibroblasts IPF i control i les proteïnes que s'han trobat alterades en la ECM de pulmons fibròtics [105]. En aquest estudi es van analitzar per proteòmica els canvis en la composició de la ECM de pulmons descel·lularitzats, procedents d'individus control o pacients de IPF. De les 81 proteïnes diferencialment expressades entre les ECM dels pulmons IPF i control, 24 van aparèixer en la nostra llista de 155 gens diferencialment expressats entre fibroblasts IPF i control a nivell de mRNA (taula 12).

<i>Proteïnes alterades en la ECM dels pulmons amb IPF amb expressió diferencial en els fibroblasts</i>	
Asporin	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
Biglycan	Elastin
Collagen a-1(I) chain	Fibrillin-1
Collagen a-1(IV) chain	Fibulin-5

Collagen a-1(VIII) chain	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1
Collagen a-1(XII) chain	Laminin subunit a-2
Collagen a-1(XIV) chain	Laminin subunit a-4
Collagen a-1(XV) chain	Latent-transforming growth factor b-binding protein 1
Collagen a-2(I) chain	Matrix Gla protein
Collagen a-2(IV) chain	Metalloproteinase inhibitor 3
Collagen a-3(VI) chain	Microfibrillar-associated protein 2
Decorin	Nidogen-1

Taula 12. Components del matrisoma alterats a nivell de mRNA en fibroblasts i de proteïna en la matriu del pulmó amb IPF.

Discussió

1. ESTUDI EXPLORATIU DE MARCADORS DEL MICROENTORN EN IPF MITJANÇANT GELS 3D DE RIGIDESA VARIABLE

1.1 Una prova pilot en fibroblasts primaris activats en cultius 3D mostra que mecanosensibilitat transcripcional és selectiva i independent del TGF- β 1

Per tal de dissenyar el sistema de cribratge biomecànic, primer es va determinar si els fibroblasts primaris de pulmons sans o amb IPF de què disposàvem podien mantenir les seves propietats fora del pulmó, i es va fer una primera valoració de la seva mecanosensibilitat. A tal efecte, es van usar gels 3D de col·lagen com a un sistema per a cultivar els fibroblasts pulmonars control i IPF en condicions el més fisiològicament rellevants possible. Per tal de modular la rigidesa del substrat i simular condicions d'enduriment del teixit, vam usar el sistema de gels flotants i adherits, el qual ha estat descrit i usat prèviament [9, 164]. A més es va afegir el factor profibròtic soluble TGF- β 1. Es van analitzar 4 gens de la ECM, col·lagen I α 1 (COL1A1), versicà (VCAN), MMP-1 (MMP1) i MMP-2 (MMP2), els quals es van triar perquè els vam identificar a la bibliografia com a rellevants per a la fibrosi pulmonar i la IPF [99, 100]s i els vam considerar com a bons marcadors de la IPF. Com que les MMP estan també regulades a nivell d'activació, vam analitzar el medi condicionat dels fibroblasts mitjançant zimografia de gelatina, que permet detectar les gelatinases MMP-2 i MMP-9, per detectar canvis en l'activitat de col·lagenases. Vam detectar forta activitat de MMP-2 (pro-MMP2 i MMP-2 activa, a 72 i 62 kDa respectivament) i vam determinar el percentatge de proteasa activa respecte al total. Malgrat que la zimografia no és una tècnica quantitativa, s'utilitza sovint per veure si hi ha activitat de les MMP en les mostres biològiques [165].

Pel gen COL1A1 vam observar un augment d'expressió amb la duresa extracel·lular, indicant que és un gen mecanosensible en les condicions estudiades. D'acord amb els nostres resultats, troballes prèvies en 2D o 3D han mostrat que en les matrius amb major nivell d'estrès mecànic els nivells de mRNA de COL1A1 de fibroblasts pulmonars o de pell eren superiors [166, 167]. També en concordança amb el que s'esperava [145], vam observar una inducció per part del TGF- β 1, la qual va ser força intensa en el nostre cas (superior al 280%). La mecanosensibilitat va ser notablement major en fibroblasts cultivats en presència de TGF- β 1, passant del 20 a 60% en fibroblasts control i de 30 a 112% en fibròtics. Aquesta observació suggereix un possible efecte additiu dels dos factors profibròtics, enduriment i TGF- β 1, en l'expressió de COL1A1. Pel que fa a l'origen dels fibroblasts, vam observar el mateix comportament general amb els factors estudiats en cèl·lules IPF i control. No obstant, els nivells basals van ser superiors en fibroblasts de IPF, els quals van assolir uns majors nivells en tots els casos i una major inducció per la combinació de l'enduriment i el TGF- β 1. Aquesta diferència entre les dues classes de fibroblasts suggereix una resposta aberrant de les cèl·lules de IPF, la qual podria ser deguda a uns majors nivells d'activació basal dels fibroblasts fibròtics, potser per una major activació prèvia per efecte de TGF- β 1 i duresa en el teixit fibròtic *in vivo*.

A diferència del COL1A1, el proteoglicà VCAN no va mostrar una resposta a l'enduriment de la matriu en les condicions estudiades. En canvi, sí que vam observar una inducció pel TGF- β 1, que també s'havia detectat en fibroblasts prèviament [168]. Els nivells basals i induïts van ser superiors en els fibroblasts de IPF, en concordança amb observacions anteriors a nivell d'expressió gènica [169] i que demostren majors nivells de la proteïna del versicà en pulmons amb IPF [105, 170]. Aquests resultats indiquen que la regulació mecànica de la transcripció és selectiva.

Pel que fa a les MMP estudiades, les dades d'expressió de MMP-1 i MMP-2 van mostrar tendència a uns nivells superiors en cèl·lules procedents dels pulmons amb IPF. Aquestes dades concorden amb que MMP-1 i MMP-2 es troben sobreexpressades en teixit i en fibroblasts pulmonars de IPF [100, 152]. L'expressió de MMP-1 va suggerir una resposta mecanosensible, amb una tendència a reduir-se en els substrats més rígids. Aquests resultats són qualitativament consistents amb el treball de Liu i col·laboradors on la MMP-1 va aparèixer com a reduïda amb l'enduriment en gels de PAA [6], i indiquen que la MMP-1 també és mecanosensible.

El fet que l'enduriment tingui un efecte oposat en l'expressió del col·lagen i de la col·lagenasa MMP-1 suggereix que l'expressió d'aquests gens podria estar co-relacionada dins d'un mecanisme comú encaminat a augmentar la quantitat neta de col·lagen.

No vam observar un efecte de la duresa en l'expressió gènica de MMP-2. Es va observar el mateix patró de comportament entre l'expressió de mRNA i el percentatge de la forma activa de la proteïna. L'expressió gènica i la major activitat de MMP-2 es va trobar en els fibroblasts de IPF cultivats en les condicions més pro-fibròtiques (amb TGF- β 1 i en els gels menys elàstics), el que podria indicar que la combinació dels dos factors afavoriria l'activació de MMP-2 en aquests fibroblasts.

Els nivells d'expressió de MMP-7 van ser tan baixos que no els vam poder quantificar per RT-PCR. En les dades del cribratge amb gels de PAA també vam detectar que els valors d'expressió de MMP7 eren molt baixos en comparació amb els d'altres gens. En un altre estudi van analitzar MMPs per PCR en fibroblasts de pulmó i van veure que la de MMP-7 era molt més baixa en comparació de MMP-1 i MMP-2 [43]. Així, vam confirmar que aquesta proteasa que es troba sobreexpressada en el pulmó de IPF [100] és expressat principalment per tipus cel·lulars del pulmó diferents dels fibroblasts, com les cèl·lules epitelials [40].

Aquest estudi pilot va ser una prova de concepte per a validar que els fibroblasts pulmonars primaris retenen aspectes del comportament *in vivo* després d'haver estat cultivats en substrats rígids de plàstic, congelats, descongelats i cultivats en gels 3D. Vam verificar que els fibroblasts expressaven els gens que expressen normalment *in vivo* (COL1A1, MMP-1, -2, VCAN però no MMP-7) i vam veure que l'expressió d'alguns gens rellevants en la IPF és sensible als canvis mecànics de rigidesa extracel·lular de manera selectiva (COL1A1, MMP-1) o al TGF- β 1 (COL1A1, VCAN, MMP-2). Per tant, és un model cel·lular fisiològic que permet observar les alteracions en expressió gènica que porten a un remodelat excessiu en la IPF.

1.2 Limitacions dels cultius 3D en termes de rigidesa extracel·lular

Tot i que els cultius 3D són més fisiològics, el valor màxim de E que es pot assolir amb aquest sistema de gels queda lluny dels valors del teixit fibròtic. Degut a aquesta limitació no vam considerar aquest model adequat per a realitzar un cribratge biomecànic d'alt rendiment. En un estudi complementari es va intentar millorar el sistema incrementant la rigidesa dels gels, mitjançant l'entrecruament del col·lagen amb ribosa (Vicens et al., en revisió). No obstant, no es va aconseguir arribar a nivells de rigidesa comparables als valors trobats al teixit fibròtic.

2. DISSENY D'UNA ESTRATÈGIA DE CRIBRATGE BIOMECÀNIC

Un dels objectius principals de la tesi va ser dissenyar un cribratge biomecànic utilitzant la IPF com a paradigma de malaltia relacionada amb la mecanobiologia aberrant. Per abordar aquest objectiu, primer es va optimitzar un mètode de cultiu sobre substrats de diferents rigideses que permetés simular el rang fisiopatològic entre el pulmó sa i el pulmó fibròtic per a la realització d'un cribratge d'alt rendiment. Per a això es va intentar establir el disseny més adequat incloent el tipus de cèl·lules, nombre de mostres i tipus de substrats.

Cal destacar que no s'han dut a terme estudis sobre canvis transcripcionals regulats mecànicament en fibroblasts activats. Aquest aspecte és rellevant perquè, a diferència del que passa amb els fibroblasts procedents d'altres òrgans fibròtics, en el fibroblast de pulmó fibròtic s'observa una pèrdua de l'activació *in vitro* respecte al que s'observa *in vivo*. Així, s'ha observat que els fibroblasts de pulmó en cultiu perden l'expressió de α -SMA i és necessària la presència del TGF- β 1 per a induir la seva reactivació [134]. Per altra banda, es desconeix la relació entre el paper profibròtic de la duresa i el del TGF- β i com aquests dos factors interaccionen en els fibroblasts de IPF en el pulmó endurit. Per això es van cultivar els fibroblasts amb TGF- β 1 per assegurar la seva activació i mantenir-los en un entorn profibròtic a nivell de factors solubles. Hauria estat desitjable l'obtenció addicional de mostres en absència de TGF- β 1 per obtenir més informació sobre la interacció entre aquest factor i la duresa però no va ser possible processar tantes mostres en aquesta primera aproximació.

Encara no es tenen coneixements sobre si les diferències en els patrons d'expressió de gens o proteïnes induïts pels canvis biomecànics observats són específics de la IPF o si són generals dels processos de fibrosi pulmonar, és a dir, falta establir si hi ha alguna selectivitat. Per això en el disseny del cribratge biomecànic d'aquest projecte vam decidir fer una comparació entre tres classes de mostres de fibroblasts pulmonars primaris diferents amb l'objectiu d'obtenir major selectivitat i especificitat. Així esperàvem poder identificar els processos patològics que són específics de la IPF i els compartits amb entitats relacionades. Estudis previs han comparat també diferents classes de fibroblasts fibròtics, com ara Selman, que va comparar mostres de teixit de IPF i EAA [171] o Cho, que va analitzar teixits control, IPF (poc o molt sever) i altres ILD (EAA i COP), realitzant un posterior anàlisi de biologia de sistemes [172].

El disseny experimental perseguia identificar gens mecanosensibles específics per la IPF. No obstant, va comptar amb dues limitacions: les mostres disponibles de pacients ILD no IPF i el nombre de mostres que podíem examinar en un sol xip. Com a solució de compromís, per cadascuna de les classes vam examinar 5 dureses diferents i vam incloure 5 mostres, en considerar que aquesta quantitat ens permetria observar diferències entre classes i identificar patrons d'expressió gènica. La majoria d'estudis anteriors han utilitzat entre 3 i 6 mostres de fibroblasts per classe [6, 119, 120, 133], i un altre estudi fins a 12 [152]. En suport amb la nostra hipòtesi de treball, el nombre de mostres del present cribratge biomecànic va permetre identificar gens mecanosensibles i per tant va ser suficient per a obtenir els resultats esperats en aquesta primera aproximació i prova de concepte. No obstant, vam identificar pocs gens que distingissin IPF de les altres dues classes, indicant que no vam disposar de suficient potència estadística degut al limitat nombre de mostres. Cal dir que disposar d'un major nombre de mostres té una sèrie de dificultats. Una és la baixa disponibilitat de mostres de pulmons fibròtics, deguda en part al reduït nombre de pacients (les ILDs tenen una freqüència relativament baixa), la també a l'invasivitat del procediment de biòpsia que moltes vegades no és possible realitzar perquè pot complicar l'estat del pacient i posar-lo en risc. A més, als últims anys han augmentat els procediments per criobiòpsia el que redueix la disponibilitat de teixit per a recerca. Per altra banda, l'obtenció de mostres control és un repte i cap de les opcions disponibles actualment és ideal. El teixit de pacients amb càncer de pulmó porta associat la incertesa sobre els efectes del tumor sobre el teixit histològicament normal. Per altra banda els pulmons de donants sovint tenen els efectes de la ventilació artificial perllongada, trauma i dany ambiental com pel fum del tabac [118]. Una altra limitació d'aquest estudi podria ser la història de tabaquisme dels pacients de càncer (malaltia fortament associada l'hàbit de fumar) mentre que en IPF no hi ha una associació tan forta. Una altra possible font de variabilitat seria les característiques epidemiològiques dins de la classe ILD no IPF, principalment en quan al sexe i la història de tabaquisme.

El sistema de gels de PAA sobre el que es van cultivar els fibroblasts és àmpliament utilitzat en el camp de la mecanobiologia [6]. La principal limitació d'aquesta metodologia és que és un sistema 2D i per tant menys fisiològic. No obstant ha estat adequat per a l'estudi de la fibrosi ja que un cop optimitzat el procés de preparació hem pogut aconseguir l'increment de duresa desitjat i els substrats es van poder caracteritzar cada vegada fàcilment per AFM. Vam usar substrats de 5 rigideses discretes al llarg del rang de duresa normal-fibròtic, la mateixa aproximació seguida per Liu i col·laboradors [6], ja que vam considerar que serien suficients punts per poder determinar estadísticament la resposta als canvis en la variable rigidesa mitjançant un ajust lineal.

En resum, per primera vegada, s'ha realitzat un cribratge biomecànic usant fibroblasts de IPF i comparant-los amb els d'altres dues classes, en un entorn profibròtic a nivell bioquímic i realitzant un anàlisi de les dades tant des de punt de vista de biologia de sistemes com centrant-nos en dianes concretes i validant-les a nivell fisiològic.

3. CRIBRATGE BIOMECÀNIC

3.1 Aspectes novedosos del cribratge mecànic en IPF

Els estudis anteriors de la fisiopatologia de la IPF s'han focalitzat en l'efecte de factors solubles en la progressió de la malaltia, mentre que els efectes patològics de l'enduriment cronificat pulmonar han estat àmpliament ignorats. De la mateixa manera, malgrat l'existència de nombrosos estudis sobre les alteracions transcripcionals en els pulmons amb IPF, la recerca a nivell de biologia de sistemes sobre els canvis en fibroblasts pulmonars induïts per l'enduriment són escassos en general i en particular en el cas de la IPF. Per abordar aquestes limitacions, es va utilitzar un cribratge biomecànic novel·los, el qual va permetre determinar, mitjançant l'anàlisi bioinformàtic de microarrays d'expressió, els perfils transcripcionals de fibroblasts primaris de tres classes de pacients (control, fibròtic i fibròtic no IPF) cultivats en gels de PAA. Això va permetre definir el mecanotranscriptoma dels fibroblasts de pulmó, i experiments posteriors van facilitar identificar alteracions específiques d'aquest en fibroblasts de IPF.

Primer, en aquest estudi es van analitzar les variacions de la resposta de l'expressió gènica amb la variació de la rigidesa del substrat, considerant-les com a mecanorespostes. D'aquesta manera es va mimetitzar un estudi de tipus dosi-resposta en què la dosi modulada era la duresa extracel·lular. En una primera aproximació, es van linealitzar les dades d'expressió i rigidesa per poder utilitzar models de mecanoresposta lineals, ja que aquests són els més simples. A més, es va valorar que estimar dependències no-lineals requeria disposar de més valors experimentals que els valors d'expressió de 5 dureses diferents. Tot i així, és concebible que aquesta aproximació infra-estimi el nombre de gens mecanosensibles, al no considerar dependències no-lineals. De la mateixa manera, el reduït nombre de mostres utilitzades és probable que infraestimi el nombre de gens mecanosensibles.

A partir de la determinació de les sondes que mostraven una variació estadísticament significativa amb la rigidesa, hem definit per primera vegada el mecanotranscriptoma dels fibroblasts pulmonars, el qual inclou gens la transcripció dels quals es modifica amb els canvis en les propietats mecàniques de la ECM on es troben les cèl·lules. Així, en aquest estudi hem definit el mecanotranscriptoma de fibroblast de pulmó mantinguts en rigideses des de la normal del pulmó fins l'endurida del pulmó fibròtic, en presència de l'activador de fibroblasts TGF- β 1.

Cal recordar que es va triar cultivar les cèl·lules durant 5 dies en presència de TGF- β 1 per assegurar l'activació dels fibroblasts i mimetitzar un microentorn profibròtic. Això vol dir que es van examinar els efectes de l'enduriment mecànic a temps llargs. Tot i així, és possible que la dinàmica dels gens mecanosensibles identificats sigui diferent. Per estudiar els aspectes dinàmics de la mecanoregulació transcripcional, caldria analitzar RNA obtingut a diferents temps, entre unes hores i 5 dies, per tenir una visió de la resposta al llarg del temps durant el procés d'activació dels miofibroblasts per part de la duresa. En qualsevol cas, l'aproximació seguida ens va servir per a observar com la modulació de la variable externa duresa afecta al sistema de diferenciació dels miofibroblasts en un entorn profibròtic.

Un altre aspecte novedós destacable del cribratge biomecànic és que ens ha permès obtenir una llista de gens funcionalment relacionats, ja que són part d'una resposta cel·lular transcripcional a l'enduriment de la matriu extracel·lular. Els gens que es veuen modulats en un teixit que s'endureix progressivament tindran més probabilitats d'estar implicats en la fibrosi i per tant també de trobar-se sobre o sota expressats en les mostres de fibroblasts fibròtics. A més, el conjunt de gens d'interès és substancialment més reduït que les llistes que s'obtenen amb els cribratges convencionals mitjançant microarrays, que acostumen a tenir centenars o milers de dianes. Això permet que la validació pugui ser més dirigida i eficient, facilitant la identificació de dianes.

Així, aquesta aproximació ens ha permès analitzar la resposta d'un sistema (activació de miofibroblasts) a una variable externa (enduriment del substrat) que és important per al desenvolupament de la patologia. Ens ha donat una llista acotada de gens que canvien amb aquesta variable que contribueix al procés fibròtic, el que pot facilitar l'identificar més fàcilment potencials dianes desconegudes o relacionar entre sí dianes funcionalment vinculades.

3.2 El cribratge biomecànic és molt més restrictiu que els cribratges convencionals

L'anàlisi del mecanotranscriptoma va revelar que l'enduriment de la matriu controla la transcripció d'un nombre reduït de gens (<2%) en fibroblasts de pulmó activats, confirmant la selectivitat de la mecanoregulació obtinguda en un nombre reduït de gens en cultius 3D. El mecanotranscriptoma definit en aquest estudi està format per 63 gens els quals van ser tant sobreexpressats (57%) com reprimits (43%) en els substrats endurits. En l'altre cribratge biomecànic existent, en fibroblasts de pulmons sans, es van identificar 124 gens com a sensibles a l'alteració en la duresa d'un univers de 2.462 sondes analitzades. Per tant aquestes dades es situen en el mateix ordre de magnitud que les del nostre estudi [6]. Aquests resultats indiquen que la mecanosensibilitat afecta a un nombre molt reduït de gens, confirmant que els cribratges biomecànics són molt més selectius que els cribratges convencionals.

La gran selectivitat del cribratge biomecànic és important perquè pot facilitar la identificació i validació de potencials dianes terapèutiques i/o biomarcadors. Això és així perquè el conjunt de gens d'interès obtingut és substancialment més reduït que les llistes que s'obtenen amb els cribratges convencionals mitjançant microarrays, que acostumen a tenir centenars o milers de dianes. En suport a aquesta hipòtesi, entre els gens identificats com a mecanosensibles hi vam trobar un enriquiment en gens que han aparegut en altres estudis de cribratge com a alterats en mostres de teixit o fibroblasts de IPF (62%). Aquest fet valida que l'estratègia de cribratge biomecànic seguida és útil per trobar gens rellevants relacionats amb la fibrosi pulmonar i la IPF i, de manera destacable, indica que l'enduriment del teixit és una variable important per a la patogènesi d'aquesta malaltia.

En la mateixa línia, cal destacar que el cribratge biomecànic ens ha permès obtenir una llista de gens funcionalment relacionats, ja que són part d'una resposta cel·lular transcripcional a l'enduriment de la matriu extracel·lular. Així, els gens que es veuen modulats en un teixit que s'endureix progressivament

tindran més probabilitats d'estar implicats en la fibrosi i per tant també de trobar-se sobre o sota expressats en les mostres de fibroblasts fibròtics.

Pel que fa a les sondes del microarray que podien distingir segons la seva expressió a la classe IPF de les altres dues classes, vam trobar 666, una xifra que es troba en el mateix rang que els valors identificats en els anàlisis de cribratge convencionals en el camp de la IPF. Per exemple en el treball de Vuga i col·laboradors van trobar 350 gens que diferenciaven fibroblasts control i fibròtics [120], mentre que el grup de Emblom va identificar 1813 gens que distingien fibroblasts IPF i normals [152]. En aquest cas els fibroblasts no havien estat prèviament cultivats abans del perfilat d'alt rendiment, el que podria explicar que les cèl·lules mantinguessin més diferències en el seu fenotip i que aquestes es perdin al cultivar les cèl·lules en condicions de cultiu estàndard.

3.3 Potencials mecanismes mecanosensors i mecanotransductors en fibroblasts pulmonars

Estudis de mecanobiologia anteriors [173] han mostrat que les respostes biològiques cel·lulars induïdes pels estímuls mecànics extracel·lulars requereixen una sèrie d'etapes que actuen en diferents escales temporals. La primera etapa és captar o sentir l'estímul mecànic (*mechanosensing*), la qual ve donada per mecanoreceptors, els quals actuen en una escala de temps molt curta. Entre aquests mecanoreceptors, les integrines són els més ben estudiats. En aquest context, cal ressaltar que un estudi del nostre grup en el qual vaig participar va identificar que la resposta dependent d'integrines a estímuls mecànics en fibroblasts pulmonars tenia lloc a una escala inferior a 1 segon [79]. D'acord a amb aquesta etapa, l'augment de l'expressió de la IGFBP-3 per la duresa extracel·lular es va abolir amb inhibidors d'integrina $\beta 1$. En una segona etapa, la captació de l'estímul mecànic es transdueix a un efecte bioquímic. En aquest context, un altre estudi del grup on vaig participar va identificar la via de FAK com a mecanotransductora en fibroblasts pulmonars, mitjançant l'augment de fosforilació a la tirosina Y397 [135]. A banda de pFAK, altres vies de mecanotransducció s'han descrit recentment, incloent l'activitat dels coactivadors transcripcionals Yes-associated protein (YAP) i transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ). En una tercera etapa, la qual té lloc a una escala de temps més llarga (d'hores o dies), la modulació de diferents vies deguda a la mecanotransducció dona lloc a una resposta biològica, com ara canvis en l'expressió gènica, proliferació o apoptosi. Exemples d'aquestes respostes s'han trobat en aquest estudi, i en d'altres [6, 135], i són un camp d'intensa activitat científica. En aquest sentit, és concebible que la resposta a l'enduriment en presència de TGF- $\beta 1$ hagués estat una potenciació de l'activitat transcripcional d'aquesta citoquina. No obstant, com discutim en detall a continuació, aquest efecte potenciador tan sols explica una fracció del mecanotranscriptoma.

3.4 Els efectes transcripcionals de l'enduriment i del TGF- $\beta 1$ són majoritàriament independents

Dels gens identificats com a mecanosensibles en aquest estudi, 31,7% estan també regulats per TGF- $\beta 1$ (taula 11), el factor que indueix la diferenciació miofibroblàstica i que estava present en els cultius.

Aquest percentatge és similar a l'obtingut en un estudi anterior amb fibroblasts de 3 donants [6]. Així, vam observar que la resposta transcripcional a un entorn pro-fibròtic implica tant gens transcripcionalment regulats per TGF- β com no regulats. El baix grau de solapament entre el mecanotranscriptoma i els gens regulats per TGF- β 1 en fibroblasts suggereix que l'enduriment no potencia els efectes del TGF- β a nivell transcripcional, sinó que es comporta com a un factor independent que actua per ell mateix com un estímul, confirmant així les observacions obtingudes en cultius 3D.

3.5 L'anàlisi del mecanotranscriptoma mostra xarxes reguladores emergents novedoses en el camp de la mecanobiologia

Malgrat que l'enduriment tissular està associat a un nombre elevat de patologies, el nostre coneixement sobre les proteïnes que senten, transdueixen i finalment converteixen aquests canvis mecànics en respostes biològiques és molt reduït. Per avançar en el coneixement de la resposta dels fibroblasts a canvis mecànics profibròtics es va construir un mapa amb els gens del mecanotranscriptoma i les seves interaccions fins a 2 veïns (Interactoma). L'anàlisi d'aquest mapa va permetre trobar altres gens rellevants i obtenir una visió global de com es produeix l'adaptació dels fibroblasts a la rigidesa de la matriu. L'anàlisi de l'interactoma ens va portar a identificar diverses xarxes reguladores emergents que poden ser rellevants per la fibrosi pulmonar i per la mecanobiologia en general. D'aquestes, 2 xarxes van ser novedoses en el camp de la mecanobiologia.

3.5.1 L'interactoma mostra una xarxa reguladora emergent rica en components del citoesquelet d'actina-miosina

Per una banda, van aparèixer gens clàssicament relacionats amb la mecanobiologia i les fibres d'estrès, incloent diverses actines i miosines del citoesquelet així com proteïnes associades a actina (calponina i tropomiosina) [174]. Tots ells van ser sobreexpressats en els substrats més rígids en tots els tipus de fibroblasts suggerint que s'haurien induït com a part del procés d'activació dels miofibroblasts. La quinasa de la cadena lleugera de la miosina (MYLK), sobreexpressada amb la duresa, és un enzim que regula la contracció de les fibres d'estrès i és dependent de Ca^{2+} /calmodulina [174, 175]. La calmodulina va aparèixer en l'interactoma com un node d'interconnexió important entre MYLK, les proteïnes associades a actina i les altres dues xarxes emergents. A més també vam trobar una connexió amb el gen del canal iònic de potassi activat per calci $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ (KCNN4), el qual va ser reprimat amb l'enduriment i ha estat implicat en la fisiopatologia de la IPF [156].

3.5.2 L'interactoma mostra una xarxa reguladora emergent rica en fosfatases de la família DUSP

En la segona xarxa regulatòria emergent hi vam trobar MAPK i algunes de les seves fosfatases reguladores, les quals estan implicades en la regulació de processos tan diversos com la proliferació, diferenciació, supervivència i mort cel·lular [176].

Les dades suggereixen que les fosfatases DUSP són particularment importants per a la mecanoregulació, específicament DUSP-1 i DUSP10. Les vies de senyalització de les MAPK tenen una

arquitectura comuna amb una cascada de 3 quinases que s'activen de manera seqüencial per fosforilació. Hi ha quatre vies MAPK principals: 1) la via ras que conté les quinases ERK1 i 2; 2) la família p38; 3) les quinases c-jun N terminal (o JNK) i 4) la via ERK5 [176]. La senyalització per les vies MAPK està determinada per la durada i la magnitud de l'activació de les quinases [176]. El grup més gran de fosfatases implicat en la regulació de les MAPK són les fosfatases de MAPK (MKP), que pertanyen a la família de les fosfatases amb especificitat dual (DUSP) [162]. Les DUSP es poden subdividir en tres famílies. La primera inclou fosfatases nuclears induïbles per estrès i mitògens (DUSP1, -2, -4 i -5), la segona comprèn les citoplasmàtiques i específiques d'ERK (DUSP6, -7 i -9), i el tercer grup està format per fosfatases específiques de JNK/p38 que es troben tant al nucli com al citoplasma (DUSP8, -10 i -16) [176]. En el mecanotranscriptoma vam identificar DUSP1 que augmenta amb duresa i DUSP10 que es redueix. D'acord amb els nostres resultats, un altre estudi ha trobat que l'expressió de DUSP10 es redueix en gels de PAA de rigidesa creixent [6]. Aquestes dades suggereixen que les DUSP són importants per a la mecanoregulació. En suport a aquesta interpretació, el treball de Chu va trobat una sobreexpressió d'elements relacionats amb activitat fosfatasa de MAPK en cèl·lules epitelials bronquials estimulades mecànicament [177].

3.5.3 L'interactoma mostra una xarxa reguladora emergent rica en proteïnes relacionades amb IGF

Per últim, va aparèixer una xarxa emergent amb proteïnes relacionades amb IGF, proteases i components del sistema activador de plasminogen. El sistema activador del plasminogen és responsable de la iniciació de la cascada proteolítica de fibrinòlisi [178]. Els activadors del plasminogen de tipus uroquinasa o tissular (uPA/tPA) i la plasmina juguen papers importants en la degradació proteolítica de les proteïnes de la ECM i el manteniment de l'homeòstasi tissular [179]. L'acció d'aquestes proteases sobre plasminogen porta a l'activació de la plasmina, la proteasa que degrada la fibrina però també altres proteïnes, portant a l'activació de col·lagenases i també del TGF- β latent associat a les cèl·lules [179, 180]. Addicionalment, el TGF- β 1 és un inductor transcripcional de l'inhibidor de l'activador del plasminogen (PAI-1) (gen SERPINE1) [180]

En el mecanotranscriptoma vam identificar el receptor de uPa (gen PLAUR). En l'interactoma va aparèixer connectat al PAI-1, el qual va emergir com un node important en la xarxa d'interaccions. Aquest regulador crític de l'activació del plasminogen ha estat identificat com a mecanosensible en altres estudis [166, 181] pel que no és sorprenent la seva presència en l'interactoma. En un estudi de microarrays es va trobar una inducció del sistema activador del plasminogen en cèl·lules epitelials bronquials estimulades mecànicament (per compressió), augmentant el grup funcional de uPA, uPAR i PAI-1 [177]. Per altra banda, el PAI-1 ha estat implicat en la fibrosi del cor, pulmó, ronyó, fetge i pell [179]. El seu excés en condicions patològiques contribueix a l'acumulació excessiva de col·lagen i altres proteïnes de la ECM, i els ratolins sense PAI-1 són resistent a fibrosi pulmonar induïda per bleomicina [182]. Aquestes dades suggereixen que el sistema de plasmina és important pel desenvolupament de la fibrosi i la inhibició de la seva activitat provindria dels fibroblasts pulmonars en resposta a l'enduriment progressiu del teixit, portant a un cercle viciós de remodelat del microambient del pulmó.

Un altre element destacable del mecanotranscriptoma va ser l'osteopontina (gen *SPP1*), que connecta amb l'interactoma a través de PLAUR i amb les proteïnes relacionades amb IGF a través de IGFBP-5. Es tracta d'una proteïna estructural l'expressió de la qual es troba incrementada en teixits amb calcificacions patològiques [183]. Ha estat prèviament identificada en fibrosi, en estar sobreexpressada en pulmons i rentat broncoalveolar de pacients amb IPF [98]. S'ha vist que indueix la proliferació i la migració de cèl·lules epitelials i de fibroblasts (en el cas dels fibroblasts mediat per integrines) i indueix un microambient que afavoreix la depositació de ECM [98].

En la xarxa emergent de gens proteïnes relacionades amb IGF hi trobem IGF, receptors de IGF (IGFR) i diverses IGFBP. Els factors de creixement similars a la insulina (IGF) són pèptids relacionats estructuralment amb la insulina que tenen acció estimuladora del creixement, potencien l'acció de la insulina i regulen la proliferació cel·lular [184]. Aquests factors han demostrat jugar un paper important en el creixement, manteniment, regeneració de tots els teixits al llarg de la vida [185]. Els IGF circulen units a les proteïnes transportadores IGFBP, les quals modulen la seva vida mitja i la seva interacció amb el receptor. No obstant, les IGFBP també regulen l'activitat cel·lular per diversos mecanismes directes, independentment de IGF [184]. Dues de les IGFBP (IGFBP-3 i -5) havien estat prèviament relacionades amb la patogènesi de la IPF [155]. La IGFBP-3, que va aparèixer com un element del mecanotranscriptoma sobreexpressat en els substrats de rigidesa creixent, no havia estat relacionat amb la mecanobiologia prèviament.

La proteasa pappalissina-1 (també coneguda com a *pregnancy-associated plasma protein* o PAPP-A) es va trobar relacionada amb les IGFBP i va ser un element mecanosensible de l'interactoma. Aquesta proteasa que degrada IGFBP-2, -4 i -5 ha estat implicada en les respostes al dany inflamatori i el remodelat de teixits i la resposta de cicatrització normal [185, 186]. La seva sobreexpressió pot promoure la regeneració de teixits i s'ha trobat augmentada en els fibroblasts del teixit regeneratiu en ferides de la pell humana [187, 188]. Es creu que podria exagerar la resposta patològica al dany crònic [185]. Per altra banda, aquesta proteasa s'ha relacionat amb les malalties associades a l'envelliment. Els ratolins modificats genèticament sense PAPP-A viuen un 30-40% més degut a que presenten menys malalties degeneratives associades a l'edat [185] i la fibrosi pulmonar és una malaltia associada a l'envelliment.

4. SELECCIÓ DE I VALIDACIÓ DE DIANES POTENCIALS

En tot estudi amb microarrays és necessari confirmar de manera independent els resultats obtinguts. Per això es va fer una verificació experimental de l'expressió, a nivell de transcrit i posteriorment a nivell de proteïna, d'alguns gens mecanosensibles seleccionats. Es van triar 6 gens d'entre els 63 del mecanotranscriptoma amb un p-valor de mecanosensibilitat elevat i es van validar a nivell de transcrit per RT-PCR. Es van poder observar les mateixes tendències en l'expressió dels gens entre els substrats tous i rígids que en les dades obtingudes per microarrays.

Per fer la validació a nivell de proteïna vam triar 3 dels gens validats que formessin part de les xarxes regulatòries emergents (DUSP10, PAPP-A i IGFBP-3). També es van tenir en compte les evidències prèvies d'un paper en la fisiopatologia de IPF en el cas de la IGFBP-3, o informació bibliogràfica sobre els processos on estaven implicats que suportés un potencial paper en el processos fibrogènics o una relació que podia ser interessant amb la mecanobiologia.

Per a la proteïna DUSP-10 vam mesurar els nivells intracel·lulars per immunocitoquímica i vam trobar que es mantenia el mateix efecte de la duresa que a nivell d'expressió gènica en els fibroblasts controls, reduint la quantitat de proteïna en els gels durs. No obstant, en els fibroblasts fibròtics no es va produir aquesta reducció i en les mostres de la classe IPF fins i tot es va incrementar els nivells de DUSP10 amb l'enduriment del substrat. Aquest comportament diferent podria suggerir una alteració en el processament post-transcripcional. DUSP-10 no havia estat prèviament relacionat amb fibrosi o amb alteracions en la mecanobiologia. Aquesta fosfatasa ha estat implicada en la resposta immune [189] i també s'ha vist que regula negativament les MAPK pro-miocèniques en cèl·lules precursors musculars [190] cosa que la podria relacionar amb alteracions de la mecanobiologia.

DUSP-10 és una fosfatasa de p38 (MAPK14), una quinasa que va aparèixer com un node de l'interactoma del mecanotranscriptoma en aquest estudi. En altres estudis s'ha vist que p38 s'activa per la tensió mecànica i que és necessari per la transformació fibroblast-miofibroblast induïda per TGF- β en fibroblasts de conjuntiva. A més, es va veure que la rigidesa modula l'activació de p38 induïda pel TGF- β , mentre que la via canònica del TGF- β (Smad) va ser menys dependent de la rigidesa [191]. Per tant, DUSP-10 i la MAPK p38 emergeixen com a reguladors de l'activació dels miofibroblasts mecanosensibles, ja que dependrien de les propietats mecàniques del substrat.

En relació a la proteïna PAPP-A, és una proteïna poc caracteritzada a nivell de fibroblast, i es va relacionar per primera vegada amb la mecanobiologia i la fibrosi pulmonar en aquest estudi. La diferència de magnitud entre els nivells de PAPP-A i IGFBP-3 es va mantenir manté aproximadament a nivell transcripcional i de proteïna. Vam observar que el perfil de IGFBP-3 a nivell de proteïna no es corresponia del tot amb el transcripcional. Es va veure una sobreexpressió en la classe IPF, que concordava amb estudis previs [155] i un augment de 3X amb la duresa en fibroblasts fibròtics i control. La proteïna IGFBP-3 ha estat implicada en processos fibròtics i en IPF [155, 192]. Així, s'ha vist que es troba sobreexpressada en la fibrosi en pell i en pulmons, i que els fibroblasts de IPF secreten majors quantitats de IGFBP-3 a la ECM [155]. IGFBP-3 indueix la producció i deposició de col·lagen i fibronectina el fibroblasts pulmonars [155] i indueix la producció i secreció de tenascina C induïda per TGF- β . [193].

5. CARACTERITZACIÓ DE IGFBP-3

Es va escollir IGFBP-3 per caracteritzar-ne alguns aspectes biològics, ja que després de validar aquesta proteïna del mecanotranscriptoma vam veure que els seus nivells diferenciaven específicament la classe IPF de les altres dues i que la seva concentració es triplicava sistemàticament en el microambient

dels fibroblasts en les condicions estudiades. Aquesta proteïna és important per diferenciació cel·lular de cèl·lules mesenquimals, com condrocits o fibroblasts de pròstata [194, 195]. A més, ha estat considerada una via important per la iniciació i propagació de la reacció fibròtica en el pulmó [155, 196] i una potencial diana terapèutica [155, 197]. No obstant no s'havia identificat com a mecanosensible prèviament.

5.1 L'efecte del TGF- β i de l'enduriment en IGFBP-3 són independents

Després d'estudiar per separat els efectes del TGF- β i de l'enduriment de la ECM per separat, vam trobar que l'acumulació de IGFBP-3 en el medi extracel·lular es va trobar fortament induïda pel TGF- β i també per l'enduriment extracel·lular i que la combinació d'aquests dos factors profibròtics independents va produir efectes multiplicatius (sinèrgia).

Vam observar una inducció d'aproximadament 150 vegades pel TGF- β 1 en els nivells de IGFBP-3 en el medi condicionat. Per tant, en concordança amb estudis previs vam corroborar que el TGF- β 1 és un potent inductor de IGFBP-3 en fibroblasts pulmonars [155, 159].

Vam demostrar que malgrat la inhibició de la senyalització a través del receptor TGF- β RI amb l'inhibidor LY364947, es mantenia l'augment de IGFBP-3 induït per la duresa. Aquest resultat suggereix que l'efecte de la duresa del substrat en l'acumulació de IGFBP-3 és independent de la producció de TGF- β de manera autocrina o de l'activació la forma latent. Per altra banda, s'ha vist que la inhibició de la senyalització de TGF- β mitjançant l'inhibidor LY364947 redueix la diferenciació de miofibroblasts induïda per TGF- β , reduint la síntesi de col·lagen i de α -SMA [198, 199]. La inhibició del receptor de TGF- β va reduir l'expressió de col·lagen i la diferenciació de condrocits cultivats en els gels durs, demostrant que la diferenciació dels condrocits en gels durs requereix la inducció de TGF- β mediada per l'enduriment extracel·lular [195]. En contrast, en els fibroblasts pulmonars no semblaria que aquesta inducció mecanosensible de TGF- β fos necessària per a la elevació dels nivells de IGFBP-3 secretada, la qual cosa suggereix que l'efecte de la duresa pot ser depenent del tipus cel·lular i/o teixit d'origen.

Independentment de la presència de TGF- β 1, els nivells de IGFBP-3 van ser majors quan els fibroblasts es van cultivar en un substrat rígid, mantenint un factor 3X d'increment en la concentració. A més, vam observar com la combinació del TGF- β 1 i el substrat rígid produïen una inducció sinèrgica en els nivells de IGFBP-3. En altres estudis s'ha observat una sinèrgia entre una ECM de duresa elevada i la presència de TGF- β . Per exemple es va veure que en fibroblasts pulmonars la rigidesa del substrat incrementa la sensibilitat al TGF- β aplicat de manera exògena (tinció α -SMA) [200]. També, la duresa del substrat va influenciar la diferenciació induïda per TGF- β 1 en fibroblasts pulmonars bronquials afectant l'expressió de col·lagen I i de α -SMA [190]. En un altre estudi s'ha observat que la combinació d'aquests dos factors afavoria de manera potent i sinèrgica la diferenciació de condrocits, a través d'un mecanisme dependent de p38. Així, en els gels durs va augmentar la fosforilació de p38, i es va concloure que aquesta MAPK estava implicada en la sinèrgia observada i també que la seva inhibició reduïa la

diferenciació d'aquestes cèl·lules [195]. Per tant, la MAPK p38 seria essencial per la integració d'informació bioquímica i mecànica i seria essencial per la interacció entre el TGF- β i la duresa de la ECM participant en la formació d'un cicle de retroalimentació essencial per a l'homeòstasi. Cal destacar la relació de p38 amb la seva fosfatasa DUSP-10, una proteïna que hem identificat com a mecanosensible en l'anàlisi del mecanotranscriptoma. Aquestes dades permeten hipotetitzar que l'enduriment i el TGF- β podrien portar a una major activació de p38, a través de l'augment de la seva fosforilació induït per la duresa extracel·lular, i reforçat per una reducció de DUSP-10 amb la duresa. Això afavoriria la diferenciació dels miofibroblasts, i l'expressió i secreció de IGFBP-3 directament o a través de l'activació dels miofibroblasts.

5.2 L'efecte de la duresa en IGFBP-3 requereix la integrina β 1

Per altra banda, vam comprovar que els efectes de l'enduriment sobre IGFBP-3 van ser dependents del receptor de col·lagen β 1. L'ús de l'anticòs monoclonal inhibidor de la integrina β 1 (A1B2) està àmpliament documentat en estudis *in vitro* i *in vivo* [201]. Ni l'anticòs A1B2 ni l'isotip control van alterar la capacitat d'adhesió o la morfologia dels fibroblasts. El bloqueig de la integrina beta 1 va suprimir la inducció de IGFBP-3 pròpia dels substrats rígids, indicant que la resposta de mecanosensibilitat que es tradueix en la inducció de IGFBP-3 en fibroblasts de pulmó està mediada a través de la integrina beta 1. Una possible interpretació pels resultats obtinguts podria ser que després de 2 dies en cultiu, les cèl·lules no poguessin detectar de manera acurada la duresa dels substrats més rígids degut a la inhibició dels receptors, mentre que després de 5 dies podrien haver desenvolupat mecanismes alternatius per a compensar i podrien detectar la duresa del substrat. Alternativament, podria reflectir la dinàmica intrínseca de la síntesi de IGFBP-3 o de la seva estabilitat.

En aquest context cal destacar que s'ha detectat una senyalització aberrant de la via de integrina β 1 en fibroblasts de IPF en resposta a col·lagen. Aquestes cèl·lules presenten un patró patològic de senyalització que resulta en l'activació de la via fosfoinosítide 3-kinase (PI3K) - Akt a través d'uns nivells inapropiadament baixos de PTE [133, 202]. Per altra banda, la integrina β 1 en fibroblasts té un paper essencial en la mecanoresposta [79] i en la mecanosenyalització en fibroblasts pulmonars i dermals, així com en l'homeòstasi, la reparació i la fibrosi. Sembla que aquesta activitat aniria a través de la seva capacitat de mediar l'activació de TGF- β latent a través de la contracció de la matriu, i de modular la producció de col·lagen a través de la senyalització per les adhesions focals [203].

5.3 Divisió de tasques entre l'enduriment extracel·lular, la TGF- β 1 i altres factors en la sobreexpressió anòmala de IGFBP-3 en IPF

Els resultats obtinguts arran del cribratge biomecànic i la caracterització de IGFBP-3 suggereixen que la IGFBP-3 és una proteïna important en fibrogènesi pulmonar mediada per l'enduriment, que portaria a una acumulació de ECM.

També vam observar que els fibroblasts de IPF tenen els nivells basals de IGFBP-3 més alts que les altres 2 classes. En canvi, IGFBP-3 és mecanosensible de manera general en totes les classes de

fibroblasts estudiades i van mostrar el mateix quocient de mecanosensibilitat independentment del TGF- β 1.

Per altra banda, sabem per la literatura que IGFBP-3 és un marcador i mediador de senescència i que aquesta proteïna s'acumula en el medi condicionat dels fibroblasts senescents [204, 205].

En aquest context, cal ressaltar que en cultiu s'observa un creixement lent dels fibroblasts procedents de pulmons amb IPF, la qual cosa és compatible amb la senescència. D'acord amb aquesta interpretació, la IPF és una malaltia associada a l'envelliment [206]. A més, és remarcable que la l'envelliment és un factor de risc per a l'enduriment i la pèrdua d'elasticitat en diversos teixits en l'organisme i que aquests canvis en les propietats mecàniques comporten la una pèrdua de funció que porta associat el desenvolupament de certes malalties [207].

A més, la via proteolítica de fibrinòlisi podria participar en la inducció de la senescència relacionada amb IGFBP-3. Com s'ha discutit anteriorment, els components de les vies de coagulació i fibrinòlisi juguen papers importants en la patogènesi de la IPF i han estat identificats en el mecanotranscriptoma dels fibroblasts pulmonars en el present estudi. Cal destacar que elements d'aquesta via, com PAI-1 i uPa han estat implicats en la inducció de la senescència [208, 209]. En concordança, en un treball recent s'ha identificat la IGFBP-3 com una diana crítica en la inducció de la senescència per PAI-1 en cèl·lules tumorals [210].

Per tot plegat, hipotetitzem que IGFBP-3 es un nexa entre l'envelliment, l'enduriment dels teixits i la fibrosi. En aquest mecanisme hi hauria diferents contribucions a la IGFBP-3 provinents de l'enduriment de la ECM, el TGF- β i la senescència que conduiria a una expressió anormalment elevada de IGFBP-3 ens els fibroblasts de IPF. Així, la senescència prematura dels fibroblasts de la IPF els portaria a acumular uns majors nivells basals de IGFBP-3 independentment de la duresa, mentre que l'enduriment de la matriu i el TGF- β hi contribuirien sinèrgicament. Estudis per verificar aquesta hipòtesi estan actualment en curs al laboratori on s'ha realitzat aquesta tesi.

6. CRIBRATGE D'ELEMENTS DE LA ECM INDEPENDENT DE LA BIOMECÀNICA

Atenent a la importància del matrisoma en les propietats físico-químiques de la ECM, vam voler establir les diferències en l'expressió gènica entre els fibroblasts de la classe control i els de les altres dues classes analitzades per microarrays sense tenir en compte l'efecte de les propietats mecàniques del substrat. Per això ens vam centrar en els gens diferencialment expressats entre IPF i les altres dues classes que estiguessin relacionats amb el matrisoma.

Vam observar més gens que diferencialment expressats entre els fibroblasts IPF i els control que entre IPF i ILD no IPF, indicant que els processos fibròtics inclosos dins les ILD presentarien menys diferències entre sí.

També vam analitzar la contribució dels fibroblasts a l'expressió gènica de les proteïnes del matrisoma del pulmó. Vam observar menys gens diferencialment expressats entre classes que pertanyien al matrisoma respecte de l'esperat, tenint en compte que la fibrosi és un procés caracteritzat per l'alteració en la deposició de la matriu. Per altra banda, la proporció de gens contribuents al matrisoma va ser constant entre IPF i control i IPF i les altres malalties fibròtiques indicant que no hi va haver diferències específiques en l'alteració dels components de la ECM o el microambient del pulmó. Així, hi hauria altres processos biològics i/o funcions moleculars presentarien diferències en l'expressió entre els fibroblasts IPF, els d'altres ILD i els control.

De les proteïnes identificades com a alterades en les ECM de pulmons fibròtics, vam trobar que un 30% estaven diferencialment expressades a nivell de gen en els fibroblasts procedents de pulmons amb IPF respecte a fibroblasts control [Booth 12]. Com era d'esperar, es va trobar un enriquiment en col·làgens fibril·lars, components de les fibres elàstiques (elastina i fibril·lina) i proteoglicans (decorina, asporina, biglicà), així com components de la membrana basal (laminines, nidogen). També van aparèixer proteïnes d'unió a TGF- β i inhibidors de MMP, cosa que era esperable donada la seva implicació en el desenvolupament de la fibrosi pulmonar.

Aquesta dada suggereix que els fibroblasts de pulmó primaris cultivats retenen en bona mesura les alteracions específiques que en el pulmó porten a una acumulació alterada de ECM. Malgrat això, el valor relativament reduït d'aquest percentatge podria ser degut a les limitacions en el disseny del cribratge (mida mostral i variabilitat de mostres de fibroblasts primaris), així com a la contribució d'altres tipus cel·lulars del pulmó, com les cèl·lules epitelials, a la deposició alterada dels components del matrisoma.

Conclusions

CONCLUSIONS

1. El cultiu de fibroblasts pulmonars primaris en gels 3D de col·lagen de rigideses diferents (flotants i adherits) ens ha permès observar diferències en l'expressió gènica i l'activitat proteolítica entre fibroblasts control i fibròtics (IPF). També ha mostrat que l'efecte de l'enduriment en l'activitat transcripcional és selectiva i en bona mesura independent de la TGF- β 1.
2. Malgrat haver pogut observar respostes mecanosensibles, la rigidesa dels gels 3D està fora del rang desitjat per al pulmó fibròtic. En canvi el sistema de gels de PAA en 2D es va considerar més adequat que els cultius 3D ja que cobreix el rang de rigideses fisiopatològic de la IPF.
3. He dissenyat i desenvolupat un mètode de cribratge biomecànic, usant fibroblasts primaris de IPF i comparant-los amb els d'altres dues classes (fibròtica i control) provinents de 2 col·leccions de fibroblasts primaris independents, en presència de la citoquina pro-fibròtica TGF- β 1. Aquest disseny ha permès obtenir una bona resolució en termes de la detecció de respostes a la rigidesa extracel·lular (mecanorespostes) i una capacitat de discriminació més reduïda en termes d'especificitat de classe, degut a les restriccions en el disseny experimental derivades de les limitacions de disponibilitat de mostres biològiques.
4. He obtingut els perfils transcripcionals de 3 classes de fibroblasts, analitzant les diferències entre elles. Una petita fracció (< 2%) dels gens transcripcionalment actius estan regulats per l'enduriment de la matriu. Aquest percentatge és almenys 2 ordres de magnitud inferior a l'obtingut amb cribratges convencionals.
5. S'han analitzat les dades obtingudes, el qual ha permès definir per primera vegada el mecanotranscriptoma dels fibroblasts pulmonars. Aquest inclou almenys 63 gens que revelen la resposta transcripcional de les cèl·lules a l'enduriment de la matriu.
6. L'anàlisi per biologia de sistemes de l'interactoma del mecanotranscriptoma va revelar les xarxes regulatòries emergents, algunes d'elles noves en el camp de la mecanobiologia. Van destacar les fosfatases de MAPK DUSP i les proteïnes d'unió de IGF (IGFBP).
7. He validat a nivell de proteïna 3 dianes moleculars seleccionades a partir d'una llista acotada obtinguda en base a la resposta a l'enduriment i diferències entre classes dels fibroblasts. Les proteïnes DUSP-10, IGFBP-3 i PAPP-A es van detectar com a mecanosensibles i diferencialment expressades entre les classes i van destacar com a potencials de dianes moleculars o biomarcadors rellevants per a la IPF.
8. La proteïna IGFBP-3 es va trobar augmentada en els fibroblasts de IPF de manera específica i va ser consistentment mecanosensible en tots els tipus de fibroblasts. El TGF- β va induir fortament els nivells de IGFBP-3 en el medi extracel·lular, presentant uns efectes sinèrgics amb l'enduriment de la matriu. L'augment de IGFBP-3 induït la duresa va ser independent del

receptor de TGF- β i dependent del receptor de col·lagen integrina β 1. Els resultats van suggerir que la IGFBP-3 és una proteïna important en fibrogènesi pulmonar mediada per l'enduriment.

9. En aquest treball s'ha desenvolupat una nova estratègia experimental basada en un cribratge biomecànic que s'ha aplicat a l'estudi de la IPF i ha permès identificar nous gens i proteïnes mecanosensibles potencialment rellevants per a aquesta malaltia tan greu. La metodologia és extrapolable a l'estudi d'altres malalties de la mecanobiologia.

DIRECCIONS FUTURES

Podem preveure diferents possibles direccions per a continuar expandint el present treball:

- Optimitzar sistemes 3D per incrementar enduriment extracel·lular mitjançant algun agent entrecruant o algun diferents components nadius de la ECM i avaluar l'adequació del sistema per la utilització cribratge d'alt rendiment.
- Estudiar en major profunditat la proteïna IGFBP-3 i explorar la seva connexió amb DUSP-10. Analitzar la localització nuclear i citoplasmàtica d'ambdues proteïnes. Induir la sobreexpressió i la repressió de les dues proteïnes en fibroblasts transfectats amb lentivirus per veure com s'afecten entre si i canvis en el comportament de les cèl·lules.
- Analitzar el comportament de integrina β 1 amb l'enduriment en les diferents classes de fibroblasts primaris.
- Comprovar si la proteïna IGFBP-3 és mecanosensible en fibroblasts d'altres òrgans, i en altres tipus cel·lulars del pulmó (per exemple epitelials i endotelials).
- Investigar les conseqüències patològiques de l'excés de IGFBP-3 en el medi extracel·lular Reproduir l'increment induït per l'enduriment usant la proteïna recombinant i avaluar diversos aspectes, incloent l'activació de les vies canònica (fosforilació de Smad) i no canònica (fosforilació de p38) del TGF- β , l'activació dels miofibroblasts (α -SMA), així com la resistència a l'apoptosi i la inducció de senescència (β -galactosidasa).
- Validar a nivell de proteïna la mecanosensibilitat d'altres gens mecanosensibles identificats en el cribratge biomecànic.
- Validar a nivell de proteïna la connectivitat entre les xarxes reguladores identificades (gens que sobresurten com a *hubs*).
- Estudiar la relació entre l'enduriment i la via de coagulació-fibrinòlisi.

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

1. Chen, J.-H., et al., *Boning up on Wolff's Law: Mechanical regulation of the cells that make and maintain bone*. Journal of biomechanics, 2010. 43(1): p. 108-118.
2. Ingber, D., *Mechanobiology and diseases of mechanotransduction*. Annals of Medicine, 2003. 35(8): p. 564-577.
3. Butcher, D.T., T. Alliston, and V.M. Weaver, *A tense situation: forcing tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2009. 9(2): p. 108-22.
4. Dickenson, R.P., W.C. Hutton, and J.R.R. Stott, *The mechanical properties of bone in osteoporosis*. J. Bone Joint Surg Br., 1981. 63-B(2): p. 233-238.
5. Paszek, M.J., et al., *Tensional homeostasis and the malignant phenotype*. Cancer Cell, 2005. 8(3): p. 241-254.
6. Liu, F., et al., *Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression*. J Cell Biol, 2010. 190(4): p. 693-706.
7. DuFort, C.C., M.J. Paszek, and V.M. Weaver, *Balancing forces: architectural control of mechanotransduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. 12(5): p. 308-19.
8. Engler, A.J., et al., *Matrix elasticity directs stem cell lineage specification*. Cell, 2006. 126(4): p. 677-89.
9. Alcaraz, J., et al., *Laminin and biomimetic extracellular elasticity enhance functional differentiation in mammary epithelia*. Vol. 27. 2008. 2829-2838.
10. Ghosh, K., et al., *Tumor-derived endothelial cells exhibit aberrant Rho-mediated mechanosensing and abnormal angiogenesis in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. 105(32): p. 11305-11310.
11. Alcaraz, J., et al., *Collective epithelial cell invasion overcomes mechanical barriers of collagenous extracellular matrix by a narrow tube-like geometry and MMP14-dependent local softening*. Integr Biol (Camb), 2011. 3(12): p. 1153-66.
12. Wang, J.C. and B.P. Thampatty, *An Introductory Review of Cell Mechanobiology*. Biomechanics and Modeling in Mechanobiology, 2006. 5(1): p. 1-16.
13. Humphries, J.D., A. Byron, and M.J. Humphries, *Integrin ligands at a glance*. J Cell Sci, 2006. 119(Pt 19): p. 3901-3.
14. Hynes, R.O. and A. Naba, *Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. 4(1): p. a004903.
15. Chiquet, M., et al., *From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1793(5): p. 911-20.
16. Henderson, N.C. and D. Sheppard, *Integrin-mediated regulation of TGFbeta in fibrosis*. Biochim Biophys Acta, 2013. 1832(7): p. 891-6.
17. Huber, F., et al., *Emergent complexity of the cytoskeleton: from single filaments to tissue*. Adv Phys, 2013. 62(1): p. 1-112.
18. Maciaszek, J.L. and G. Lykotrafitis, *Sickle cell trait human erythrocytes are significantly stiffer than normal*. Journal of Biomechanics, 2011. 44(4): p. 657-661.
19. Verstraeten, V.L.R.M., et al., *Increased mechanosensitivity and nuclear stiffness in Hutchinson–Gilford progeria cells: effects of farnesyltransferase inhibitors*. Aging Cell, 2008. 7(3): p. 383-393.
20. Hosseini, S.M. and James J. Feng, *How Malaria Parasites Reduce the Deformability of Infected Red Blood Cells*. Biophysical Journal, 2012. 103(1): p. 1-10.
21. Waki, M., et al., *Reduction of intraocular pressure by topical administration of an inhibitor of the Rho-associated protein kinase*. Curr Eye Res, 2001. 22(6): p. 470-474.
22. Biernacka, A., M. Dobaczewski, and N.G. Frangogiannis, *TGF-β signaling in fibrosis*. Growth Factors, 2011. 29(5): p. 196-202.

23. Todd, N.W., I.G. Luzina, and S.P. Atamas, *Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2012. 5(1): p. 11.
24. Pardo, A., M. Selman, and N. Kaminski, *Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. 40(6-7): p. 1141-55.
25. Micallef, L., et al., *The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2012. 5(Suppl 1 Proceedings of Fibroproliferative disorders: from biochemical analysis to targeted therapies Petro E Petrides and David Brenner): p. S5.
26. Kisseleva, T. and D.A. Brenner, *Fibrogenesis of Parenchymal Organs*. Proceedings of the American Thoracic Society, 2008. 5(3): p. 338-342.
27. Frantz, C., K.M. Stewart, and V.M. Weaver, *The extracellular matrix at a glance*. J Cell Sci, 2010. 123(Pt 24): p. 4195-200.
28. Thannickal, V.J., et al., *Matrix biology of idiopathic pulmonary fibrosis: a workshop report of the national heart, lung, and blood institute*. Am J Pathol, 2014. 184(6): p. 1643-51.
29. Kendall, R.T. and C.A. Feghali-Bostwick, *Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators*. Front Pharmacol, 2014. 5: p. 123.
30. Clarke, D.L., et al., *Matrix regulation of idiopathic pulmonary fibrosis: the role of enzymes*. Fibrogenesis & Tissue Repair, 2013. 6: p. 20-20.
31. Suki, B., D. Stamenovic, and R. Hubmayr, *Lung parenchymal mechanics*. Compr Physiol, 2011. 1(3): p. 1317-51.
32. Cox, T.R. and J.T. Eler, *Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer*. Dis Model Mech, 2011. 4(2): p. 165-78.
33. Sottile, J. and D.C. Hocking, *Fibronectin Polymerization Regulates the Composition and Stability of Extracellular Matrix Fibrils and Cell-Matrix Adhesions*. Molecular Biology of the Cell, 2002. 13(10): p. 3546-3559.
34. B, A., J. A, and L. J, *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. 2002, New York: Garland Science.
35. Baghy, K., R.V. Iozzo, and I. Kovalszky, *Decorin-TGF β Axis in Hepatic Fibrosis and Cirrhosis*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2012. 60(4): p. 262-268.
36. Ruiz, X.D., et al., *Syndecan-2 is a novel target of insulin-like growth factor binding protein-3 and is over-expressed in fibrosis*. PLoS One, 2012. 7(8): p. e43049.
37. Andersson-Sjöland, A., et al., *Versican in inflammation and tissue remodelling: the impact on lung disorders*. Glycobiology, 2014.
38. Hattori, N., et al., *Pericellular Versican Regulates the Fibroblast-Myofibroblast Transition: A ROLE FOR ADAMT55 PROTEASE-MEDIATED PROTEOLYSIS*. The Journal of Biological Chemistry, 2011. 286(39): p. 34298-34310.
39. Roberts, C.R. and A.K. Burke, *Synthesis of the proteoglycan versican in pulmonary fibrosis*. International Journal of Experimental Pathology, 2000. 81(1): p. A21-A22.
40. Greenlee, K.J., Z. Werb, and F. Kheradmand, *Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted*. Physiol Rev, 2007. 87(1): p. 69-98.
41. Beurden, S.-v., P.A.M.V.d. Hoff, and J. W., *Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. BioTechniques, 2005. 38(1): p. 73-83.
42. Pardo, A. and M. Selman, *Role of matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis*. Fibrogenesis & Tissue Repair, 2012. 5.
43. Lindner, D., et al., *Differential expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts with different origins*. Biochem Res Int, 2012. 2012: p. 875742.
44. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *HOW MATRIX METALLOPROTEINASES REGULATE CELL BEHAVIOR*. Annual review of cell and developmental biology, 2001. 17: p. 463-516.

45. Mori, H., et al., *Transmembrane/cytoplasmic, rather than catalytic, domains of Mmp14 signal to MAPK activation and mammary branching morphogenesis via binding to integrin β 1*. *Development*, 2013. 140(2): p. 343-352.
46. Giannandrea, M. and W.C. Parks, *Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis*. *Disease Models & Mechanisms*, 2014. 7(2): p. 193-203.
47. Kis, K., X. Liu, and J.S. Hagood, *Myofibroblast differentiation and survival in fibrotic disease*. *Expert Rev Mol Med*, 2011. 13: p. e27.
48. McAnulty, R.J., *Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. 39(4): p. 666-71.
49. Barkauskas, C.E. and P.W. Noble, *Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 7. New insights into the cellular mechanisms of pulmonary fibrosis*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014. 306(11): p. C987-96.
50. Mehrad, B. and R.M. Strieter, *Fibrocytes and the pathogenesis of diffuse parenchymal lung disease*. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 2012. 5(Suppl 1): p. S22-S22.
51. Habielski, D.M. and C. Hogaboam, *Heterogeneity in fibroblast proliferation and survival in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Front Pharmacol*, 2014. 5: p. 2.
52. Blackwell, T.S., et al., *Future Directions in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Research. An NHLBI Workshop Report*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2014. 189(2): p. 214-222.
53. Hinz, B., *The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell*. *J Biomech*, 2010. 43(1): p. 146-55.
54. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(5): p. 349-63.
55. Hinz, B., et al., *Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling*. *Am J Pathol*, 2012. 180(4): p. 1340-55.
56. Wells, R.G., *Tissue mechanics and fibrosis*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1832(7): p. 884-90.
57. Marinkovic, A., F. Liu, and D.J. Tschumperlin, *Matrices of physiologic stiffness potentially inactivate idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013. 48(4): p. 422-30.
58. Balestrini, J.L., et al., *The mechanical memory of lung myofibroblasts*. *Integr Biol (Camb)*, 2012. 4(4): p. 410-21.
59. Liu, S., et al., *Expression of integrin beta1 by fibroblasts is required for tissue repair in vivo*. *J Cell Sci*, 2010. 123(Pt 21): p. 3674-82.
60. Carracedo, S., et al., *The fibroblast integrin alpha11beta1 is induced in a mechanosensitive manner involving activin A and regulates myofibroblast differentiation*. *J Biol Chem*, 2010. 285(14): p. 10434-45.
61. Schiller, M., D. Javelaud, and A. Mauviel, *TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing*. *Journal of dermatological science*, 2004. 35(2): p. 83-92.
62. Horiguchi, M., M. Ota, and D.B. Rifkin, *Matrix control of transforming growth factor-beta function*. *J Biochem*, 2012. 152(4): p. 321-9.
63. Hinz, B., *Tissue stiffness, latent TGF- β 1 Activation, and mechanical signal transduction: Implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis*. *Current Rheumatology Reports*, 2009. 11(2): p. 120-126.
64. Wipff, P.J. and B. Hinz, *Myofibroblasts work best under stress*. *J Bodyw Mov Ther*, 2009. 13(2): p. 121-7.
65. Wipff, P.-J., et al., *Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix*. *The Journal of Cell Biology*, 2007. 179(6): p. 1311-1323.
66. Connolly, E.C., J. Freimuth, and R.J. Akhurst, *Complexities of TGF- β Targeted Cancer Therapy*. *International Journal of Biological Sciences*, 2012. 8(7): p. 964-978.
67. Goodwin, A. and G. Jenkins, *Role of integrin-mediated TGFbeta activation in the pathogenesis of pulmonary fibrosis*. *Biochem Soc Trans*, 2009. 37(Pt 4): p. 849-54.

68. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2002. 165(2): p. 277-304.
69. Effros, R.M., *Anatomy, development, and physiology of the lungs*. GI Motility online, 2006.
70. National Heart, L., and Blood Institute. *The Respiratory System*. 2012; Available from: <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/hlw/system.html>.
71. Herzog, E.L., et al., *Knowns and unknowns of the alveolus*. *Proc Am Thorac Soc*, 2008. 5(7): p. 778-82.
72. Fernandez, I.E. and O. Eickelberg, *New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis*. *The Lancet*, 2012. 380(9842): p. 680-688.
73. Shi, W., J. Xu, and D. Warburton, *Development, repair and fibrosis: what is common and why it matters*. *Respirology*, 2009. 14(5): p. 656-65.
74. Faffe, D.S. and W.A. Zin, *Lung parenchymal mechanics in health and disease*. *Physiol Rev*, 2009. 89(3): p. 759-75.
75. Suki, B. and J.H. Bates, *Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2008. 163(1-3): p. 33-43.
76. Dolhnikoff, M., T. Mauad, and M.S. Ludwig, *Extracellular Matrix and Oscillatory Mechanics of Rat Lung Parenchyma in Bleomycin-induced Fibrosis*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1999. 160(5): p. 1750-1757.
77. McGee, K.P., R.D. Hubmayr, and R.L. Ehman, *MR elastography of the lung with hyperpolarized ³He*. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2008. 59(1): p. 14-18.
78. Ebihara, T., et al., *Changes in Extracellular Matrix and Tissue Viscoelasticity in Bleomycin-induced Lung Fibrosis*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000. 162(4): p. 1569-1576.
79. Acerbi, I., et al., *Integrin-Specific Mechanoresponses to Compression and Extension Probed by Cylindrical Flat-Ended AFM Tips in Lung Cells*. *PLoS ONE*, 2012. 7(2): p. e32261.
80. Lai-Fook, S.J. and R.E. Hyatt, *Effects of age on elastic moduli of human lungs*. *Journal of Applied Physiology*, 2000. 89(1): p. 163-168.
81. Pinart, M., et al., *Single and repeated bleomycin intratracheal instillations lead to different biomechanical changes in lung tissue*. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2009. 166(1): p. 41-46.
82. Raghu, G., et al., *An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2011. 183(6): p. 788-824.
83. Nalysnyk, L., et al., *Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature*. *Eur Respir Rev*, 2012. 21(126): p. 355-61.
84. *Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000. 161(2): p. 646-664.
85. Xaubet, A., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis*. *Sociedad Espanola de Neumologia y Cirugia Toracica (SEPAR) Research Group on Diffuse Pulmonary Diseases*. *Arch Bronconeumol*, 2013. 49(8): p. 343-53.
86. Lee, A.S., et al., *The burden of idiopathic pulmonary fibrosis: An unmet public health need*. *Respiratory Medicine*, 2014. 108(7): p. 955-967.
87. Woodcock, H.V. and T.M. Maher, *The treatment of idiopathic pulmonary fibrosis*. *F1000Prime Rep*, 2014. 6: p. 16.
88. Takeda, Y., et al., *Efficacy and safety of pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis*. *Patient preference and adherence*, 2014. 8: p. 361-370.
89. Eickelberg, O. and G.J. Laurent, *The quest for the initial lesion in idiopathic pulmonary fibrosis: gene expression differences in IPF fibroblasts*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010. 42(1): p. 1-2.
90. Scotton, C.J. and R.C. Chambers, *Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus*. *Chest*, 2007. 132(4): p. 1311-21.

91. Drakopanagiotakis, F., et al., *Apoptosis in lung injury and fibrosis*. European Respiratory Journal, 2008. 32(6): p. 1631-1638.
92. Tzouveleakis, A., S. Anevlaivis, and D. Bouros, *Angiogenesis in Interstitial Lung Diseases: a pathogenetic hallmark or a bystander?* Respiratory Research, 2006. 7(82).
93. Bargagli, E., et al., *Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: A review*. Respiratory Medicine, 2009. 103(9): p. 1245-1256.
94. Selman, M., A. Pardo, and N. Kaminski, *Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs?* PLoS Med, 2008. 5(3): p. e62.
95. Harari, S. and A. Caminati, *IPF: new insight on pathogenesis and treatment*. Allergy, 2010. 65(5): p. 537-53.
96. Selman, M. and A. Pardo, *Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder*. Respiratory Research, 2002. 3(3).
97. Ramos, C., et al., *Fibroblasts from Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Normal Lungs Differ in Growth Rate, Apoptosis, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Expression*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2001. 24(5): p. 591-598.
98. Pardo, A., et al., *Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis*. PLoS Med, 2005. 2(9): p. e251.
99. Selman, M., et al., *Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. 173(2): p. 188-98.
100. Zuo, F., et al., *Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(9): p. 6292-7.
101. Selman, M., et al., *TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment?* American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, 2000. 279(3): p. L562-L574.
102. Patterson, J., M.M. Martino, and J.A. Hubbell, *Biomimetic materials in tissue engineering*. Materials Today, 2010. 13(1-2): p. 14-22.
103. Ruiz, V., et al., *Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. 285(5): p. L1026-36.
104. Naba, A., et al., *The Matrisome: In Silico Definition and In Vivo Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices*. Mol Cell Proteomics, 2012. 11(4).
105. Booth, A.J., et al., *Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for in vitro investigation*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. 186(9): p. 866-76.
106. King, T.E., A. Pardo, and M. Selman, *Idiopathic pulmonary fibrosis*. The Lancet, 2011. 378(9807): p. 1949-1961.
107. Travis, W.D., et al., *An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. 188(6): p. 733-48.
108. Cordier, J.-F., *Cryptogenic organising pneumonia*. European Respiratory Journal, 2006. 28(2): p. 422-446.
109. Myers, J.L., *Hypersensitivity pneumonia: the role of lung biopsy in diagnosis and management*. Mod Pathol, 2012. 25 Suppl 1: p. S58-67.
110. Bourke, S.J., et al., *Hypersensitivity pneumonitis: current concepts*. European Respiratory Journal, 2001. 18(32 suppl): p. 81s-92s.
111. Peng, R., et al., *Bleomycin Induces Molecular Changes Directly Relevant to Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Model for "Active" Disease*. PLoS ONE 2013. 8(4).
112. Limjunyawong, N., W. Mitzner, and M.R. Horton, *A mouse model of chronic idiopathic pulmonary fibrosis*. Physiol Rep, 2014. 2(2): p. e00249.

113. Georges, P.C. and P.A. Janmey, *Cell type-specific response to growth on soft materials*. J Appl Physiol (1985), 2005. 98(4): p. 1547-53.
114. Georges, P.C., et al., *Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. 293(6): p. G1147-54.
115. Li, Z., et al., *Transforming growth factor-beta and substrate stiffness regulate portal fibroblast activation in culture*. Hepatology, 2007. 46(4): p. 1246-56.
116. Huang, X., et al., *Matrix stiffness-induced myofibroblast differentiation is mediated by intrinsic mechanotransduction*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012. 47(3): p. 340-8.
117. Jaluria, P., et al., *A perspective on microarrays: current applications, pitfalls, and potential uses*. Microb Cell Fact, 2007. 6: p. 4.
118. Kass, D.J. and N. Kaminski, *Evolving genomic approaches to idiopathic pulmonary fibrosis: moving beyond genes*. Clin Transl Sci, 2011. 4(5): p. 372-9.
119. Renzoni, E.A., et al., *Gene expression profiling reveals novel TGFbeta targets in adult lung fibroblasts*. Respir Res, 2004. 5: p. 24.
120. Vuga, L.J., et al., *WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. 41(5): p. 583-9.
121. Kaminski, N. and I.O. Rosas, *Gene expression profiling as a window into idiopathic pulmonary fibrosis pathogenesis: can we identify the right target genes?* Proc Am Thorac Soc, 2006. 3(4): p. 339-44.
122. Studer, S.M. and N. Kaminski, *Towards systems biology of human pulmonary fibrosis*. Proc Am Thorac Soc, 2007. 4(1): p. 85-91.
123. Hsu, E., et al., *Lung tissues in patients with systemic sclerosis have gene expression patterns unique to pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension*. Arthritis Rheum, 2011. 63(3): p. 783-94.
124. Yang, I.V., et al., *Gene expression profiling of familial and sporadic interstitial pneumonia*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. 175(1): p. 45-54.
125. Rajkumar, R., et al., *Genomewide RNA expression profiling in lung identifies distinct signatures in idiopathic pulmonary arterial hypertension and secondary pulmonary hypertension*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2010. 298(4): p. H1235-H1248.
126. Selman, M., et al., *Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behavior and gene expression pattern*. PLoS One, 2007. 2(5): p. e482.
127. Kelly, M.M., et al., *Cell-specific gene expression in patients with usual interstitial pneumonia*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. 174(5): p. 557-65.
128. Cosgrove, G.P., *Overexpression of Matrix Metalloproteinase-7 in Pulmonary Fibrosis*. Chest, 2002. 121(90030): p. 25S-a-26.
129. Bridges, R.S., et al., *Gene expression profiling of pulmonary fibrosis identifies Twist1 as an antiapoptotic molecular "rectifier" of growth factor signaling*. Am J Pathol, 2009. 175(6): p. 2351-61.
130. Bilello, J.A., *The agony and ecstasy of "OMIC" technologies in drug development*. Vol. 5. 2005. 39-52.
131. Hellerstein, M.K., *A critique of the molecular target-based drug discovery paradigm based on principles of metabolic control: Advantages of pathway-based discovery*. Metabolic Engineering, 2008. 10(1): p. 1-9.
132. Hood, L. and R.M. Perlmutter, *The impact of systems approaches on biological problems in drug discovery*. Nat Biotech, 2004. 22(10): p. 1215-1217.
133. Larsson, O., et al., *Fibrotic myofibroblasts manifest genome-wide derangements of translational control*. PLoS One, 2008. 3(9): p. e3220.
134. Gabasa, M., et al., *Lung myofibroblasts are characterized by down-regulated cyclooxygenase-2 and its main metabolite, prostaglandin E2*. PLoS One, 2013. 8(6): p. e65445.
135. Puig, M., et al., *Matrix Stiffening and β 1 Integrin Drive Subtype-Specific Fibroblast Accumulation in Lung Cancer*. Molecular Cancer Research, 2015. 13(1): p. 161-173.

136. Yeung, T., et al., *Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion*. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2005. 60(1): p. 24-34.
137. Fischer, R.S., et al., *Stiffness-controlled three-dimensional extracellular matrices for high-resolution imaging of cell behavior*. Nat Protoc, 2012. 7(11): p. 2056-66.
138. Aratyn-Schaus, Y., et al., *Preparation of Complaint Matrices for Quantifying Cellular Contraction*. J Vis Exp, 2010(46): p. e2173.
139. MD, A., M. PJ, and R. SJ, *Image processing with ImageJ*. Biophotonics Int, 2014. 11: p. 36-42.
140. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method*. Methods, 2001. 25(4): p. 402-408.
141. Gautier, L., et al., *affy—analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level*. Bioinformatics, 2004. 20(3): p. 307-315.
142. Irizarry, R.A., et al., *Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data*. Biostatistics, 2003. 4(2): p. 249-264.
143. Bolstad, B.M., et al., *A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias*. Bioinformatics, 2003. 19(2): p. 185-193.
144. Jensen, L.J., et al., *STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms*. Nucleic Acids Res, 2009. 37(Database issue): p. D412-6.
145. Hetzel, M., et al., *Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts*. Lung, 2005. 183(4): p. 225-37.
146. Alcaraz, J., et al., *Collective epithelial cell invasion overcomes mechanical barriers of collagenous extracellular matrix by a narrow tube-like geometry and MMP14-dependent local softening*. Integrative Biology, 2011. 3(12): p. 1153-1166.
147. Laurent, G.J., *Lung collagen: more than scaffolding*. Thorax, 1986. 41(6): p. 418-428.
148. Suki, B., et al., *Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces*. J Appl Physiol (1985), 2005. 98(5): p. 1892-9.
149. de Rooij, J., et al., *Integrin-dependent actomyosin contraction regulates epithelial cell scattering*. J Cell Biol, 2005. 171(1): p. 153-64.
150. Kandow, C.E., et al., *Polyacrylamide Hydrogels for Cell Mechanics: Steps Toward Optimization and Alternative Uses*, in *Methods in Cell Biology*, W. Yu-Li and E.D. Dennis, Editors. 2007, Academic Press. p. 29-46.
151. DePianto, D.J., et al., *Heterogeneous gene expression signatures correspond to distinct lung pathologies and biomarkers of disease severity in idiopathic pulmonary fibrosis*. Thorax, 2015. 70(1): p. 48-56.
152. Emblom-Callahan, M.C., et al., *Genomic phenotype of non-cultured pulmonary fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis*. Genomics, 2010. 96(3): p. 134-45.
153. Boon, K., et al., *Molecular phenotypes distinguish patients with relatively stable from progressive idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)*. PLoS One, 2009. 4(4): p. e5134.
154. Koli, K., et al., *Bone morphogenetic protein-4 inhibitor gremlin is overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Pathol, 2006. 169(1): p. 61-71.
155. Pilewski, J.M., et al., *Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins 3 and 5 Are Overexpressed in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Contribute to Extracellular Matrix Deposition*. The American Journal of Pathology, 2005. 166(2): p. 399-407.
156. Roach, K.M., et al., *The K⁺ channel KCa3.1 as a novel target for idiopathic pulmonary fibrosis*. PLoS One, 2013. 8(12): p. e85244.
157. Reference, N.L.o.M.U.G.H. *Genetics home reference*. 2014; Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/>.
158. Halling-Brown, M., et al., *canSAR: an integrated cancer public translational research and drug discovery resource*. Nucleic Acids Res, 2012. 40: p. D947-56.

159. Chambers, R.C., et al., *Global Expression Profiling of Fibroblast Responses to Transforming Growth Factor- β 1 Reveals the Induction of Inhibitor of Differentiation-1 and Provides Evidence of Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching*. The American Journal of Pathology, 2003. 162(2): p. 533-546.
160. Kapoun, A.M., et al., *B-Type Natriuretic Peptide Exerts Broad Functional Opposition to Transforming Growth Factor- β in Primary Human Cardiac Fibroblasts: Fibrosis, Myofibroblast Conversion, Proliferation, and Inflammation*. Circulation Research, 2004. 94(4): p. 453-461.
161. Xu, X.L. and A.M. Kapoun, *Heterogeneous activation of the TGF β pathway in glioblastomas identified by gene expression-based classification using TGF β -responsive genes*. J Transl Med, 2009. 7: p. 12.
162. Bermudez, O., G. Pages, and C. Gimond, *The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. 299(2): p. C189-202.
163. Conover, C.A., *Role of PAPP-A in aging and age-related disease*. Exp Gerontol, 2013. 48(7): p. 612-3.
164. Kural, M.H. and K.L. Billiar, *Regulating tension in three-dimensional culture environments*. Exp Cell Res, 2013. 319(16): p. 2447-59.
165. Toth, M. and R. Fridman, *Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography*. Methods in molecular medicine, 2001. 57: p. 10.1385/1-59259-136-1:163.
166. Kessler, D., et al., *Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype*. J Biol Chem, 2001. 276(39): p. 36575-85.
167. Breen, E.C., *Mechanical strain increases type I collagen expression in pulmonary fibroblasts in vitro*. Journal of Applied Physiology, 2000. 88(1): p. 203-209.
168. Kähäri, V.M., H. Larjava, and J. Uitto, *Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor- β 1 up-regulates biglycan (PGI), and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture*. Journal of Biological Chemistry, 1991. 266(16): p. 10608-10615.
169. Estany, S., et al., *Lung fibrotic tenascin-C upregulation is associated with other extracellular matrix proteins and induced by TGF β 1*. BMC Pulmonary Medicine, 2014. 14: p. 120-120.
170. Yamashita, M., et al., *The definition of fibrogenic processes in fibroblastic foci of idiopathic pulmonary fibrosis based on morphometric quantification of extracellular matrices*. Hum Pathol, 2009. 40(9): p. 1278-87.
171. Selman, M. and A. Pardo, *Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers*. Proc Am Thorac Soc, 2006. 3(4): p. 364-72.
172. Cho, J.H., et al., *Systems biology of interstitial lung diseases: integration of mRNA and microRNA expression changes*. BMC Med Genomics, 2011. 4: p. 8.
173. Vogel, V. and M.P. Sheetz, *Cell fate regulation by coupling mechanical cycles to biochemical signaling pathways*. Current opinion in cell biology, 2009. 21(1): p. 38-46.
174. Tojkander, S., G. Gateva, and P. Lappalainen, *Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles*. J Cell Sci, 2012. 125(Pt 8): p. 1855-64.
175. Adelstein, R.S., *Regulation of contractile proteins by phosphorylation*. Journal of Clinical Investigation, 1983. 72(6): p. 1863-1866.
176. Caunt, C.J. and S.M. Keyse, *Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling*. FEBS J, 2013. 280(2): p. 489-504.
177. Chu, E.K., et al., *Induction of the plasminogen activator system by mechanical stimulation of human bronchial epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. 35(6): p. 628-38.
178. Li, W.-Y., et al., *Plasminogen activator/plasmin system: A major player in wound healing?* Wound Repair and Regeneration, 2003. 11(4): p. 239-247.
179. Ghosh, A.K. and D.E. Vaughan, *PAI-1 in tissue fibrosis*. Journal of Cellular Physiology, 2012. 227(2): p. 493-507.

180. Khalil, N., et al., *Plasmin regulates the activation of cell-associated latent TGF-beta 1 secreted by rat alveolar macrophages after in vivo bleomycin injury*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 1996. 15(2): p. 252-259.
181. Liu, F. and D.J. Tschumperlin, *Micro-mechanical characterization of lung tissue using atomic force microscopy*. J Vis Exp, 2011(54).
182. Senoo, T., et al., *Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis*. Thorax, 2010. 65(4): p. 334-340.
183. Giachelli, C.M., et al., *Regulation of Vascular Calcification: Roles of Phosphate and Osteopontin*. Circulation Research, 2005. 96(7): p. 717-722.
184. Granada Ybern, M.L., *Factor de crecimiento similar a la insulina y sus proteínas de transporte*. TITLEREVISTA, 2006. 53(07): p. 467-476.
185. Conover, C.A., *Key questions and answers about pregnancy-associated plasma protein-A*. Trends Endocrinol Metab, 2012. 23(5): p. 242-9.
186. Lawrence, J.B., et al., *The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. 96(6): p. 3149-3153.
187. Rehage, M., et al., *Transgenic Overexpression of Pregnancy-Associated Plasma Protein-A Increases the Somatic Growth and Skeletal Muscle Mass in Mice*. Endocrinology, 2007. 148(12): p. 6176-6185.
188. Chen, B.-K., et al., *Localization and Regulation of Pregnancy-Associated Plasma Protein A Expression in Healing Human Skin*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2003. 88(9): p. 4465-4471.
189. Zhang, Y., et al., *Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5*. Nature, 2004. 430(7001): p. 793-797.
190. Shi, H., et al., *Improved regenerative myogenesis and muscular dystrophy in mice lacking Mkp5*. The Journal of Clinical Investigation, 2013. 123(5): p. 2064-2077.
191. Meyer-ter-Vehn, T., et al., *Extracellular matrix elasticity modulates TGF-beta-induced p38 activation and myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. 52(12): p. 9149-55.
192. Hamaguchi, Y., et al., *Elevated serum insulin-like growth factor (IGF-1) and IGF binding protein-3 levels in patients with systemic sclerosis: possible role in development of fibrosis*. J Rheumatol, 2008. 35(12): p. 2363-71.
193. Brissett, M., et al., *Localized expression of tenascin in systemic sclerosis-associated pulmonary fibrosis and its regulation by insulin-like growth factor binding protein 3*. Arthritis Rheum, 2012. 64(1): p. 272-80.
194. Sampson, N., et al., *Stromal insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) is elevated in the diseased human prostate and promotes ex vivo fibroblast-to-myofibroblast differentiation*. Endocrinology, 2013. 154(8): p. 2586-99.
195. Allen, J.L., M.E. Cooke, and T. Alliston, *ECM stiffness primes the TGFβ pathway to promote chondrocyte differentiation*. Molecular Biology of the Cell, 2012. 23(18): p. 3731-3742.
196. Ruan, W. and K. Ying, *Abnormal expression of IGF-binding proteins, an initiating event in idiopathic pulmonary fibrosis?* Pathol Res Pract, 2010. 206(8): p. 537-43.
197. Veraldi, K.L. and C.A. Feghali-Bostwick, *Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins-3 and -5: Central Mediators of Fibrosis and Promising New Therapeutic Targets*. The Open Rheumatology Journal, 2012. 6: p. 140-145.
198. Li, C., et al., *Arsenic trioxide induces cardiac fibroblast apoptosis in vitro and in vivo by up-regulating TGF-beta1 expression*. Toxicol Lett, 2013. 219(3): p. 223-30.
199. Xu, H., et al., *A new antifibrotic target of Ac-SDKP: inhibition of myofibroblast differentiation in rat lung with silicosis*. PLoS One, 2012. 7(7): p. e40301.
200. Chia, H.N., M. Vigen, and A.M. Kasko, *Effect of substrate stiffness on pulmonary fibroblast activation by TGF-beta*. Acta Biomater, 2012. 8(7): p. 2602-11.

201. Levental, K.R., et al., *Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling*. Cell, 2009. 139(5): p. 891-906.
202. Xia, H., et al., *Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. J Exp Med, 2008. 205(7): p. 1659-72.
203. Leask, A., *Integrin 1: A Mechanosignaling Sensor Essential for Connective Tissue Deposition by Fibroblasts*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2013. 2(4): p. 160-166.
204. Goldstein, S., et al., *Insulin-like growth factor binding protein 3 accumulates to high levels in culture medium of senescent and quiescent human fibroblasts*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. 88(21): p. 9680-9684.
205. Moerman, E.J., et al., *Insulin-like growth factor binding protein-3 is overexpressed in senescent and quiescent human fibroblasts*. Exp Gerontol, 1993. 28(4-5): p. 361-70.
206. Raghu, G., F. Nyberg, and G. Morgan, *The epidemiology of interstitial lung disease and its association with lung cancer*. Br J Cancer, 2004. 91 Suppl 2: p. S3-10.
207. Sherratt, M.J., *Age-Related Tissue Stiffening: Cause and Effect*. Advances in Wound Care, 2013. 2(1): p. 11-17.
208. Kortlever, R.M. and R. Bernards, *Senescence, Wound Healing, and Cancer: the PAI-1 Connection*. Cell Cycle, 2006. 5(23): p. 2697-2703.
209. Kortlever, R.M., P.J. Higgins, and R. Bernards, *Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence*. Nature cell biology, 2006. 8(8): p. 877-884.
210. Elzi, D.J., et al., *Plasminogen activator inhibitor 1 - insulin-like growth factor binding protein 3 cascade regulates stress-induced senescence*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. 109(30): p. 12052-12057.

Apèndix I: Protocols

A. CELL CULTURE IN 3D COLLAGEN I GELS

1. General Remarks

- Common sources of collagen I (COL I) are rat tail and bovine dermis. High quality COL I networks are more readily obtained from bovine dermis sources, so these are preferred to rat tail.
- COL I must be prepared fresh for every experiment. Once prepared, it must be used within the next 2-3 h.
- COL I gellation is very sensitive to pH and to temperature, therefore these conditions must be controlled accurately and reproduced. Perform all steps on ice
- With each new lot of COL I, the right concentration of NaOH necessary to obtain a physiologic pH upon must be optimized.
- Consider treating your cells before plating with ascorbic acid, since it is required to deposit collagen by cells.
- Add ~30-40% extra COL volume to the volume needed for your experiment, since there is always some shrinking and COL I volume loss due to its stickiness to the tip walls.

2. Protocol

1. Store all tubes and reagents on ice. Warm up trypsin and media to be used for your cells.
2. Neutralization of COL I. Do all these steps on ice:
 - 2.1. Add 800 μ l of COL I (stock) to the bottom of 50 ml tube. Collect ~810 μ l to account for the COL I solution that will stick on the tip walls. Add 100 μ l of DMEM 1X. Shake vigorously. Wait few seconds.
 - 2.2. Add 100 μ l of 0.1M NaOH. Shake vigorously. Wait few seconds. The solution must now look pinkish.
 - 2.3. Check that pH falls within physiologic range. Adjust pH if needed (not recommended).
3. Prepare target COL I concentration by diluting the neutralized COL I solution with the same culture media you use for your cells without serum.

NOTE: avoid serum in your preparation, since COL I has binding sites for many factors present in the serum that makes it difficult to wash out.

NOTE: consider that COL I concentration below than 2 mg/ml implies a pore size bigger than the typical size of mammalian cells.

4. Pre-coat the bottom of your culture vessel (well, dish, plate) by covering its surface with a thin layer of the COL I solution (prepared in step #3) by gently and slowly 'painting' the COL I solution on the surface with your tip. Incubate at 37 °C for 30 min.
5. Trypsinize your cells as usual. Count your cell density. Collect the volume of cell suspension that contains the desired amount of cells for your experiments and transfer to a new tube. Centrifuge. Aspirate the media (be careful of not aspirating the cell pellet), and resuspend with the desired amount of COL I by pipetting up and down with a blue tip very slowly and gently to avoid introducing air bubbles. Keep tube on ice.

NOTE: typical cell density is 0.5-1 10^6 cells/ml of ECM solution, depending on your experiment and growing rates.

NOTE: for RNA experiments, plate at least 200,000 cells per condition (24 well plate is enough). For protein experiments, plate at least 500,000 cells per condition (24 well or up to 6 well plates must be needed).

NOTE: keep in mind that air concentration within the gel depends on its thickness. Therefore it is desirable to keep the thickness of your gel constant for all your experimental conditions.

6. Add the desired amount of gel + cells solution to your pre-coated culture dish/well. Incubate at 37C for 30 min.
7. Add cell culture media to your gels. Use at least 2X the gel volume to calculate the amount of culture media.
8. When changing culture media, do not use vacuum to aspirate the media since you will detach the gel, use a pipette tip instead.

WARNING! When making calculations to assess the volume of a drug/inhibitor to be added for a given experiment, you must consider that the final dilution volume is the addition of both the culture medium AND the volume of the gel! If you do not consider the gel volume, your treatment will be overdiluted!

B. ZIMOGRAFIA

1. Introducción i objetivos

La zimografía es un método de determinación de la actividad metaloproteínasa. La actividad metaloproteínasa se detectará como unas bandas claras sobre un fondo oscuro azulado debido a la tinción con azul de *Coomassie*.

2. Muestras

Tejido de origen animal homogenizado, lavado broncoalveolar o sobrenadante de células en cultivo.

Sobrenadante de células en cultivo congelado en presencia de inhibidores de proteasas EDTA-free (ROCHE). Los inhibidores de proteasas se presentan en forma de tabletas, 1 tableta se disuelve en 2 ml de tampón fosfato 0.1M pH 7.0 (tampón fosfato sódico) y así queda a 25X y se guarda alicuotado a -20°C con una estabilidad de 3 meses. Para su uso se descongela y se diluye 25 veces.

3. Material y reactivos

MATERIAL	COMERCIAL
Filtros concentradores	Millipore Ref. UFC801096 (96 Filtros)
Zymogram Gels caseína	Invitrogen Ref. EC6405BOX
Zymogram Gels gelatina	Invitrogen Ref. EC6175BOX
Puntas largas MultiFlex tips (0,5-200µL)	Sorenson Bioscience Ref 13790

Tris-Glycine SDS Running Buffer (10x)

25 mM Tris Base

192 mM Glycine

0.1% SDS

pH 8.3

- To prepare 1000 ml of 10 X Tris-Glycine SDS Running Buffer, dissolve the following reagents to 900 ml ultrapure water:
 - Tris Base 29 g
 - Glycine 144 g
 - SDS 10 g
- Mix well and adjust the volume to 1000 ml with ultrapure water.
- Store at room temperature. The buffer is stable for 6 months when stored at room temperature.
- For electrophoresis, dilute this buffer to 1X with water (see page 11). The pH of the 1X solution is 8.3. Do not use acid or base to adjust the pH.

4. Procedimiento concentración de muestras

- Sacar las muestras del congelador de -80 °C y dejarlas en hielo
- Se añade hasta 4 ml de muestra al filtro al filtro *Amicon* (filtro seleccionado en función del volumen a trabajar y del poro del filtro. El poro debe ser entre 2-2.5 veces menor al peso molecular más pequeño que se desea recuperar en el concentrado).
- Colocar el filtro tapado en la centrífuga con rotor basculante y centrifugar a 4000 g entre 10-20 minutos a 25°C (indicaciones del fabricante).

4. Usando puntas de pipeta largas, recuperar el volumen concentrado (*aprox. 64µl de 2,1ml iniciales*) intentando no perder muestra en las paredes del filtro y colocarlo en un tubo *ependorf* en hielo. Para una óptima recuperación el fabricante recomienda retirar el concentrado inmediatamente después de la centrifugación.
5. Si se desea sustituir el tampón en el que se obtiene el concentrado, se deberá volver a centrifugar, añadiendo un volumen conocido (hasta 4 ml) del tampón correspondiente. Para diluir al máximo el resto de tampón inicial se recomienda realizar este proceso dos veces. En nuestro caso, no se realizará este paso.

5. Electroforesis

Preparación Tampones

Tris-Glycine SDS Running Buffer (10x).....	100 ml
Agua milliQ.....	900 ml
Total.....	1000 ml

Preparación muestras

Muestra.....	10 µl
Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2x).....	10 µl
Total a cargar en el gel.....	20 µl

* Pipetear evitando la formación de burbujas

Condiciones de electroforesis y procedimiento

1. Indicar qué gel es cuál (10% gelatina; 12% caseína). Colocar el gel, retirar la cinta aislante blanca, cerrar los porticotes, dejar la compuerta inferior en la posición semiabierta para que se pueda transmitir el voltaje.
2. Colocar dentro de la cubeta, con los electrodos hacia la parte central. Retirar el peine de los pocillos. Añadir a la cámara interna del gel 200 ml de tampón de electroforesis Running Buffer (llenar hasta arriba) y a la cámara externa 600 ml de este tampón (que llegue al menos hasta la línea *min*).
3. Cargar en cada gel, en el orden previamente decidido, la cantidad adecuada de marcador de peso molecular, muestras y añadir una muestra como control positivo y/o referencia (para poder comparar diferentes geles).
4. Voltaje constante, **125V**, durante **90 minutos** aproximadamente.

6. Incubación de zimogramas

Preparación de tampones

Renaturing Buffer (10x)	10 ml
Agua milliQ.....	90 ml
Total	100 ml
Developing Buffer (10x)	10 ml
Agua milliQ.....	90 ml
Total	100 ml

Para hacer un **Control negativo**: incubación en Developing Buffer + EDTA 10 mM

Para tener 100ml de tampón +10mM EDTA (372,2 g/mol; Sigma ref E5134) → pesar **372,2mg** de EDTA y disolver en 100ml de Developing Buffer, dejar en agitación unos 10 min hasta que se disuelva completamente

Procedimiento

1. Después de la electroforesis, separar los dos plásticos del gel con una espátula, separar el gel con una cuña de plástico y poner el gel en una cubeta. Incubar el gel en el *Renaturing Buffer* 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación constante y suave (240/min).
2. Decantar el tampón y añadir el *Developing Buffer* 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante y suave (240/min), para equilibrar el gel.
3. Decantar el tampón y añadir de nuevo el *Developing Buffer* 1X e incubarlo a **37°C** entre al menos 4 horas y O.N. (máxima sensibilidad) en agitación constante y suave (80/min). *Poner el agitador dentro de la estufa i tapar con parafilm para evitar la evaporación del tampón*

7. Tinción zimogramas

1. Lavar x3 veces durante 5 minutos con 100 ml de H₂O milliQ para eliminar el SDS y las sales del tampón.
2. Teñir el gel con Simply Blue Safe Staining con el volumen suficiente para cubrir el gel (20-100 ml) durante 1H a RT en agitación suave y constante.
3. Después de la incubación desechar el colorante (tirarlo) y lavar con 100 ml de H₂O durante 1 a 3 H en agitación constante y suave.
4. Para obtener una imagen más definida se recomienda un segundo lavado de 1H con 100 ml de H₂O en agitación constante y suave.

8. Obtención de imágenes y cuantificación

La imagen del gel se escaneará (en color y en blanco y negro) y se cuantificará con la ayuda de un software basado en la densitometría (Science Lab).

C. REAL-TIME PCR WITH TAQMAN® GENE EXPRESSION ASSAYS

1. Introduction

This protocol gives instructions for real-time -PCR using TaqMan Gene Expression Assays.

TaqMan Gene Expression Assays include one tube for each assay that is ordered. The tube contains:

- Two unlabeled primers (1X final concentration is 900 nM per primer; 20X stock concentration is 18 µM per primer)
- One 6-FAM™ dye-labeled, TaqMan® MGB probe (1X final concentration is 250 nM; 20X stock concentration is 5 µM)

Good practices for working with RNA and DNA:

- Wear a clean lab coat and clean gloves when preparing samples for PCR amplification. Change gloves whenever you suspect that they are contaminated.
- Maintain separate areas, dedicated equipment, and supplies for: Sample preparation and PCR setup // PCR amplification and post-PCR analysis. Never bring amplified PCR products into the PCR setup area.
- Open and close all sample tubes and reaction plates carefully. Do not splash or spray PCR samples. Keep reactions and components sealed as much as possible.
- Use aerosol-resistant pipette tips.
- Clean lab benches and equipment periodically with freshly diluted 10% chlorine bleach solution.

2. Material

Material	Company
Clean Tubes, Filter tips, Pipettes	
Nuclease-free water	
TaqMan Gene Expression Assays	Applied Biosystems
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, P.N. 4369016
Ice	
Reaction plates	Applied Biosystems, P.N. 4306737
Vortex	
Centrifuge with plate adapter	

3. Procedure

Calculate the number of reactions

Calculate the number of reactions that you need for each assay. Applied Biosystems recommends performing four replicates of each reaction, but you can do triplicates. Be sure to include on each plate:

- A TaqMan Gene Expression Assay for each cDNA sample
- Endogenous control assays
- (Optional) No template controls (NTCs) for each gene expression assay on the plate

Thaw the reagents

Thaw on ice:

- TaqMan® Gene Expression Assays (20X)
- cDNA samples

Keep TaqMan Gene Expression Assays protected from light

Prepare dilutions of the cDNA samples

Applied Biosystems recommends that you use:

- 1 to 100 ng of cDNA per 20- μ L amplification reaction (PCR)
- The same amount of cDNA in each reaction

Thaw on ice, resuspend completely by vortexing gently, then centrifuge briefly the cDNA samples

Prepare a dilution of each cDNA sample in Nuclease-free water and keep on ice

Prepare the PCR reaction mix

1. Mix the master mix reagent by gently swirling the bottle.
2. On ice, prepare one PCR reaction mix for each TaqMan Gene expression assay that will be used (include 20% excess for volume loss from pipetting).
3. Cap the tube and invert it several times to mix the reaction components
4. Centrifuge the tube briefly and keep on ice

Load the plate

1. Pipette 16 μ L of each PCR reaction mix into the corresponding wells of a 96 well-reaction plate
2. Pipette 4 μ L of each cDNA dilution into each well or nuclease-free water for non-template controls (NTC)
3. Seal the plate with the appropriate cover

4. Centrifuge the plate briefly. Refrigerate or freeze the plate until you can load it into the instrument.

Run the real-time PCR reaction

1. Turn on the computer and the 7300 real-time PCR system
2. Open the program 7300 System Software and create the plate document:

New Document > Absolute Quantification (Standard Curve) > Add detectors needed

Introduce the name of each sample

3. In the Instrument tab, set reaction volume to 20ul and check that the thermal cycling conditions are correct.

Thermal cycling conditions		
Stage	Temp (°C)	Time (mm:ss)
Hold [§]	50	2:00
Hold	95	10:00
Cycle	95	0:15
(40 Cycles)	60	1:00

4. Save the document and Press Run. The PCR will start and last 1h47min

Analyze the results

D. PREPARATION AND COATING OF POLYACRYLAMIDE GELS FOR CELL CULTURE

1. Introduction

- Polyacrylamide (PAA) gels are prepared on any glass surface. First the glass has to be activated with Silane to anchor PAA to the glass. Also, the top coverslips are treated with Repel-Silane to inhibit sticking of polyacrylamide gels to the glass surface.
- The polyacrylamide mix solution is prepared in a 15ml falcon tube (final volume: 5ml). It contains:
 - Acrylamide
 - Bis-acrylamide: acrylamide crosslinker; the ratio acrylamide/bis determines stiffness
 - H₂O: to adjust final volume
 - APS (Ammonium persulfate: initiating agent)
 - TEMED (Tetramethylethylenediamine): accelerating agent

The mix is put on the pre-treated bottom glass coverslip and covered with a top glass coverslip to flatten the gel and allow polymerization (PAA polymerization is inhibited by oxygen)

- Polymerized PAA gels are coated with extracellular matrix protein to allow cell attachment (PAA is inert for cells). This is achieved using Sulfo-SANPAH (N-Sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino) hexanoate). Once Sulfo-SANPAH on top of the gel is activated (by exposure to UV light for 10 min) it will be ready link proteins to PAA. Since Sulfo-SANPAH is toxic for cells it has to be washed well afterwards. For coating PAA gels with Collagen type I, a solution of 0,1mg/ml is added and left over night at 4°C

Storage of PAA gels: Uncoated gels can be maintained in the fridge for 7 days. Coated gels can be stored in the fridge for 2 days.

2. Material

Material	Company	Location
3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate	Sigma, # M6514	Fridge
Repel Silane	GE Healthcare; # 17-1332-01	Cupboard
Acetic Acid		Keep >20°C!!!
Absolute Ethanol		Hood cupboard
70% Ethanol		Flammables
MiliQ water		Lab
40% Acrylamide solution	Bio Rad	Lab
2% Bis-acrylamide solution	Bio Rad	Fridge
Ammonium persulfate (APS) 10%	Bio Rad; prepared fresh from powder	Fridge
TEMED	Sigma	Flammables
PBS		Lab
HEPES 0,1M	Sigma; prepared diluting HEPES 1M in miliQ water (1/10)	Fridge
Sulfo-SANPAH	Thermo Scientific, # 22589	-20°C Freezer
Collagen type I (rat tail)	Millipore; # 08-115	Fridge

3. Procedure

Bottom Glass activation

1. Prepare the Bind Silane mixture
 - 6ml Etanol 100%
 - 30ul 3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate
 - 18ul Acetic acid
 - 162ul miliQ water
2. Cover the glasses places in aseptic plated with the mixture and smear it so that it covers the whole glass. Cover the plates to prevent evaporation and leave it for 10 minutes.
3. Aspirate and wash 2 times with absolute ethanol. Let the glasses dry.

The coated petri dishes can be stored for some days before use.

Top glass coverslip treatment

1. Immerse all the coverslips in Repel Silane. Incubate 10 min. (Caution: toxic vapors)
2. Wash the coverslips with 70% Ehanol
3. Wash the coverslips with milliQ H2O
4. Allow the coverslips to dry on filter paper

Preparation of PAA mix

1. Prepare the corresponding mixture by pipetting the following components (volumes in µl) in a 15ml tube:

To prepare fresh 10% ammonium persulfate (APS) solution weigh 100mg and dissolve in 1mL of miliQ water. Alternatively, stocks can be frozen to be used at later dates

Add the components following the order in the table. Once PSA and TEMED are added, polymerization will start. Mix vortexing after adding all the components.

Note: this E nominal values have been determined experimentally, but need to be further characterized.

2. Place the desired volume of mix onto the glass and flatten the drop very carefully using a glass coverslip: 200 μ l in 33 mm diameter gels; 60 μ l in 18 mm diameter gels. Leave 1h15min. Check that the PAA left in the tube is polymerized
3. Once the gel has fully polymerized, put some PBS covering all the surface and carefully peel off the coverslip, using a scalpel and tweezers

Note: The PAA can be left with H₂O at 4°C. It is desirable to coat the gels with the collagen and proceed to cell culture during the same day.

Conjugation of collagen to the PAA gel with Sulfo-SANPAH

1. Preparation of Sulfo-SANPAH (avoid exposure to light!)

To the vial containing 50mg of Sulfo-SANPAH add 10,155 ml of miliQ water.

Make aliquots of 330 μ l and store at -20°C

2. Before activating the gel, aspirate PBS and treat the gel with HEPES 0.1M for a while to equilibrate pH (lately we were not doing this step)
3. Thaw aliquot containing 330 μ l of sulfoSANPAH in aluminium foil. Add 495 μ l of HEPES 0,1M to dilute to sulfo-SANPAH to a final concentration of 4 mM. Mix by vortexing to homogenize.
4. Avoiding direct exposure to light, add the amount of sulfo-SANPAH (depending on the gel size: 200 μ l for 33 mm diameter gels and 60 μ l for 18 mm diameter gels) to the PAA. It has to cover

Stiffness (E)	0,6 kPa	1,5kPa	5kPa	12kPa	20kPa	30kPa	40kPa
Water (μ l)	4047,5	3940	3660	3290	2620	2350	1970
40% acrylamide (μ l)	375	937,5	937,5	937,5	1500	1500	1500
2% Bis (μ l)	550	100	372.5	750	850	1125	1500
10% APS (μ l)	25	25	25	25	25	25	25
TEMED (μ l)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

all the PAA gel (use a pipet tip to spread)

5. Put under the UV lamp for 10 min. Sulfo-SANPAH looks darker after activation.
6. Remove the sulfo-SANPAH and wash twice with 0,1M HEPES, 15 min in the shaker (\approx 320 rpm) for each wash
7. Wash once with PBS 1x, 15 min in the shaker (\approx 320 rpm).

The gel must lose its red color from Sulfo-SANPAH.

8. Place the gels inside culture plates using tweezers and sterilize the gels by exposing to hood UV light for 20 minutes
9. Prepare the collagen type I solution at 0.1 mg/ml in PBS, and place it over the gel.
10. Allow to react over night at 4°C

Plating cells

1. Just before cell culture, wash extensively with PBS (2 times).

Incubate for some time (2h approximately) with the cell medium, to avoid toxicity of the sulfo-SANPAH to the cells and allow equilibrium

2. Plate the cells on the gels

Apèndix II: Publicacions i Comunicacions

PUBLICACIONS

- **Giménez A**, Fernández F, Gabasa M, Lugo R, Lakins J, Galgoczy R, Xaubet A, Weaver V, Perera A, Alcaraz J. Analyzing the mechanical transcriptome of activated fibroblasts reveals novel molecular target candidates in lung fibrosis. 2015 (en preparació).
- **Giménez A**, Vieyra J, Alcaraz J. Elastic properties of hydrogels used in mecanobiology experiments of soft tissues. *Microscopy Research and Technique*. 2015 (en revisió).
- Puig M, Lugo R, Gabasa M, **Giménez A**, Velásquez A, Galgoczy R, Ramírez J, Gómez-Caro A, Busnadiego Ó, Rodríguez-Pascual F, Gascón P, Reguart N, Alcaraz J. Matrix Stiffening and β 1 Integrin Drive Subtype-Specific Fibroblast Accumulation in Lung Cancer. *Mol Cancer Res*. 13(1):161-73, 2015. [IF: 4.5, 1st quartile Q1, 0 citations].
- Galgoczy R, Pastor I, Colom A, **Giménez A**, Mas F, Alcaraz J. A spectrophotometer-based diffusivity assay reveals that diffusion hindrance of small molecules in extracellular matrix gels used in 3D cultures is dominated by viscous effects. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 1;120:200-7, 2014. [IF: 3.6, 2nd quartile Q2, 1 citations]
- Acerbi I, Luque T, **Giménez A**, Puig M, Reguart N, et al. (2012) Integrin-Specific Mechanoresponses to Compression and Extension Probed by Cylindrical Flat-Ended AFM Tips in Lung Cells. *PLoS ONE* 7(2): e32261. doi:10.1371/journal.pone.0032261. [IF:4.41, Q1, 5 citations].

COMUNICACIONS A CONGRESSOS

- **Giménez A**, Fernández F, Galgoczy R, Xaubet A, Navajas D, Perera A, Alcaraz J. Uncoupling the pro-fibrotic effects of TGF- β 1 versus tissue hardening in lung fibroblasts. American Thoracic Society International Conference. Philadelphia, 17-22 maig 2013.
- Puig M, **Giménez A**, Ramírez J, Reguart N i Alcaraz J. Quantifying hallmarks of the stiff reactive stroma in lung cancer patients by image analysis of histological sections. 1st Congress of the Spanish Network of Advanced Optical Microscopy (REMOA, Red Española de Microscopía Óptica Avanzada), Barcelona, 20-22 novembre 2012.
- Puig M, Lugo R, **Giménez A**, Galgoczy R, Genís S, Ramírez J, Gómez-Caro A, Gascón P, Alcaraz J, Reguart N. Abnormal abundance of senescent fibroblasts in the tumor stroma of non-small cell lung cancer patients. American Association for Cancer Research (AACR) anual meeting. Chicago, 1-4 abril 2012.
- Puig M, **Giménez A**, Lugo R, Galgoczy R, Gascón P, Reguart N, Navajas D, Alcaraz J. Stromagenesis in non-small cell lung cancer. 4as Jornadas de Formación del CIBERES. Mallorca, 27-28 octubre 2011.

- Galgoczy R, Colom A, Almendros I, **Giménez A**, Puig M, Navajas D, Farré D, Alcaraz J. Extracellular matrix based 3D cultures as tissue surrogates in terms of O2 transport. 4th IBEC Symposium on Bioengineering and nanomedicine. Barcelona, octubre 2011.
- **Giménez A**, Puig M, Galgoczy R, Xaubet A, Reguart N, Alcaraz J. Role of abnormal extracellular hardening in collagen turnover in lung fibrosis. XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Barcelona, setembre 2011.
- Puig M, **Giménez A**, Gómez-Caro A, Gascón P, Alcaraz J, Reguart N. Caveolin-1-independent fibroblast activation in lung squamous cell carcinoma Biannual World Conference on Lung Cancer. Amsterdam, juliol 2011.
- Galgoczy R, Puig M, Lugo R, **Giménez A**, Gabasa M, Xaubet A, Navajas D, Reguart N, Alcaraz J. Epithelial contribution to the myofibroblastic phenotype in non small cell lung cancer via epithelial to mesenchymal transformation. Biannual World Conference on Lung Cancer. Amsterdam, juliol 2011.
- Acerbi I, Luque T, **Giménez A**, Puig M, Farré R, Navajas D, Alcaraz J. Integrin-specific dynamic mechanoresponse to compression and tension probed by nanocylindrical tips. Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. Philadelphia, desembre 2010.
- Pereda J, Gabasa , Acerbi I, **Giménez A**, Puig M, Reguart N, Xaubet A, Navajas D, Molina-Molina M, Alcaraz J. Cellular basis of abnormal tissue hardening in lung fibrosis examined with atomic force microscopy. American Thoracic Society International Conference. New Orleans, 14-19 maig 2010.
- **Giménez A**, Gabasa M, Fuster G, Xaubet X, Molina-Molina M, Navajas D, Alcaraz J. Abnormal collagen turnover in Idiopathic pulmonary fibrosis studied with 3D culture models. II Jornadas de Formación del CIBERES. Mallorca, octubre 2009.

ESTADES A LABORATORIS INTERNACIONALS

- Estada al laboratori de la Dra. Valerie Weaver, al Center for Bioengineering and Tissue Regeneration de la University of California San Francisco. Maig-Juliol de 2013. Aprenentatge de eines per a la inducció i la inhibició de l'expressió gènica mitjançant la clonació dels gens i els shRNA d'interès i la seva transducció en cèl·lules mitjançant lentivirus.