



UNIVERSITAT DE BARCELONA



INSTITUT  
D'INVESTIGACIÓ  
BIOMÈDICA  
DE BELLVITGE

**TIME COURSE OF BIOCHEMICAL, BIOMECHANICAL AND  
HISTOLOGICAL CHANGES FOR THE ASSESSMENT OF INFLAMMATION  
AND REMODELLING IN A BLEOMYCIN-INDUCED MURINE MODEL OF  
LUNG INJURY**

DISSERTATION

submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of  
DOCTOR OF PHILOSOPHY

by

**Mariona Pinart Gilberga**

Supervisors: Dr. Pablo V. Romero Colomer (Bellvitge Hospital)

Dr. Patricia Rieken Macedo Rocco (Federal University of Rio de Janeiro)

Tutor: Dr. Daniel Navajas

“Biopathology in medicine” doctorate program (2004-2006)

## RESUM EN CATALÀ DE LA TESI DOCTORAL

### EVOLUCIÓ DELS PROCESSOS D'INFLAMACIÓ I REMODELACIÓ A TRAVÉS DELS CANVIS BIOQUÍMICS, BIOMECÀNICS I HISTOLÒGICS EN UN MODEL MURÍ DE LESIÓ PULMONAR INDUÏDA PER BLEOMICINA

Memòria presentada per  
**Mariona Pinart Gilberga**  
per a optar al grau de Doctor

Treball dirigit pel Dr. Pablo Vicente Romero Colomer  
i Patricia Rieken Macedo Rocco,  
en el Laboratori de Pneumologia Experimental  
del Campus de Bellvitge,  
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

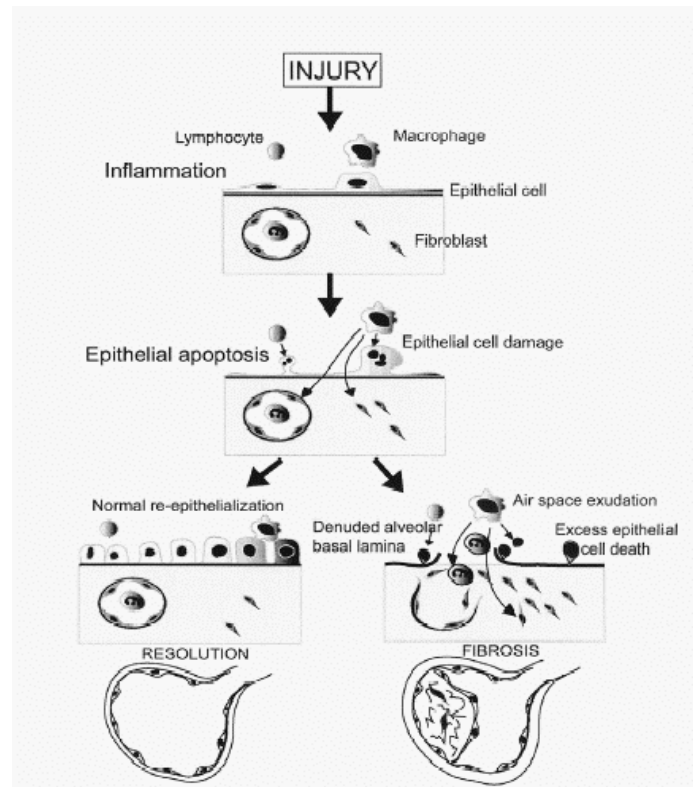
## I. 1. INTRODUCCIÓ

Les malalties pulmonars intersticials difuses (MPID), constitueixen un grup variat de trastorns inflamatoris difusos de les vies aèries inferiors causada per la inflamació, la fibrosi (cicatrització) de les parets alveolars i engruiximent de l'espai intersticial. Com que moltes d'aquestes MPID donen lloc a la formació de fibrosi, també se les anomena amb el terme de fibrosi pulmonar (FP). No responen al tractament i evolucionen cap a la pèrdua progressiva de les unitats alveolo-capil·lars funcionals, causant insuficiència respiratòria, motiu de l'èxitus dels pacients.

Es distingeixen tres grups de MPID (1). El primer grup (pneumònies intersticials idiopàtiques) està constituït per entitats clinicopatològiques d'origen desconegut, la definició histològica de les quals ha suscitat una gran atenció en aquests últims anys. En el segon grup hi figuren les MPID de causa coneguda o associades a d'altres entitats clíniques ben definides. En aquest grup s'hi inclouen les manifestacions pulmonars de les malalties del col·lagen, que amb freqüència presenten una histologia indistingible de les pneumònies intersticials idiopàtiques corresponents al primer grup. A més a més en aquest segon grup també s'inclouen les MPID ocasionades per fàrmacs, pols orgànica (alveolitis al·lèrgiques extrínseques), pols inorgànica (pneumoconiosi) i les associades a malalties hereditàries. El tercer grup està format per un conjunt d'entitats d'origen idiopàtic amb una clínica i una histologia que a diferència de les del primer grup, estan ben definides.

Tot i que se sap que aquestes malalties estan caracteritzades per una remodel·lació anòmala a nivell de l'interstici, la fisiopatologia de la malaltia així com els mecanismes bioquímics que es desencadenen són poc coneguts (2;3). És per això que els investigadors uneixen els seus esforços per tal d'obtenir un model animal capaç de reproduir les característiques bàsiques de la FP de la manera més fidedigna possible, i així poder desenvolupar teràpies efectives (4;5). En aquest sentit, molts agents han demostrat una capacitat inhibidora de la FP induïda per bleomicina en ratolins i altres organismes vius. Tot i això, dissortadament cap d'aquests compostos han presentat efectes antifibròtics quan s'han testat en humans. Aquests efectes negatius poden ser atribuïts a l'elecció del model animal. A més a més, Moeller i col. (6) entenen que el punt més crític rau en fer una distinció entre els fàrmacs que desenvolupen la seva acció en les respostes inflamatòria i fibrogènica primerenca dels que interactuen

prevenint la progressió de la fibrosi en una fase més tardana i quan aquesta ja ha estat constituïda.



*Figura 1.* Cascada d'esdeveniments en el pulmó després de produir-se una lesió evolucionant cap a la reparació (esquerra) o la fibrosi (dreta) (7).

La lesió pulmonar induïda per fàrmacs com la bleomicina, és heterogènia i ràpida en el seu inici, amb una fase d'alveolitis inicial caracteritzada per la presència d'edema intersticial i d'infiltració de cèl.lules inflammatòries com ara neutròfils, macròfags i limfòcits (8), que alhora conduiran a una proliferació dels fibroblasts. Després hi ha una segona fase, més fibròtica que es caracteritza per la deposició de fibres de col·lagen i d'altres components de la matriu extracel.lular (MEC) que resultarà en una distorsió de l'arquitectura pulmonar (9;10). Es creu que aquesta última fase té influència sobre les propietats biomecàniques del parènquima pulmonar. Aquestes fases, una més primerenca i l'altra més tardana, malgrat que apareixen de forma seqüencial, no presenten un relació constant en el temps, pel que fa al règim de la/es dosi/s administrada/es (11).

Els models murins de lesió pulmonar induïda per bleomicina han estat extensament emprats per a l'avaluació de la relació que hi ha entre els canvis estructurals i els canvis biomecànics que es produeixen en el pulmó durant la fase més avançada de la

malaltia o fase fibròtica (**10;12**). La majoria d'estudis que utilitzen aquest model s'han centrat en les 2-3 primers setmanes després de la inducció per bleomicina, és a dir, quan la fase inflamatòria és encara rellevant (**13;14;15**). La resposta inflamatòria dóna lloc a una cascada d'esdeveniments (Fig.1) que acaba en un deteriorament progressiu de la composició de la matriu extracel·lular i de les propietats mecàniques del teixit pulmonar. Dosis múltiples de bleomicina causen un procés inflamatori que dóna lloc a una fibrosi progressiva amb un increment de la deposició de col·lagen i de la proliferació de l'activitat fibroblàstica (**16**). Fins ara, no hem trobat cap estudi que hagi analitzat l'impacte de la lesió pulmonar induïda amb dosis repetides de bleomicina sobre els canvis biomecànics que es produeixen en el teixit del parènquima pulmonar.

Les tires de parènquima pulmonar s'han utilitzat com a model per a l'estudi del comportament mecànic del teixit pulmonar (**17;18**). L'avantatge de realitzar mesures *in vitro* és que es poden excloure les contribucions del comportament mecànic relacionats amb el surfactant, l'edema alveolar i l'heterogeneïtat de la ventilació (**17**). El cert és que els canvis que es produeixen en les propietats mecàniques del teixit pulmonar en un model de bleomicina estan força ben documentats. Dolhnikoff i col. (**10**) van demostrar que les modificacions estructurals de la matriu extracel·lular induïdes pels efectes de la bleomicina, causaven modificacions en la mecànica oscil·latòria del teixit pulmonar tant *in vivo* com *in vitro*. Ebihara i col. (**19**) utilitzant el mateix model de bleomicina van observar una correlació positiva entre la fracció de volum de biglicans i la resistència i l'elastància de les tires de parènquima pulmonar objectes d'estudi. Però el que no està clar és el paper que juguen els components de la matriu extracel·lular durant la resposta inflamatòria i la fase fibròtica (**20**).

## **I.2. OBJECTIUS GENERALS**

Com que creiem que els paràmetres biomecànics poden ser de gran utilitat en el seguiment de les estratègies terapèutiques així com també del coneixement general de la història natural de les MPID, volem saber quina és la influència de la resposta inflamatòria en les diferents fases evolutives de la fibrosi pulmonar sobre la biomecànica del parènquima. Per això utilitzem un model murí de lesió pulmonar de dues setmanes o d'un mes de durada, induïda per dosi única o dosis repetides de bleomicina respectivament. En aquesta tesi vàrem treballar sobre dues hipòtesis:

- i. Els canvis biomecànics en teixit pulmonar difereixen depenent de si ens trobem en el procés de resposta inflamatòria o de remodel·lació després d'una lesió induïda per bleomicina.
- ii. Després d'una lesió induïda per bleomicina, la remodel·lació pulmonar que condueix a un procés de reparació comportarà canvis estructurals i/o biomecànics diferents que els canvis que es produeixen quan ens trobem en un procés de remodel·lació disregulada que finalitza en fibrosi i no en reparació.

A partir d'aquí, els objectius que es varen plantejar en aquesta tesi són els següents:

1. Caracteritzar els canvis biomecànics a nivell del parènquima pulmonar que es produeixen en un model en rata induït per una dosi única de bleomicina.
2. Determinar si els canvis que s'observen en les propietats biomecàniques del parènquima pulmonar durant la fase primerenca, estan relacionats amb els marcadors d'inflamació pulmonar i/o de remodel·lació.
3. Caracteritzar els canvis biomecànics a nivell del parènquima pulmonar que es produeixen en un model en rata induït per dosis repetides de bleomicina.
4. Establir comparacions entre la mecànica pulmonar *in vitro* i els paràmetres d'inflamació i de fibrosi, en les models de rata induïts per una dosi única o dosis repetides de bleomicina.

### **I.3. MÈTODES**

En el primer treball, varem utilitzar tires de parènquima pulmonar per a l'estudi biomecànic (elastància, resistència i histeresivitat) els dies 3, 7 i 15 després d'una instil·lació única sub-letal de bleomicina. Es va analitzar també l'impacte de la inflamació pulmonar (mieloperoxidasa ( $MPO_L$ ), índex d'inflamació pulmonar (LI) i el contingut d'aigua pulmonar ( $W_L$ )) i de la remodel·lació pulmonar (hidroxiprolina ( $HP_L$ ) i fibres elàstiques) en els mateixos dies en que es va fer l'estudi mecànic.

En el segon treball, varem utilitzar tires de parènquima pulmonar per a fer l'estudi mecànic el dia 28 després d'una instil·lació única sub-letal o després de tres dosis de bleomicina cada dues setmanes. Es va analitzar l'impacte de la inflamació pulmonar ( $MPO_L$  i LI) i de la remodel·lació pulmonar (fibres de col·lagen) en els mateixos dies en que es va fer l'estudi mecànic.

*Model animal*

En ambdós estudis es varen emprar rates de la soca Sprague-Dawley lliures de patògens específics (225-300 g). Vam considerar el dia 0, el dia en que se'ls va administrar una dosi única intratraqueal de bleomicina (2.5U/kg en 0.5ml) o 0.5ml de sol.lució salina estèril (0.9% NaCl). En el primer estudi es varen sacrificar els dies 3, 7, i 15 posteriors a la instil.lació. En el segon estudi es varen estudiar el dia 28 (grup SD). En aquest últim estudi, un altre grup de rates van rebre dosis similars de bleomicina (grup RD) o de salí (grup control), un cop cada dues setmanes (un total de 3 instil.lacions) i varen ser sacrificades 28 dies després de l'última instil.lació. Donat que les dades obtingudes dels paràmetres mecànics i histològics dels controls sacrificats els dies 3, 7, i 15 eren similars, es va fer un únic grup control. En experiments previs corresponents a un estudi pilot, (dades no publicades), els paràmetres mecànics del parenquima pulmonar i els paràmetres histològics estudiats eren estadísticament no significatius amb un error  $\alpha = 0.05\%$  entre els dies 3, 7, i 15 en rates del grup control. Tenint en compte que no hi havien diferències significatives a nivell mecànic i histològic entre les rates del grup control de dosi única i de dosis repetides, també es va unificar el grup control en un de sol.

Per a estudiar les rates, es varen anestesiar amb una injecció intraperitoneal de ketamina (75 mg.kg<sup>-1</sup>) i diazepam (5 mg.kg<sup>-1</sup>). Un cop anestesiades, se'ls va administrar heparina (1000IU) via intravenosa i 5 minuts més tard els animals van ser exanguinats un cop seccionades l'aorta abdominal i la vena cava. Els pulmons van ser extrets *en bloc*, i submergits en una sol.lució modificada de Krebs–Henseleith (K–H) [mM: 118.4 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.6 MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, and 11.1 glucose] a pH = 7.40 a temperatura de 6° C (21).

*A) Estudi biomecànic*

Immediatament, es varen tallar tires subpleurals (15mm×3mm×3mm) del pulmó dret i es varen suspendre verticalment en un bany d'òrgans K-H mantingut a 37°C, i amb bombolleig continuat de carbògen (95% O<sub>2</sub>–5% CO<sub>2</sub>) tal i com s'ha descrit anteriorment (22).

Molt breument, un extrem de la tira es va unir a un transductor de força (FT03, Grass-Telefactor, RI, USA), i l'altre es va unir a un braç metàl.lic connectat a un generador de senyal (AT-MIO-16-E-10, National Instruments, Austin, TX, USA).

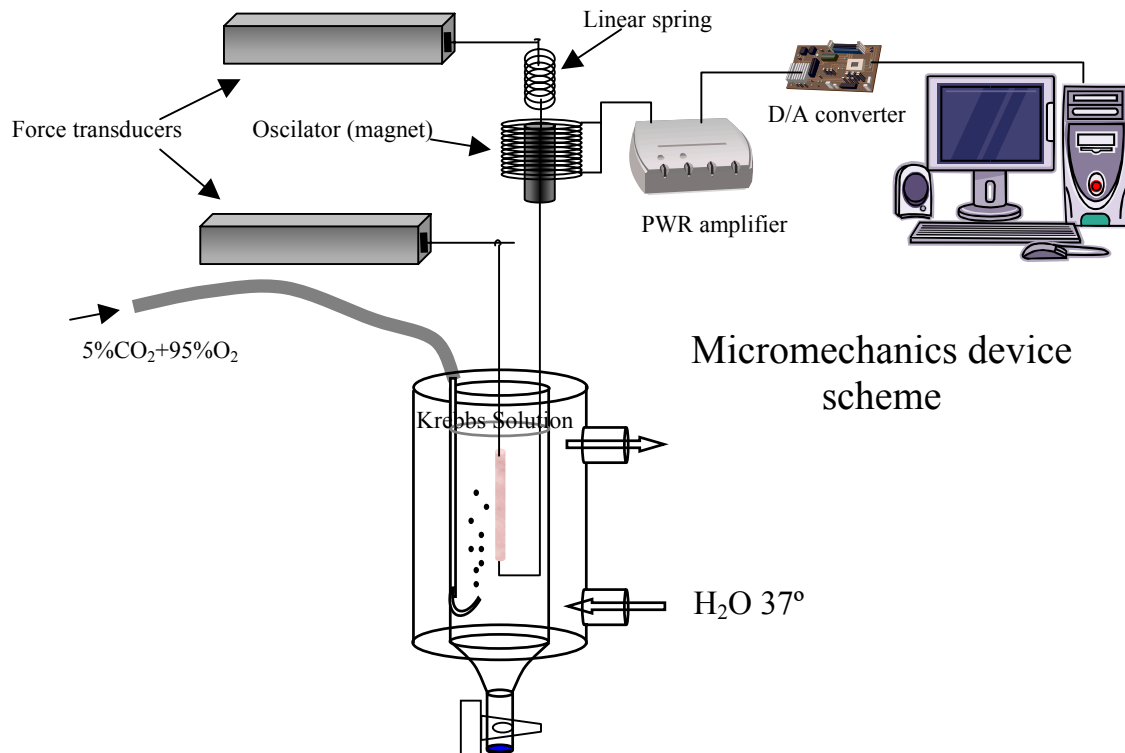


Figura 2. Bany d'òrgans.

Un costat del braç metàl·lic estava unit a un segon transductor de força (LETICA TRI-110, Scientific Instruments, Barcelona, Spain) mitjançant una molla de plata de mòdul de Young conegut, permetent doncs que el desplaçament de la tira pogués ser mesurat (Fig. 2).

Un cop precondicionades les tires, el desplaçament posat a 0, l'amplitud ajustada a un 5% de la longitud basal i oscil·lant a una freqüència de  $(f) = 1$  Hz durant 30 min, es van establir a un estrès operatiu  $(\sigma)$  de 10 hPa. Posteriorment, es varen realitzar tres anàlisis d'oscil·lacions forçades de multifreqüència de 20 segons de durada cadascún. Aquestes oscil·lacions pseudoaleatòries estaven compostes per 5 sinusoides de mateixa força d'amplitud i de freqüències de  $(f)$  0.2, 0.5, 1.1, 1.9, i 3.1 Hz. Tant els senyals de força com de desplaçament van ser pre-amplificats i filtrats a 30 Hz i mostrejats a una freqüència de 150 Hz. L'anàlisi de dades es va realitzar segons el descrit per Romero i col. (22). L'anàlisi i l'estimació dels paràmetres es va fer utilitzant un software específic elaborat per LabVIEW 5.1 en el primer estudi, i LabVIEW 7.0 en el segon (National Instruments Co., Austin, TX, USA).



En ambdós estudis es va utilitzar el model de fase constant, encara que en el primer estudi es va seguir el model de fase constant proposat Romero i col. (22) i en l'estudi 2 el proposat per Hantos i col. (23).

**Estudi 1:** La relació tensió-desplaçament (stress-strain) està caracteritzada pel complex de Young o mòdul elàstic  $\Psi(\omega)$  de la següent manera:

$$\Psi_{\omega} = E_{\omega} + j \cdot \omega \cdot R_{ti_{\omega}} = E_0 \cdot \omega^{\beta} + j \cdot [R_v \cdot \omega + R_0 \cdot \omega^{\beta}]$$

on  $E_{\omega}$  correspon a l'elastància que és la part real del complex de Young i  $j \cdot \omega \cdot R_{ti_{\omega}}$  n'és la part imaginària que correspon a la resistència (composant resistiva).

$\alpha + \beta = 1$  (model de fase constant)

$$E = E_0 \cdot \omega^{\beta} = E_0 \cdot \omega^{(1-\alpha)} = \frac{(E_0 \cdot \omega)}{\omega^{\alpha}} \quad (\text{part real})$$

$$R = R_v \cdot \omega + R_0 \cdot \omega^{\beta} = R_v \cdot \omega + R_0 \cdot \omega^{-\alpha} \quad (\text{part imaginària})$$

L'equació per a calcular la histeresivitat a  $\omega=1$  ( $\eta_0$ ) és la següent:

$$\eta_0 = \frac{R_0}{E_0}$$

**Estudi 2:** L'impedància del teixit pulmonar ( $Z_{ti}$ ), una magnitud que relaciona la tensió a la velocitat de canvi en el desplaçament es va determinar segons el model de fase constant descrit per primera vegada per Hantos i col. (23). Vam emprar la següent equació per obtenir la resistència tissular newtoniana o freqüència-independent ( $R_v$ ):

$$Z = R_v + \left[ \frac{(G - jH)}{\omega^{\alpha}} \right]$$

on  $R_v$  és fluxe-independent o resistència newtoniana del teixit,  $G$  és l'esmoreïment tissular,  $H$  és l'elastància,  $j$  és la unitat imaginària, i  $\alpha = (2 \pi f) \cdot \tan^{-1}(H/G)$ . Després de calcular les parts real i imaginària de la impedància, el model es va resoldre de la següent manera:

$$Z_{real} = R_v + G \cdot \omega^{-\alpha}$$

$$Z_{im} = H \cdot \omega^{-\alpha}$$

el valor de  $R_v$  es va obtenir mitjançant una regressió lineal recursiva per tal d'obtenir el valor que complia el paradigma de fase constant ( $\alpha_{real} = \alpha_{im}$ ). D'acord amb Ito i col. (24), vàrem emprar la freqüència angular normalitzada ( $\omega_n = \omega/\omega_0$ ), on  $\omega_0 = 1$  rad/s. Això va permetre l'expressió de  $G$  i  $H$  en unitats d' "elastància" (hPa). L'equació que es va fer servir per a calcular la histeresivitat ( $\eta_0$ ) a  $\omega=1$  és la següent:

$$\eta_0 = \frac{G}{H}$$

Ambdós models estan relacionats de la següent manera:

$$Z_{real} \cdot \omega = \Psi_{im}$$

$$\frac{\Psi_{real}}{\omega} = Z_{im}$$

$$Z_{real} = \frac{\Psi_{im}}{\omega} = \frac{R_v \cdot \omega + R_0 \cdot \omega^\beta}{\omega} = R_v + R_0 \cdot \omega^{-\alpha} = \frac{R_v + G}{\omega^\alpha} \quad G = R_0 \cdot \omega_0 = R_0 \cdot 1 = R_0$$

$$\Psi_{real} = Z_{im} \cdot \omega = H \cdot \omega^{-\alpha} \cdot \omega = H \cdot \omega^{(1-\alpha)} = \frac{H \cdot \omega}{\omega^\alpha} = \frac{E_0 \cdot \omega}{\omega^\alpha} \quad E_0 = H$$

### B) Estudis bioquímics

- El contingut d'aigua pulmonar ( $W_L$ ) es va obtenir a partir del pes humit del pulmó (LW) i de la relació entre el pes sec i pes humit del pulmó (D/W) mesurats després de l'excisió dels teixits no pulmonars seguint l'equació de Flemmer i col. (25).
- L'index pulmonar (LI), un marcador de dany pulmonar, es va determinar segons l'equació de Moore i col. (26).
- La mieloperoxidasa pulmonar ( $MPO_L$ ) es va mesurar fotomètricament utilitzant el 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina com a substrat (27) però amb algunes modificacions (28).

- La hidroxiprolina pulmonar ( $HP_L$ ), una aminoàcid del col·lagen i per tant un marcador de la fibrogènesi, va ser determinat per espectrofotometria (29). Les mostres del pulmó dret es van homogeneitzar i hidrolitzar en 6N HCl durant 24 h a 60°C. L'hidrolitzat es va neutralitzar amb 6N NaOH. Després es va afegir 1 ml de Cloramina-T, 1 ml d'àcid perclòric i 1 ml de dimetilaminobezaldehyd (reactiu d' Ehrlich) en al·lotes de 2ml. Les mostres es van llegir per absorbància a 561 nm.

### C) Estudi histològic i morfomètric

En el primer estudi, immediatament després de la realització dels estudis biomecànics, les mostres es varen congelar amb nitrogen líquid i després es van fixar en solució de Carnoy (30). Les mostres fixades es van incloure en un bloc de parafina i es van tallar amb un gruix de 4  $\mu$ m. Es van tenyir amb el mètode de Weigert (resorcina-fucsina) modificat amb oxidació per a la quantificació de les fibres elàstiques (31).

En el segon estudi es varen fixar primer amb 4% paraformaldehid en PBS durant 24 h, i després es van deshidratar amb una sèrie d'etanols. Es van incloure en un bloc de parafina i es van tallar amb un gruix de 4  $\mu$ m. Posteriorment, es varen tenyir amb hematoxilina-eosina per a estudis histològics i amb Masson tricròmic per a la quantificació de fibres de col·lagen.

## I.4. RESULTATS

En el primer estudi, les fibres elàstiques, la  $HP_L$  i la  $MPO_L$  van augmentar significativament els dies 7 i 15, i l'aigua i l'índex pulmonar van augmentar durant tot l'experiment (Taula 1). En el segon estudi les fibres de col·lagen van augmentar significativament el dia 28 tant en el grup de dosi única (SD) com en el de dosis repetides (RD), però en canvi l'activitat de la  $MPO_L$  va estar a nivells basals en el grup SD i augmentada significativament en el grup RD (Fig.3). En el primer estudi la  $R_0$  va augmentar significativament el dia 15 mentre que la  $\eta_0$  va augmentar significativament durant tot l'experiment. L'elastància i la  $\beta$  van romandre invariables en el temps. En canvi en el segon estudi, el mòdul elàstic (H) i l'esmoreïment tissular (G) van augmentar de manera significativa només en les rates del grup RD. Això vol dir que en el grup SD l'augment de deposició de col·lagen i l'engruiximent del septum alveolar no van ser suficients com per induir canvis en la mecànica tissular.

Quant a les correlacions es va trobar que la  $R_0$  i  $\eta_0$  estaven correlacionades positivament amb la  $MPO_L$ , fibres elàstiques,  $W_L$  i LI. A més a més la  $\eta_0$  estava correlacionada positivament amb el gruix de la paret alveolar (Taula 2). En el segon estudi, vam trobar correlacions entre G i  $MPO_L$  ( $\rho=0.571$ ,  $P=0.021$ ) i LI ( $\rho=0.759$ ,  $P=0.001$ ) en les rates tractades amb bleomicina dels grups SD i RD (Fig. 4). Es va trobar correlacions entre la quantitat de col·lagen i H ( $\rho=0.534$ ,  $P=0.023$ ) però no amb G ( $\rho=0.244$ ,  $P>0.05$ ).

Taula 1. Dades bioquímiques i morfomètriques dels grups control i de bleomicina. Anàlisi descriptiu i ANOVA de les dades bioquímiques, morfomètriques, index d'inflamació (LI) d'animals controls (CTRL) i bleomicina (BLM) els dies 3, 7, i 15.

		CTRL	BLM3	BLM7	BLM15	Kruskal-Wallis $\chi^2$	(P)
Elast ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ )	(†)	0.38 ± 0.08	0.41 ± 0.15	0.56 ± 0.17	1.00 ± 0.54 <sup>§</sup>	20.4	<0.001
HP <sub>L</sub> (mg/g)	(†)	3.29 ± 0.70	3.00 ± 0.50	4.77 ± 1.64 <sup>*</sup>	5.30 ± 2.19 <sup>*</sup>	9.25	0.026
MPO <sub>L</sub> (U/g)	(†)	235 ± 133	351 ± 114	488 ± 245 <sup>§</sup>	511 ± 213 <sup>§</sup>	11.3	0.01
		CTRL	BLM3	BLM7	BLM15	ANOVA F	(P)
W <sub>L</sub> (g)	(‡)	1.13 ± 0.06	1.63 ± 0.21 <sup>§</sup>	1.91 ± 0.25 <sup>§</sup>	1.98 ± 0.25 <sup>§</sup>	33.58	<0.001
LI	(‡)	1.03 ± 0.07	1.72 ± 0.31 <sup>§</sup>	1.85 ± 0.29 <sup>§</sup>	1.92 ± 0.41 <sup>§</sup>	18.92	<0.001

Els valors estan expressats com a mitjana ± DE. Test de comparació de grups no paramètric († Kruskal Wallis. Post-hoc: test U de Mann-Witney) o paramètric (‡ ANOVA. Post-hoc: test de Bonferroni). Significancia BLM versus Control: \*  $P<0.05$ ; § $P<0.01$ . Elast: Quantitat de fibres elàstiques en el septum alveolar; HP<sub>L</sub>: contingut total d'hidroxi prolina en el pulmó, MPO<sub>L</sub>: contingut de mieloperoxidasa del pulmó. W<sub>L</sub>: aigua pulmonar. LI: índex pulmonar.

Taula 2. Correlacions entre la mecànica tissular i les dades bioquímiques i morfomètriques obtingudes pel test de correlació de Spearman.

	MPO <sub>L</sub>	Elast	W <sub>L</sub>	LI	PA
R <sub>0</sub>	0.49 <sup>†</sup>	0.34 <sup>*</sup>	0.62 <sup>††</sup>	0.61 <sup>††</sup>	0.06 (n.s.)
$\eta_0$	0.41 <sup>*</sup>	0.71 <sup>††</sup>	0.68 <sup>††</sup>	0.51 <sup>†</sup>	0.36 <sup>*</sup>

Es mostra la Rho de Spearman i el nivell de significació (\*  $P<0.05$ , †  $P<0.01$ , i ††  $P<0.001$ ). n.s.: no significatiu. R<sub>0</sub>: resistència a  $\omega=1 \text{ rad}^{-1}$ .  $\eta_0$ : histeresivitat a  $\omega=1 \text{ rad}^{-1}$ . MPO<sub>L</sub>: contingut de mieloperoxidasa del pulmó. Elast: quantitat de fibres elàstiques en el septum alveolar. W<sub>L</sub>: aigua pulmonar. LI: índex pulmonar. PA: Gruix de la paret alveolar.

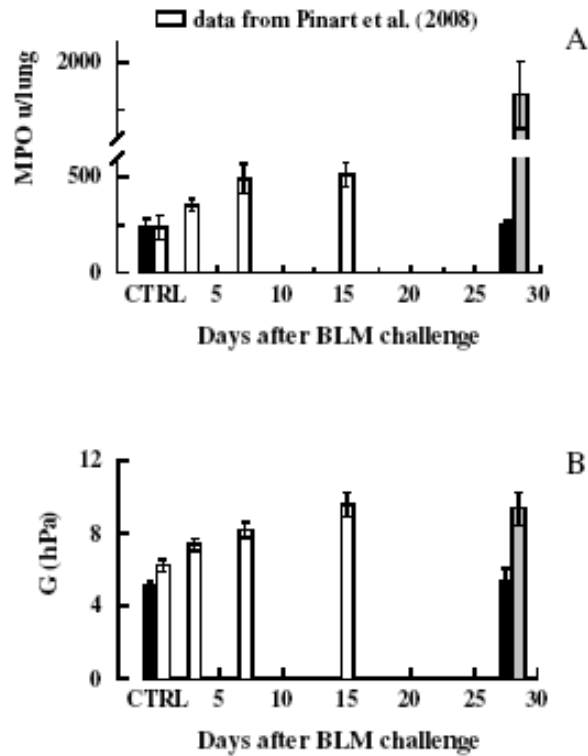


Figura 3. Les barres blanques representen les dades del primer estudi els dies 3, 7, i 15. Les barres fosques representen els grups sacrificats el dia 28 després d'una única dosi o de varies dosis de bleomicina. El valors de MPO (U/lung) (Gràfica A) i de G (hPa) (Gràfica B) van ser obtinguts en els grups controls i els de bleomicina el dies 3, 7, 15 i 28 dies (SD: negre i RD: gris).

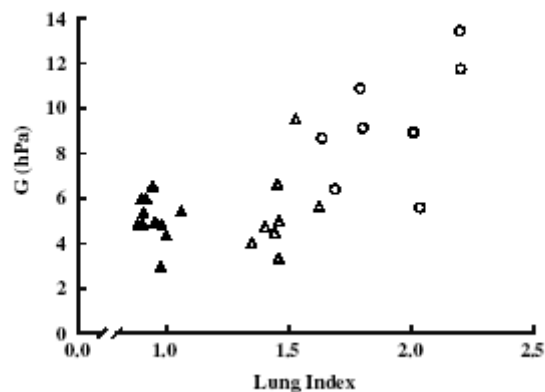


Figura 4. Gràfica de correlació G (hPa) versus LI (▲ CTRL; △ SD; ○ RD)  $\rho=0.759$  ( $P<0.001$ ).

## I.5. DISCUSSIÓ

### Comportament biomecànic en rates instil·lades amb bleomicina per via intratraqueal; model de dues setmanes

Les troballes més significatives d'aquest primer estudi suggereixen que aquest model proporciona noves evidències pel que fa a la comprensió de la fisiopatologia de la lesió pulmonar induïda per bleomicina i la relació entre els canvis inflamatoris i la mecànica del teixit pulmonar. Els paràmetres dissipatius del teixit pulmonar van veure's modificats després de la lesió induïda per bleomicina: tant  $R_0$  com  $\eta_0$  van estar correlacionades amb la  $MPO_L$ ,  $W_L$  i LI. No vàrem trobar correlacions significatives entre  $HP_L$  i els paràmetres mecànics, però sí de l'elastina amb  $\eta_0$  i el gruix de la paret alveolar.

Els nostres resultats sobre l'increment de la  $MPO_L$  i de la  $HP_L$  concorden amb el resultat d'altres autors que van treballar amb rates (**12;32;33**), hámsters (**34**) i ratolins (**35**). L'increment de la  $HP_L$  es va relacionar amb la fibrosi multifocal i l'increment de la  $MPO_L$  amb l'acumulació de cèl·lules inflamatòries mononuclears i granulòcits. Per a molts autors la lesió produïda per la bleomicina es pot dividir en dues etapes: la primera etapa és bàsicament inflamatòria i arriba al seu màxim una setmana després de produir-se la lesió, i solapant-se amb aquesta etapa, es produeix la fibrosi entre la segona i tercera setmana post instil·lació (**36;37;38**) que està caracteritzada per una remodelació pulmonar que comença amb fibrinòlisi i acaba amb neofibrinogènesi (**36**). En el nostre estudi, l'evolució del a  $HP_L$  concorda amb la seqüència descrita de la remodelació pulmonar.

No se sap encara quins són els mecanismes que governen les propietats viscoelàstiques del teixit connectiu intraparenquimatós, per això molts autors hipotetitzen sobre l'origen de la dissipació en el teixit connectiu, que podria succeir a nivell micro-estructural, per fenòmens de contacte de fricció (coulomb) creant una tensió que suportarien les fibres del teixit connectiu (**39**), o per la interacció amb els proteoglicans de la substància fonamental deguda al contacte directe fibra-fibra a nivell molecular (**40**). Si la fibrosi fos un mecanisme rellevant dels canvis de pressió-volum, esperaríem una correlació significativa entre la HP i el mòdul d'elastància (**41**) que no hem trobat. Però el fet de que no s'hagi trobat una correlació entre la HP i els paràmetres biomecànics no vol dir que la fibrinogènesi sigui absent en aquest model,

sinó que la quantitat de col·lagen no és encara suficient o prou rellevant per tenir un impacte significatiu sobre la mecànica del pulmó (42). L'elastogènesi sembla que afecta la relació entre el procés elàstic i dissipatiu en el teixit. Tot i que l'elastogènesi i la síntesi de proteoglicans són processos involucrats en la remodelació pulmonar després d'una lesió aguda (43), podem acceptar que en el nostre model la component inflamatòria és la que majoritàriament repercuteix sobre la mecànica de la fibrosi pulmonar.

Les correlacions entre els paràmetres mecànics i els canvis relacionats amb la inflamació ( $W_L$ , LI,  $MPO_L$ ) podrien estar relacionades amb els canvis produïts en la composició de la substància fonamental (25;42). En aquest sentit, s'ha trobat que els proteoglicans augmenten quan la inflamació és prominent i disminueixen quan la inflamació es resol (44). L'increment de  $W_L$  podria ser degut a l'exudació alveolar (alveolitis), la deposició de molècules higroscòpiques (proteoglicans) en la MEC (44), o bé per la disfunció mecànica dels proteoglicans en la MEC (10). Aquest és el primer estudi que coneixem que mostri una correlació entre una propietat intrínseca del teixit pulmonar ( $\eta$ ) i un marcador d'estrés oxidatiu (MPO), i l'hem interpretada com a indicador de dependència de la mecànica tissular sobre els canvis estructurals subjacents induïts per la inflamació.

### **Comportament mecànic en rates instil·lades amb bleomicina per via intratraqueal; model de quatre setmanes de dosi única o de dosis repetides**

En model de tres dosis repetides per bleomicina es va trobar una infiltració de cèl·lules inflamatòries, un increment de la MPO i de les fibres de col·lagen, la presència de focus fibroblàstics i un augment tant de la H com de la G, 28 dies després de l'última dosi. En canvi, en el model de dosi única, el col·lagen va augmentar sense que hi haguessin canvis significatius en la mecànica pulmonar.

L'any 1988, Brown i col. varen desenvolupar un model de fibrosi pulmonar de dosis múltiples de BLM en rates i el van caracteritzar histològicament. Van concloure que el model de tres dosis administrades cada dues setmanes era suficient per observar les característiques de la fibrosi pulmonar progressiva tant en extensió com en severitat. Poc després, nou estudis (34;45;46;47;48;49;50;51;52) van caracteritzar aquest model en hámsters emprant tècniques bioquímiques, histològiques i morfomètriques. En aquests estudis, van trobar que la fibrosi era difusa i intersticial, amb increment de la HP i de les cèl·lules inflamatòries, i de l'activitat de la MPO, MDAE i SOD. Aquests

resultats concorden amb els trobats en el nostre estudi. Tots aquest estudis van concloure que els macròfags continuaven elevats 4 setmanes després de la última instil·lació. Els macròfags són estimuladors de neutròfils, i això podria explicar l'elevada activitat de la MPO en rates del grup de dosis múltiples en el nostre estudi. Els macròfags també produeixen TGF- $\beta$  especialment quan se'ls estimula amb BLM (46). El TGF- $\beta$  estimula l'expressió del gen del procol·lagen que dona lloc a un tret característic de la FP com és l'excés de deposició de col·lagen en la MEC (52). En el nostre estudi, l'augment de col·lagen es va observar en ambdós grups.

Un marcador de la inflamació i del dany pulmonar (LI) va augmentar significativament en ambdós grups. Aquest increment pot ser degut a components cel·lulars, components de la MEC i l'aigua pulmonar que forma part de la substància fonamental. Les correlacions que vàrem trobar recolzen la idea que els canvis en els components de la substància fonamental juguen un paper important en la determinació de les friccions entre els components fibril·lars de la MEC i la substància fonamental (41). La fibrosi en animals induïts amb una dosi única de BLM està associada normalment amb un increment de la deposició de col·lagen entre les 2-3 setmanes posteriors a la instil·lació, però que comença a resoldre's minvant la deposició a la quarta setmana (47). En el nostre estudi, vam observar un increment significatiu del col·lagen, però un increment de la G i de la H no significatius, després d'una instil·lació de dosi única. En canvi, dos estudis relativament recents en rata (10;19) van demostrar una correlació positiva entre la proporció del volum de fibres de col·lagen i la resistència i elastància tissular "in vitro". Aquestes discrepàncies podrien ser atribuïdes a les diferents dosis emprades, ja que aquests autors van emprar una dosi doble a la nostra. Es creu que la matriu col·lagen-elastina-proteoglicans juga un paper molt important en la determinació del comportament viscoelàstic del teixit parenquimatós i també que potencialment pot ser la responsable de la resistència tissular (39).

## I.6. CONCLUSIONS FINALS

1. En el model de dues setmanes i de dosi única de bleomicina, el procés inflamatori condueix a canvis en els paràmetres biomecànics que estan relacionats amb l'esmoreïment tissular com són la resistència i la histeresivitat. Per tant podem dir que la biomecànica tissular està alterada pels canvis estructurals subjacent induïts per la inflamació.



2. La inflamació i l'elastogènesi són els principals factors que determinen els canvis que s'observen en el comportament histerètic del pulmó durant els primers 15 dies després de la instil.lació d'una dosi única subletal de bleomicina en rates.
3. L'administració de dosis úniques o repetides de bleomicina presenten un comportament inflamatori i fibrogènic que evolucionen cap a diferents patrons de canvis biomecànics 28 dies després de l'última instil.lació.
4. D'acord amb estudis anteriors, el model de fibrosi pulmonar en rata per inducció d'una dosi única subletal de bleomicina no reproduïx el procés clínic de la FP que s'observa en pacients tractats amb bleomicina.
5. El model de tres dosis repetides de bleomicina simula els esdeveniments claus que se succeeixen en algunes MPID en humans caracteritzades per la inflamació, reparació aberrant del teixit epitelial, activitat disregulada de la fibrosi i la cicatrització progressiva del teixit.
6. El model experimental de dosis repetides sub-letals de bleomicina i l'avaluació del dany pulmonar mitjançant l'estudi biomecànic de tires de parènquima pulmonar, pot ser un mètode prometedor per testar fàrmacs antifibròtics i per a proporcionar nova informació sobre la fisiopatologia de les MPID.

## **I.7. BIBLIOGRAFIA CITADA**

- 1 Xaubet, A., Ancochea, J., Blanquer, R., Montero, C., Morell, F., Rodríguez Becerra, E., Sueiro, A., Villena, V., Grupo de Investigación en Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas. Area de Técnicas y Transplante. SEPAR., 2003. Diagnosis and treatment of diffuse interstitial lung diseases. Arch. Bronconeumol. 39, 580-600.
- 2 Chapman, H.A., 2004. Disorders of lung matrix remodeling. J. Clin. Invest. 113, 148-157.
- 3 Strieter, R.M., 2008. What differentiates normal lung repair and fibrosis? Inflammation, resolution of repair, and fibrosis. Proc. Am. Thorac. Soc. 5, 305-310.
- 4 Chua, F., Gauldie, J., Laurent, G.J., 2005. Pulmonary fibrosis: searching for model answers. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 33, 9-13.
- 5 Molina-Molina, M., Pereda, J., Xaubet, A., 2007. Experimental models for the study of pulmonary fibrosis: current usefulness and future promise Arch. Bronconeumol. 43, 501-507.
- 6 Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J., Kolb, M., 2008. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? Int. J. Biochem. Cell. Biol. 40, 362-382.
- 7 Kuwano, K., Hagimoto, N., Nakanishi, Y., 2004. The role of apoptosis in pulmonary fibrosis. Histol. Histopathol. 19, 867-81.
- 8 Thrall, R.S., Barton, R.W., D'Amato, D.A., Sulavik, S.B., 1982. Differential cellular analysis of bronchoalveolar lavage fluid obtained at various stages during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. Am. Rev. Respir. Dis. 126, 488-492.
- 9 Hay, J., Shahzeidi, S., Laurent, G., 1991. Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. Arch. Toxicol. 65, 81-94.
- 10 Dolhnikoff, M., Mauad, T., Ludwig, M.S., 1999. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 160, 1750-1757.

- 11** Jones, A.W., Reeve, N.L., 1978. Ultrastructural study of bleomycin-induced pulmonary changes in mice. *J. Pathol.* 124, 227-233.
- 12** Iraz, M., Erdogan, H., Kotuk, M., Yagmurca, M., Kilic, T., Ermis, H., Fadillioglu, E., Yildirim, Z., 2006. Ginkgo biloba inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Pharmacol. Res.* 53, 310-316.
- 13** Sogut, S., Ozyurt, H., Armutcu, F., Kart, L., Iraz, M., Akyol, O., Ozen, S., Kaplan, S., Temel, I., Yildirim, Z., 2004. Erdosteine prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 494, 213-220.
- 14** Boyaci, H., Maral, H., Turan, G., Basyigit, I., Dillioglugil, M.O., Yildiz, F., Tugay, M., Pala, A., Ercin, C., 2006. Effects of erdosteine on bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Mol. Cell. Biochem.* 281, 129-137.
- 15** Yao, H.W., Zhu, J.P., Zhao, M.H., Lu, Y., 2006. Losartan attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respiration.* 73, 236-242.
- 16** Brown, R.F., Drawbaugh, R.B., Marrs, T.C., 1988. An investigation of possible models for the production of progressive pulmonary fibrosis in the rat. The effects of repeated intratracheal instillation of bleomycin. *Toxicology.* 51, 101-110.
- 17** Yuan, H., Ingenito, E., Suki, B., 1997. Dynamic properties of lung parenchyma: mechanical contributions of fiber network and interstitial cells. *J. Appl. Physiol.* 83, 1420-1431.
- 18** Salerno, F.G., Fust, A., Ludwig, M.S., 2004. Stretch-induced changes in constricted lung parenchymal strips: role of extracellular matrix. *Eur. Respir. J.* 23, 193-198.
- 19** Ebihara, T., Venkatesan, N., Tanaka, R., Ludwig, M.S., 2000. Changes in extracellular matrix and tissue viscoelasticity in bleomycin-induced lung fibrosis. Temporal aspects. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 162, 1569-1576.
- 20** Zhao, Y., Young, S.L., McIntosh, J.C., 1998. Induction of tenascin in rat lungs undergoing bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol.* 274, L1049-L1057.
- 21** Lopez-Aguilar, J., Romero, P.V., 1998. Effect of elastase pretreatment on rat lung strip induced constriction. *Respir. Physiol.* 113, 239-246.

- 22 Romero, P.V., Zin, W.A., Lopez-Aguilar, J., 2001. Frequency characteristics of lung tissue during passive stretch and induced pneumoconstriction. *J. Appl. Physiol.* 91, 882-890.
- 23 Hantos, Z., Adamicza, A., Govaerts, E., Daróczy, B., 1992. Mechanical impedances of lungs and chest wall in the cat. *J. Appl. Physiol.* 73, 427-433.
- 24 Ito, S., Ingenito, E.P., Arold, S.P., Parameswaran, H., Tgavalekos, N.T., Lutchen, K.R., Suki, B., 2004. Tissue heterogeneity in the mouse lung: effects of elastase treatment. *J. Appl. Physiol.* 97, 204-212.
- 25 Flemmer, A., Simbruner, G., Muenzer, S., Proquitte, H., Haberl, C., Nicolai, T., Leiderer, R., 2000. Effect of lung water content, manipulated by intratraqueal furosemide, surfactant, or a mixture of both, on compliance and viscoelastic tissue forces in lung-lavaged newborn piglets. *Crit. Care. Med.* 28, 1911-1917.
- 26 Moore, V.L., Mondloch, V.M., Pedersen, G.M., Schrier, D.J., Allen, E.M., 1981. Strain variation in BCG-induced chronic pulmonary inflammation in mice: control by a cyclophosphamide-sensitive thymus-derived suppressor cell. *J. Immunol.* 127, 339-342.
- 27 Trush, M.A., Egner, P.A., Kensler, T.W., 1994. Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation. *Food. Chem. Toxic.* 32, 143-147.
- 28 Folch, E., Closa, D., Prats, N., Gelpí, E., Rosselló-Catafau, J., 1998. Leukotriene generation and neutrophil infiltration after experimental acute pancreatitis. *Inflammation.* 22, 83-93.
- 29 Woessner, J.F., 1961. The determination of hydroxiprolin in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 93, 440-447.
- 30 Silva, M.F., Zin, W.A., Saldiva, P.H., 1998. Airspace configuration at different transpulmonary pressures in normal and paraquat-induced lung injury in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 158, 1230-1234.
- 31 Fullmer, H.M., Sheetz, J.H., Narkates, A.J., 1974. Oxytalan connective tissue fibers: a review. *J. Oral. Pathol.* 3, 291-316.

- 32** Mata, M., Ruíz, A., Cerdá, M., Martínez-Losa, M., Cortijo, J., Santangelo, F., Serrano-Mollar, A., Llombart-Bosch, A., Morcillo, E.J., 2003. Oral N-acetylcysteine reduces bleomycin-induced lung damage and mucin Muc5ac expression in rats. *Eur. Respir. J.* 22, 900-905.
- 33** El-Medany, A., Hagar, H.H., Moursi, M., At Muhammed, R., El-Rakhawy, F.I., El-Medany, G., 2005. Attenuation of bleomycin-induced lung fibrosis in rats by mesna. *Eur. J. Pharmacol.* 509, 61-70.
- 34** Giri, S.N., Hyde, D.M., Braun, R.K., Gaarde, W., Harper, J.R., Pierschbacher, M.D., 1997. Antifibrotic effect of decorin in a bleomycin hamster model of lung fibrosis. *Biochem. Pharmacol.* 54, 1205-1216.
- 35** Genovese, T., Mazzon, E., Di Paola, R., Muià, C., Threadgill, M.D., Caputi, A.P., Thiernemann, C., Cuzzocrea, S., 2005. Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase modulate signal transduction pathways and the development of bleomycin-induced lung injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 529-538.
- 36** Izbicki, G., Segel, M.J., Christensen, T.G., Conner, M.W., Breuer, R., 2002. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int. J. Exp. Pathol.* 83, 111-119.
- 37** Selman, M., Pardo, A., 2002. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial /fibroblastic cross-talk disorder. *Respir. Res.* 3:3.
- 38** Chaudhary, N.I., Schnapp, A., Park, J.E., 2006. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat Bleomycin model. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 173, 769-776.
- 39** Fredberg, J.J., Stamenovic, D., 1989. On the imperfect elasticity of lung tissue. *J. Appl. Physiol.* 67, 2408-2419.
- 40** Suki, B., Varabais, A.L., Lutchen, K.R., 1994. Lung tissue viscoelasticity: a mathematical framework and its molecular basis. *J. Appl. Physiol.* 76, 2749-2759.
- 41** Suki, B., Ito, S., Stamenovic, D., Lutchen, K.R., Ingenito, E.P., 2005. Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces. *J. Appl. Physiol.* 98, 1892-1899.

**42** Cavalcante, F.S., Ito, S., Brewer, K., Sakai, H., Alencar, A.M., Almeida, M.P., Andrade Jr.J.S., Majumdar, A., Ingenito, E.P., Suki, B., 2005. Mechanical interactions between collagen and proteoglycans: implications for the stability of lung tissue. *J. Appl. Physiol.* 98, 672-679.

**43** Santos, F.B., Nagato, L.K., Boechem, N.M., Negri, E.M., Guimarães, A., Capelozzi, V.L., Faffe, D.S., Zin, W.A., Rocco, P.R., 2006. Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. *J. Appl. Physiol.* 100, 98-106.

**44** Venkatesan, N., Ebihara, T., Roughley, P.J., Ludwig, M.S., 2000. Alterations in large and small proteoglycans in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 161, 2066-2073.

**45** O'Neill, C.A., Giri, S.N., Wang, Q., Perricone, M.A., Hyde, D.M., 1992. Effects of dibutyrylcyclic adenosine monophosphate on bleomycin-induced lung toxicity in hamsters. *J. Appl. Toxicol.* 12, 97-111.

**46** Wang, Q., Hyde, D.M., Giri, S.N., 1992. Abatement of bleomycin-induced increases in vascular permeability, inflammatory cell infiltration, and fibrotic lesions in hamster lungs by combined treatment with taurine and niacin. *Lab. Invest.* 67, 234-242.

**47** Zia, S., Hyde, D.M., Giri, S.N., 1992. Development of a bleomycin hamster model of subchronic lung fibrosis. *Pathology.* 24, 155-163.

**48** Wild, J.S., Hyde, D.M., Giri, S.N., 1994. Dose and regimen effects of poly ICLC, an interferon inducer, in a multi-dose bleomycin model of interstitial pulmonary fibrosis. *Pharmacol. Toxicol.* 75, 42-48.

**49** Blaisdell, R.J., Schiedt, M.J., Giri, S.N., 1994. Dietary supplementation with taurine and niacin prevents the increase in lung collagen cross-links in the multidose bleomycin hamster model of pulmonary fibrosis. *J. Biochem. Toxicol.* 9, 79-86.

**50** Blaisdell, R.J., Giri, S.N., 1995. Mechanism of antifibrotic effect of taurine and niacin in the multidose bleomycin-hamster model of lung fibrosis: inhibition of lysyl oxidase and collagenase. *J. Biochem. Toxicol.* 10, 203-210.

**51** Iyer, S.N., Margolin, S.B., Hyde, D.M., Giri, S.N., 1998. Lung fibrosis is ameliorated by pirfenidone in diet after the second dose in a three-dose bleomycin hamster model. *Exp. Lung. Res.* 24, 119-132.

**52** Wang, Q., Hyde, D.M., Gotwals, P.J., Giri, S.N., 2002. Effects of delayed treatment with transforming growth factor-beta soluble receptor in a three-dose bleomycin model of lung fibrosis in hamsters. *Exp. Lung. Res.* 28, 405-417.