

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



**PAPEL DE CORTISTATINA EN FIBROSIS CRÓNICA:
POTENCIAL APLICACIÓN TERAPÉUTICA EN
ESCLERODERMIA Y FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA**

Programa de doctorado en Biomedicina

Margarita Barriga García-Mauriño

Granada – 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Margarita Barriga García-Mauriño
ISBN: 978-84-1117-064-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/71105>

Quiero dar las gracias a todas las personas que, de una manera u otra, han estado a mi lado durante todo el transcurso de esta tesis.

En primer lugar, a mi tutor Mario Delgado por la enorme oportunidad que me ha dado para hacer esta tesis. Apostaste por dirigirme en una tesis que ambos sabíamos que iba a requerir un esfuerzo y una dedicación extras, en la cual íbamos a contrarreloj. Sin esa confianza y tus enseñanzas habría sido imposible sacar este trabajo adelante. Muchas gracias por pensar que tengo potencial y por incentivar me a seguir adelante, investigando y sacando unos resultados de los que hoy estoy muy orgullosa.

Quiero dar unas gracias enormes a Jenny Campos, mi tutora y compañera. Desde el inicio de mi tesis trabajamos juntas y luchamos por unos protocolos que costaron pero que al final salieron. Hemos trabajado juntas incontables horas codo con codo. Me has hecho aprender y mejorar lo que no está escrito. En el laboratorio hemos pasado por todo: hemos sufrido juntas y hemos discutido (aunque sólo un poquito), pero sobretodo nos hemos alegrado juntas cuando las cosas han salido adelante. Tengo totalmente claro que, sin todo tu esfuerzo a mi lado, no sólo enseñándome, sino animándome y ayudándome en todo momento, no habría sido capaz de conseguir este trabajo. Mil gracias.

También a Marta. He aprendido mucho de ti y me lo he pasado genial trabajando contigo. Muchísimas gracias por toda tu ayuda que ha sido esencial para esta tesis. Ojalá en el futuro encuentre a otra compañera tan buena como tú lo has sido.

Además, quiero dar las gracias a Raquel. Compañera, pero sobretodo amiga, has sido un apoyo durante todo este proceso. Sin esos cafés, cervecitas y menús compartidos en el mesón, desahogándonos cuando no nos salían los experimentos o hablando de cualquier cosa aleatoria, estos años de intenso trabajo no habrían sido igual. Muchas gracias por estar ahí. Eres una persona genial y una científica de diez. Estoy segura, y espero de todo corazón, que te irá genial en todo lo que hagas.

A todos los compañeros del laboratorio: Elena (en cuyo laboratorio he pasado mil horas con el microscopio), Marina, Irene, Julia, Nacho y Clara. A Gema, con la que, a pesar de no haber coincidido mucho tiempo, me gustó mucho trabajar. A ti te agradezco, además, haberme introducido por primera vez en el mundo de los cultivos celulares antes de saber que iba a estar dedicada a ellos estos años.

Gracias a mis amigos: Juan Carlos, Bárbara, Maru, Nieves, José Antonio, Carla, Jesús... por estar ahí en las buenas y en las malas, por todos los planes y las distracciones y porque nada sería igual sin vosotros.

A mi familia, en especial a mis padres y a mi hermano. Desde el principio siempre me habéis apoyado sin dudar en todas mis decisiones, sin vosotros a mi lado no habría llegado hasta aquí. Me habéis dado fuerza y ánimo en cada paso. Nadie puede imaginarse la suerte que es teneros a mi lado, os quiero.

Por último, le doy las gracias a la persona que más me ha aguantado, a la que cada día acudía buscando ánimo y que desde miles de kilómetros me sacaba una sonrisa incluso en los días malos. Max, muchas gracias por estar ahí siempre, por apoyarme tanto desde lejos, como ahora estando junto a mí, en cada paso de este camino. Has sido mi gran apoyo.

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Fibrosis.....	5
1.1.1 Proceso fibrótico	5
1.1.2 Componentes celulares de la fibrosis	9
1.1.3 Componentes moleculares implicados en fibrosis	13
1.2 Enfermedades crónicas asociadas a procesos de fibrosis	24
1.2.1 Aspectos generales de las patologías fibróticas	24
1.2.2 Factores endógenos asociados a fibrosis	34
1.2.3 Tratamientos de las enfermedades fibróticas	36
1.3 Neuropéptido Cortistatina	38
1.3.1 Aspectos generales de Cortistatina.....	38
1.3.2 Papel inmunorregulador de Cortistatina.....	41
1.3.3 Papel de Cortistatina en los procesos de fibrosis	45
1.4 Vehiculización, protección y biodisponibilidad de las moléculas farmacológicas.....	48
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	52
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
3.1 Objetivo 1. Estudio del papel de Cortistatina en la regulación endógena de los procesos de fibrosis asociados a enfermedades crónicas relevantes	56
3.1.1 Animales de experimentación	56
3.1.2 Modelos de fibrosis y obtención de muestras	56
3.1.3 Cuantificación del número total de células vivas	60
3.1.4 Análisis de poblaciones celulares en el BAL por citometría de flujo	60
3.1.5 Estudio de la actividad mieloperoxidasa (MPO) de neutrófilos.....	61
3.1.6 Medida de la permeabilidad vascular.....	61
3.1.7 Estudio histológico de los tejidos.....	61
3.1.8 Análisis de la expresión génica en tejido	66
3.1.9 Determinación de la cantidad de colágeno en tejido	69
3.2 Objetivo 2. Estudio de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el potencial efecto antifibrótico de Cortistatina	72
3.2.1 Aislamiento de fibroblastos primarios	72
3.2.2 Cultivo de fibroblastos primarios	72
3.2.3 Congelación y descongelación de fibroblastos primarios	73
3.2.4 Preparación de cultivos de fibroblastos para los experimentos.....	73
3.2.5 Análisis de la expresión génica en cultivos fibroblastos	74
3.2.6 Análisis de la expresión proteica en cultivos de fibroblastos.....	74
3.2.7 Inmunofluorescencia indirecta sobre cultivos de fibroblastos	78
3.2.8 Estudio de la tasa de crecimiento celular de cultivos de fibroblastos	79
3.2.9 Estudio de la viabilidad de cultivos de fibroblastos	79
3.2.10 Estudio de cierre de la herida: Scratch Assay	80
3.2.11 Estudio del transcriptoma de fibroblastos	81
3.3 Objetivo 3. Estudio del posible efecto terapéutico de la administración de Cortistatina en enfermedades crónicas asociadas a procesos de fibrosis.....	86
3.3.1 Animales de experimentación	86
3.3.2 Modelos de fibrosis y tratamiento con Cortistatina.....	86
3.4 Objetivo 4. Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en el uso de Cortistatina capaces de incrementar su eficacia en términos de biodisponibilidad.....	88

3.4.1 Clonaje y simulación in sílico	88
3.4.2 Transfección en células HEK293	97
3.4.3 Detección y cuantificación de Cortistatina latente	101
3.4.4 Estudio de la eficacia en términos de biodisponibilidad de Cortistatina latente en modelos experimentales de fibrosis	102
3.5 Análisis estadísticos.....	103
4. RESULTADOS.....	104
4.1 Objetivo 1. Estudio del papel de Cortistatina en la regulación endógena de los procesos de fibrosis asociados a enfermedades crónicas relevantes	105
4.1.1 La expresión de Cortistatina y sus receptores disminuye en tejidos con fibrosis....	105
4.1.2 La falta de Cortistatina exagera los signos asociados a fibrosis pulmonar.....	107
4.1.3 La falta de Cortistatina exagera los signos asociados a esclerodermia	111
4.2 Objetivo 2. Estudio de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el potencial efecto antifibrótico de Cortistatina	115
4.2.1 La falta de Cortistatina altera la expresión de α SMA y CTGF	115
4.2.2 La falta de Cortistatina favorece la activación de las vías de señalización profibróticas de TGF β	117
4.2.3 La falta de Cortistatina altera el crecimiento, la viabilidad y la capacidad de migración de los fibroblastos	119
4.2.4 El tratamiento de los fibroblastos con Cortistatina mejora la expresión de los marcadores fibróticos	121
4.2.5 Expresión diferencial en el transcriptoma de fibroblastos CST ^{+/+} y CST ^{-/-}	121
4.3 Objetivo 3. Estudio del posible efecto terapéutico de la administración de Cortistatina en enfermedades crónicas asociadas a procesos de fibrosis.....	127
4.3.1 El tratamiento con Cortistatina presenta efectos terapéuticos en fibrosis pulmonar	127
4.3.2 El tratamiento con Cortistatina presenta efectos terapéuticos en esclerodermia.....	131
4.3.3 El uso de Cortistatina en animales CST ^{+/+} con fibrosis pulmonar permite recuperar el fenotipo CST ^{+/+}	132
4.3.4 El efecto antifibrótico de Cortistatina es ejercido por medio de los receptores de Somatostatina y Grelina	134
4.4 Objetivo 4. Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en el uso de Cortistatina capaces de incrementar su eficacia en términos de biodisponibilidad.....	135
5. DISCUSIÓN.....	138
6. CONCLUSIONES.....	150
REFERENCIAS	153
ÍNDICE DE FIGURAS.....	170
ANEXO DE TABLAS.....	173

RESUMEN

La exposición prolongada a infecciones, lesiones, tóxicos y enfermedades inflamatorias idiopáticas puede promover el desarrollo de fibrosis crónica. Dicha fibrosis consiste, básicamente, en el depósito de un exceso de matriz extracelular, lo que provoca alteraciones morfológicas y funcionales en el órgano afectado. La fibrosis es una de las principales causas de enfermedades crónicas asociadas a órganos parenquimales y las patologías asociadas a ella constituyen un tercio de las muertes que se producen en el mundo desarrollado. Además, la fibrosis asociada a la neumonía es la principal causa de ingresos hospitalarios y de muertes relacionadas con el virus *SARS-CoV-2*, responsable de la actual pandemia. Pese a todo, debido a la complejidad celular y molecular que rodea todo el proceso, a día de hoy no se han desarrollado tratamientos específicos capaces de frenarlo o incluso revertirlo. Por ello, es de especial necesidad la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y estrategias que permitan abordar de forma eficaz el proceso fibrótico. En este sentido existen evidencias que sugieren que Cortistatina, un neuropéptido con capacidad inmunorreguladora y antiinflamatoria, podría ejercer un papel regulador importante en los procesos fibróticos, actuando por un lado sobre el proceso inflamatorio previo y, por otro, sobre la fibrosis y las células efectoras fibrogénicas. Con el objetivo de investigar ese potencial papel de Cortistatina desarrollamos distintos modelos experimentales preclínicos de fibrosis crónica en piel y pulmón en ratones con una dotación génica normal de Cortistatina ($CST^{+/+}$) y con deficiencia parcial ($CST^{+/-}$) o total ($CST^{-/-}$) del neuropéptido. Encontramos que los animales deficientes en Cortistatina, $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$, presentaron procesos inflamatorios acentuados de forma significativa, seguidos de respuestas fibróticas más exacerbadas que las mostradas en animales $CST^{+/+}$, lo que se tradujo en un aumento en las tasas de mortalidad y fallo orgánico. Además, los fibroblastos pulmonares aislados de los animales deficientes en Cortistatina mostraron una respuesta fibrótica exagerada, mientras que el tratamiento de estas células con el neuropéptido redujo su activación. Así mismo, el tratamiento con Cortistatina de animales con fibrosis pulmonar y esclerodermia redujo la severidad de las patologías, mejorando significativamente los signos histopatológicos y marcadores fibróticos típicos de estas enfermedades. Además, el tratamiento con Cortistatina de animales deficientes para la expresión del neuropéptido consiguió revertir parcialmente su fenotipo, dando lugar al desarrollo de procesos fibróticos menos severos. Por su parte, el bloqueo de los receptores de Somatostatina y Grelina inhibió parcialmente el efecto antifibrótico del neuropéptido, confirmando que la acción protectora de Cortistatina era ejercida por medio de los mismos. Para lograr estos resultados antiinflamatorios y antifibróticos, debido a la corta vida media de Cortistatina y a su rápida degradación por la acción de peptidasas tisulares, el tratamiento con el neuropéptido requiere de la administración de grandes dosis de manera frecuente. Este hecho podría suponer una serie de inconvenientes para su uso en terapia, tales como la posibilidad de generar la aparición de efectos pleiotrópicos debido a que sus receptores están distribuidos por todo el organismo. Con el fin de solventar estos problemas, desarrollamos mediante técnicas de ingeniería genética una molécula de Cortistatina latente, en la que el neuropéptido queda protegido hasta llegar al foco inflamatorio/fibrótico aumentando su biodisponibilidad. El tratamiento de los modelos preclínicos de fibrosis crónica con la molécula de Cortistatina latente presentó efectos terapéuticos notables y comparables a los obtenidos para Cortistatina con dosis y frecuencias de administración sustancialmente reducidas.

En resumen, Cortistatina emerge como un regulador endógeno de la fibrosis asociada a daño tisular y se podría considerar como un futuro biomarcador de susceptibilidad a sufrir procesos fibróticos asociados a patologías crónicas y una atractiva alternativa terapéutica para su tratamiento y el desarrollo de fármacos dirigidos a los mismos.

ABREVIATURAS

αSMA	Actina α del músculo liso (del inglés <i>α Smooth Muscle Actin</i>)
AngII	Angiotensina II
ADNc	ADN complementario
ALI	Daño pulmonar agudo (del inglés <i>Acute Lung Injury</i>)
ARNm	ARN mensajero
ARDS	Síndrome de dificultad respiratoria aguda (del inglés <i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>)
BAL	Lavado broncoalveolar (del inglés <i>BronchoAlveolar Lavage</i>)
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo (del inglés <i>Connective Tissue Growth Factor</i>)
CST	Cortistatina
EMT	Transición epitelial-mesenquimal (del inglés <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>)
ERC	Enfermedad renal crónica
FPI	Fibrosis Pulmonar Idiopática
GHSR1α	Receptor de Grelina (del inglés <i>Growth Hormone Secretagogue Receptor Type 1α</i>)
HSC	Células estrelladas hepáticas (del inglés <i>Hepatic Stellate Cells</i>)
LAP	Proteína asociada a latencia (del inglés <i>Latency Associated Protein</i>)
LTBP	Proteína de unión al TGF β latente (del inglés <i>Latent TGFβ Binding Protein</i>)
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno (del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz extracelular (del inglés <i>Matrix MetalloProteinases</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés <i>Platelet Derived Growth Factor</i>)
qPCR	PCR cuantitativa (del inglés <i>quantitative PCR</i>)
RAS	Sistema renina-angiotensina (del inglés <i>Renin-Angiotensin System</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SFB	Suero Fetal Bovino
SP	Secuencia (péptido) señal (del inglés <i>Signal Peptide</i>)
SSc	Esclerodermia o esclerosis sistémica (del inglés <i>Systemic Sclerosis</i>)
SST	Somatostatina
SSTR	Receptores de Somatostatina (del inglés <i>Somatostatin receptors</i>)
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β (del inglés <i>Transforming Growth Factor β</i>)
TIMP	Inhibidor tisular de la metaloproteinasa (del inglés <i>Tissue Metalloproteinase Inhibitor</i>)
TNFα	Factor de necrosis tumoral α (del inglés <i>Tumor Necrosis Factor α</i>)
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular (del inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Fibrosis

La fibrosis se define como el crecimiento excesivo, el endurecimiento y la cicatrización de un órgano, como consecuencia de reacciones inflamatorias crónicas inducidas por una variedad de estímulos (1). O dicho de otra forma, se trata de una respuesta de “cicatrización de la herida” fuera de control (2). La reparación de los tejidos tras un daño es un proceso biológico fundamental que permite reemplazar las células muertas o dañadas. Este proceso de reparación se puede resumir en dos grandes etapas: 1) una etapa regenerativa, en la que las células dañadas son sustituidas por células del mismo tipo; y 2) una etapa de fibroplasia, en la cual nuevo tejido conectivo sustituye el tejido parenquimatoso normal (1,3). Sin embargo, cuando este proceso de reparación se vuelve crónico, se produce una acumulación de moléculas y componentes de la matriz extracelular (MEC). Si esta situación aumenta de forma progresiva, se favorece la formación de una cicatriz, lo que finalmente puede dar lugar a un mal funcionamiento del órgano afectado (2). El proceso de fibrosis es una característica común de muchas enfermedades crónicas que afectan a órganos parenquimales, en las cuales la sustitución de unidades funcionales celulares por cicatrices de MEC (compuestas principalmente por colágeno), así como la alteración estructural del órgano debido a la retracción de la cicatriz, son los principales causantes de la pérdida de función del órgano y, finalmente, del fallo orgánico (4). Este proceso de cicatrización es una causa de morbilidad y mortalidad y puede representar hasta el 45% de las causas de muerte en los países desarrollados (5,6).

1.1.1 Proceso fibrótico

Debido a que la fibrosis afecta a órganos diversos (tales como la piel, los pulmones, el hígado o los riñones), que presentan tanto una función como una composición celular y molecular propias, existen rasgos de los procesos fibróticos que son específicos para cada órgano. Sin embargo, las características centrales de estos procesos son compartidas por todas las patologías asociadas a fibrosis crónica lo que sugiere vías patogénicas comunes. De forma general los procesos de fibrosis pueden resumirse en cuatro grandes fases:

1. Daño inicial en un tejido y coagulación de la lesión.
2. Respuesta inflamatoria.
3. Activación de células efectoras fibrogénicas y generación de la MEC.
4. Progresión de la fibrosis y fallo orgánico (6,7).

Así, en primer lugar, se genera un daño inicial en un tejido. Existe una gran variedad de estímulos que pueden iniciar diversos programas profibróticos en las células epiteliales y, a veces, en las células endoteliales. Entre esos estímulos se encuentran las lesiones y traumatismos tisulares, las toxinas, la radiación, las infecciones persistentes por virus o bacterias, las reacciones autoinmunes o las reacciones alérgicas (1,4,6). Independientemente del estímulo, las células epiteliales y/o endoteliales dañadas liberan mediadores inflamatorios y especies reactivas de oxígeno (del inglés *Reactive Oxygen Species*, ROS) que favorecen una cascada de coagulación (2). Además, al producirse un daño en el endotelio, queda expuesta la capa subendotelial, capa de tejido conjuntivo que se encuentra rodeando directamente al endotelio y su lámina basal. Esto hace que queden expuestos el colágeno de dicha capa (principalmente I, III y VI) y el Factor de von Willebrand embebido en él, una glucoproteína que interacciona con las plaquetas y reduce el flujo plaquetario permitiendo que queden en la zona dañada. El colágeno expuesto interacciona con esas plaquetas activándolas (8). Además, el factor de coagulación II o protrombina se escinde proteolíticamente para formar trombina, la cual que convierte al factor de coagulación I soluble o

fibrinógeno en hebras insolubles de fibrina, proteína fibrilar implicada en la adhesión plaquetaria. Esto ayuda a que las plaquetas se agrupen para formar el coágulo de fibrina que garantiza una hemostasia rápida.

Debido a la formación del coágulo, las plaquetas activadas se degranulan promoviendo la vasodilatación y liberando factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés *Platelet Derived Growth Factor*, PDGF), un quimioatrayente para las células inflamatorias. En las etapas iniciales del proceso de cicatrización, las células inflamatorias más abundantes son los neutrófilos, que cuando se degranulan y mueren, son sustituidos por macrófagos. Ambos tipos celulares se encargan de eliminar los restos de tejido, las células muertas y cualquier organismo invasor, en caso de que lo hubiera. Los macrófagos también se encargan de fagocitar el coágulo de fibrina. Además, ambos tipos celulares estimulan la producción de quimioquinas (CXCL8, CCL2, CCL3, CCL5), citoquinas proinflamatorias (IL1 α , IL1 β , IL6, IL12, el factor de necrosis tumoral α (del inglés *Tumor Necrosis Factor α* , TNF α)) y ROS, así como el factor de crecimiento de endotelio vascular (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), que inducen a las células endoteliales a proliferar y formar nuevos vasos sanguíneos en torno a la lesión. Este hecho favorece aún más la llegada de nuevas células inflamatorias. Otras células inmunológicas implicadas en la patogénesis de la fibrosis son los mastocitos, los eosinófilos y los basófilos. Posteriormente, se activan linfocitos T y B. En concreto, las células TH2 y TH17 son potentes impulsores de la fibrosis progresiva. Estos linfocitos secretan citoquinas (IL4, IL5, IL13 o IL17A), así como el factor de crecimiento transformante β (del inglés *Transforming Growth Factor β* , TGF β), liberado también por las plaquetas, que promueven la producción de anticuerpos por las células B y la activación y producción de colágeno por las células efectoras fibrogénicas locales (3,5,9,10).

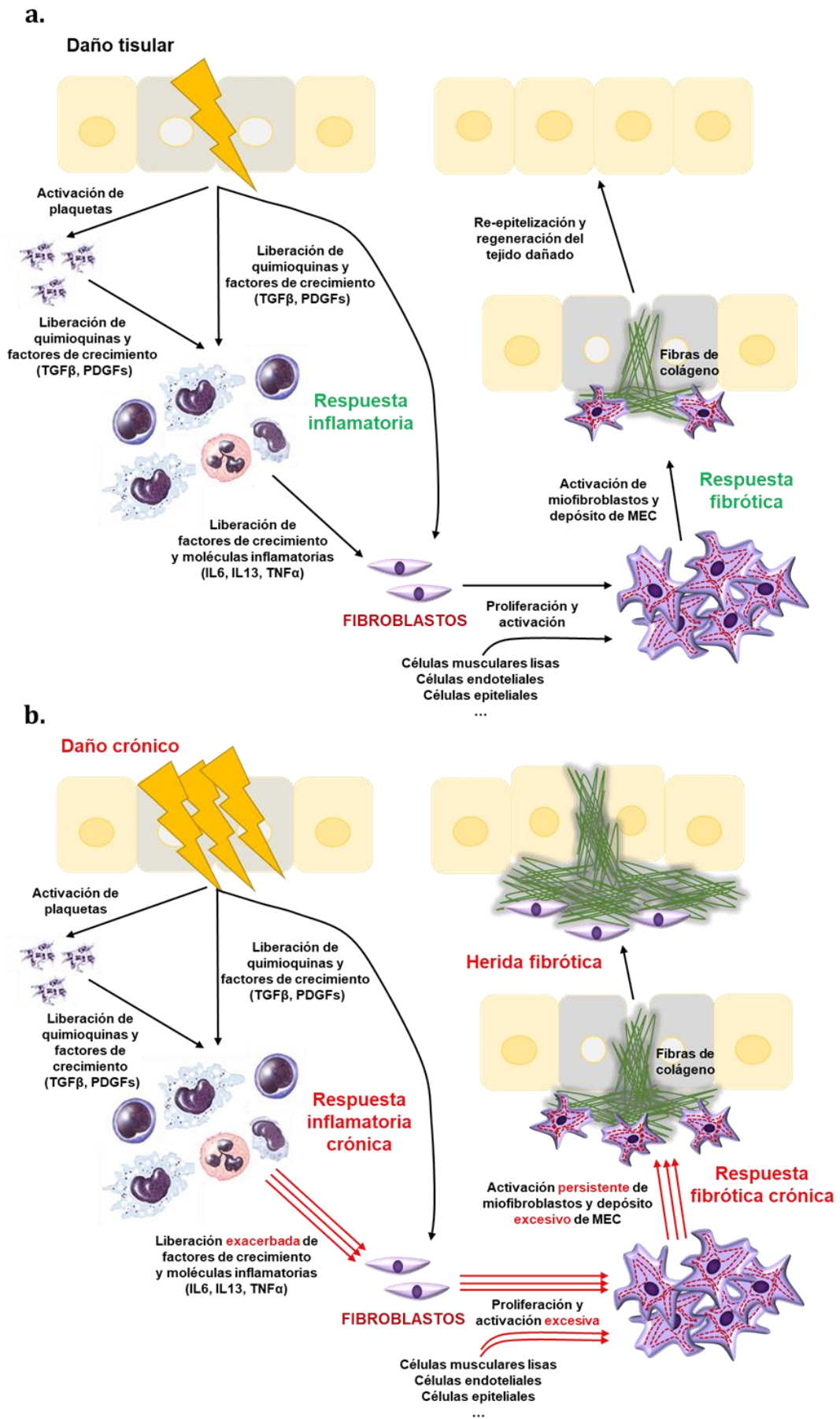
Las células efectoras fibrogénicas son células mesenquimales encargadas de la síntesis de proteínas de la MEC. Las proteínas de matriz generadas se encuentran bastante conservadas, siendo las moléculas de colágeno las más predominantes (principalmente las fibras de colágeno tipo I y III), además de fibronectina, proteínas de la membrana basal como la laminina y otras proteínas menos abundantes (1). Entre las células efectoras fibrogénicas destacan los fibroblastos que al activarse dan lugar a los miofibroblastos, considerados como los mediadores celulares clave de la fibrosis debido a que son los principales productores de colágeno, que expresan proteínas de músculo liso como la actina α del músculo liso (del inglés *Smooth Muscle Actin α* , α SMA), por lo que poseen capacidad para contraerse. Esto favorece que se produzca la contracción del órgano en el que se encuentran, favoreciendo así su alteración estructural y funcional. Además de los fibroblastos locales, otras células son fuente de miofibroblastos como las células epiteliales y endoteliales, los fibrocitos circulantes y otras células que se describirán en el apartado 1.1.2 del presente trabajo. Cabe destacar que las células efectoras fibrogénicas no sólo liberan proteínas de la MEC, sino que, junto con las células epiteliales y endoteliales dañadas, llevan a cabo la liberación de citoquinas (como IL6), quimioquinas (como CCL2 o CXCL8) y factores de crecimiento (como TGF β) que estimulan la proliferación y el reclutamiento de los leucocitos y el desarrollo de una respuesta inflamatoria. Además, las células fibrogénicas liberan enzimas metaloproteinasas de la matriz (del inglés *Matrix MetalloProteinases*, MMPs), como MMP2 y MMP9, que rompen la membrana basal favoreciendo la entrada al sitio de la lesión de las células del sistema inmunológico (2). Es importante decir que las moléculas liberadas por las células efectoras fibrogénicas, entre las que destaca TGF β , también favorecen la activación de las propias células profibróticas de forma autocrina y paracrina (1–3,5,9).

Finalmente, una vez que la lesión del tejido es reparada, se produce la inactivación de las células fibrogénicas e inflamatorias y la reabsorción de las proteínas de la MEC. Además, las células epiteliales y/o endoteliales se dividen y migran sobre las capas basales para regenerar el tejido dañado, completando así el proceso de reparación de órganos y curación normal (1,5). Sin embargo, si la lesión se hace crónica y la activación de las células efectoras fibrogénicas persiste, se mantiene la síntesis y el depósito de MEC, lo que da lugar a la cicatrización progresiva del órgano, desembocando en su alteración estructural y su fallo funcional (6).

Todo el proceso de curación de la herida explicado se resume e ilustra en la Figura 1. El papel específico que juega cada tipo celular en todo el proceso de fibrosis, así como los mecanismos moleculares involucrados en el proceso fibrótico, se detallan de forma más específica en los apartados 1.1.2 y 1.1.3 de este manuscrito, respectivamente.

Figura 1. Diagrama del proceso de fibrosis

a) Un daño inicial en el tejido induce a la activación plaquetaria y la formación de un coágulo de fibrina. Tras esto, las células epiteliales y endoteliales dañadas, así como las plaquetas activadas, liberan factores de crecimiento, factores quimiotácticos y vasodilatadores que favorecen el reclutamiento de células inmunológicas. Todo ello auspicia la liberación de citoquinas y moléculas proinflamatorias, con la consiguiente activación de la respuesta inflamatoria. El ambiente inflamatorio generado, promueve la proliferación y diferenciación de los fibroblastos locales y otras células (células musculares lisas, células endoteliales, epiteliales, etc) a miofibroblastos, principales células productoras de MEC y con capacidad contráctil. Además, un proceso de angiogénesis y formación de nuevos vasos sanguíneos en torno a la lesión acompañaría a la evolución de la misma. Una vez que la lesión es resuelta o desaparece, los miofibroblastos se inactivan y se produce la regeneración del tejido dañado. **b)** Si el daño continúa puede activarse una respuesta inflamatoria crónica. Como consecuencia de la liberación continuada de citoquinas y factores de crecimiento se induce una activación persistente de los miofibroblastos, lo cual da lugar a un exceso del depósito de MEC y la cicatrización patológica del órgano.



1.1.2 Componentes celulares de la fibrosis

Se han identificado una multitud de tipos de células que contribuyen a la liberación de moléculas proinflamatorias/profibroticas, a la formación de MEC y/o a la contracción del órgano durante la fibrosis como son los fibroblastos, miofibroblastos, células madre mesenquimales, fibrocitos, células epiteliales, endoteliales y mesoteliales, pericitos y células musculares lisas. El papel específico que juega cada uno de estos tipos celulares se detalla a continuación.

Fibroblastos

Los fibroblastos son células de forma fusiforme que constituyen el tipo celular más común del tejido conectivo no cartilaginoso y, al ser activadas, constituyen las principales células responsables de la mayoría del depósito de colágeno (principalmente I y III) y otras moléculas de la MEC (laminina y fibronectina) en la curación de heridas. Estas acciones están impulsadas principalmente por factores de crecimiento fibrogénicos, como TGF β y PDGF (11). Además, regulan el recambio de la MEC por medio de la producción de enzimas metaloproteinasas (como MMP1 y MMP2) y del inhibidor tisular de la metaloproteinasa (del inglés *Tissue Inhibitors of Metalloproteinase*, TIMP), manteniendo un balance equilibrado entre ambos tipos enzimáticos. Los fibroblastos son células quimiotácticas y pueden migrar dentro del tejido, lo que les permite desplazarse a la zona de la herida y llevar a cabo sus funciones de curación y fibrogénesis (12). Otras características de los fibroblastos activados son: i) la secreción de citoquinas (IL1 β e IL6) y quimioquinas profibroticas (CXCL8, CCL2, CCL3, CCL5) (11,13); ii) resistencia a interferón- γ (IFN γ); y iii) la generación espontánea de ROS (11). Por otro lado, en los fibroblastos activados se ha descrito una expresión elevada de diversas moléculas, como las relacionadas con vías de señalización intracelular (SMAD3, la proteína quinasa C (del inglés *Protein Kinase C*, PKC) o la proteína de respuesta de crecimiento temprano 1 (Egr-1), entre otras) o factores de supervivencia (como Bcl-2 y AKT, una proteína quinasa activada por mitógeno (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase*, MAPK)) (11,14).

Un hecho especialmente importante es que, durante la fibrogénesis, pueden transformarse a miofibroblastos por un mecanismo de transdiferenciación, tal y como se detalla en el siguiente sub-apartado.

Miofibroblastos

Los miofibroblastos son células de citoplasma ramificado con propiedades contráctiles muy potentes, debido a la expresión de α SMA en sus fibras de estrés; y que presentan un abundante retículo endoplasmático rugoso debido a que constituyen la fuente clave del exceso de moléculas estructurales de la MEC como son las moléculas de colágeno I-V y XVIII, laminina, trombospondina, glucosaminoglucanos, ácido hialurónico, heparán sulfato, proteoglicanos, fibronectina y otras glucoproteínas (12,15,16).

Los miofibroblastos presentan un origen muy diverso. Así, pueden provenir de los fibroblastos locales activados, principal fuente de estas células (13,17,18); pero también pueden provenir de la diferenciación de células madre mesenquimales (del inglés *Mesenchymal Stem Cells*, MSC) tanto locales como de la médula ósea, de fibrocitos circulantes, de células epiteliales, endoteliales y mesoteliales, de células musculares lisas, de pericitos y de células especializadas de cada tejido como son las células estrelladas hepáticas (del inglés *Hepatic Stellate Cells*, HSC) (Figura 2) (12).

Cuando se produce una lesión en un tejido, los factores de crecimiento como TGF β , PDGF y el factor de crecimiento del tejido conectivo (del inglés *Connective Tissue Growth Factor*, CTGF), junto con diversas citoquinas (como IL1 o TNF α), activan en las células precursoras las vías de señalización implicadas en la proliferación, la migración, la secreción de proteínas de la MEC y la contractilidad, las cuales promueven su transdiferenciación a miofibroblastos fibrogénicos y mantienen su estado activado (19,20). La diferenciación de miofibroblastos es un fenómeno complejo cuyo desarrollo sigue una secuencia de eventos bien establecida que necesita de, al menos, tres circunstancias locales: 1) acumulación de TGF β ; 2) presencia de proteínas de la MEC especializadas; y 3) alto estrés extracelular, derivado de las propiedades mecánicas de la MEC y la actividad celular remodeladora (21).

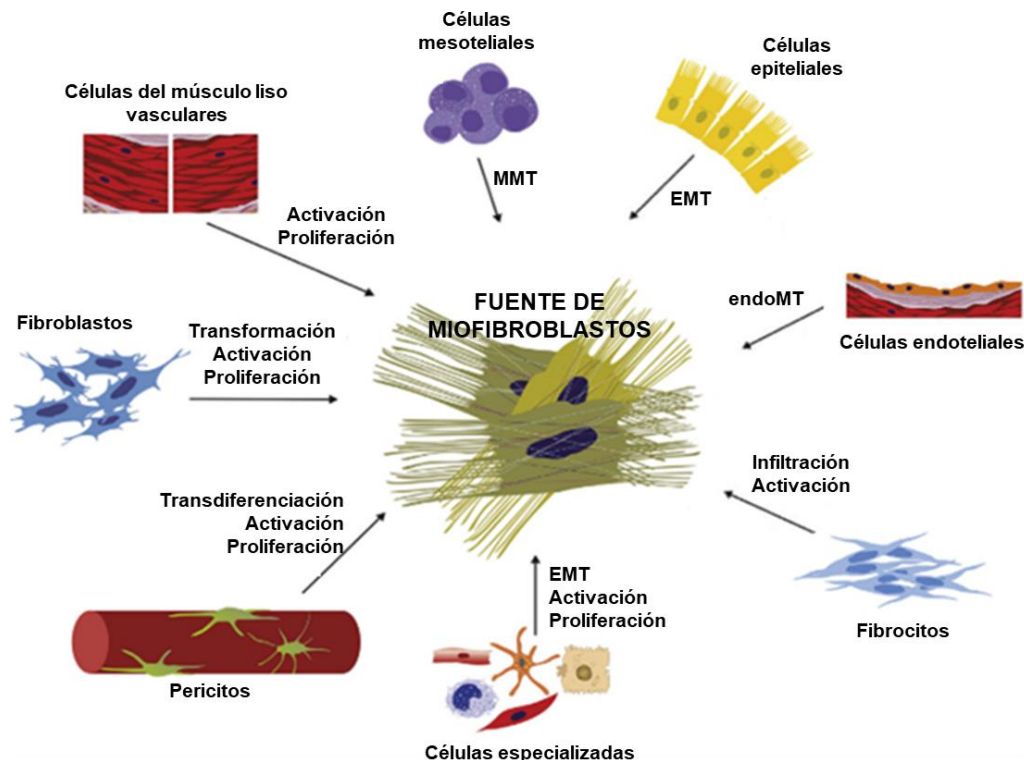


Figura 2. Células de las que proceden los miofibroblastos

Las siglas EMT, EndoMT y MMT hacen referencia a los procesos por los cuales las células epiteliales, endoteliales y mesoteliales se diferencian a miofibroblastos respectivamente: EMT, transición epitelial-mesenquimal (del inglés *Epithelial-Mesenchymal Transition*); EndoMT, transición endotelial-mesenquimal" (del inglés *Endothelial-Mesenchymal Transition*); y MMT, transición mesotelial-mesenquimal" (del inglés *Mesothelial-Mesenchymal Transition*) (tomada de (12)).

Como ya se ha indicado, el principal progenitor de miofibroblastos después de la lesión parece ser el fibroblasto que reside localmente, mediante un proceso de transdiferenciación (18,21). Este proceso ocurre de la siguiente manera: en condiciones normales, las células fibroblásticas presentan unos microfilamentos de actina que se organizan predominantemente en una malla cortical y no actúan como fibras de estrés. Además, exhiben pocos o ningún contacto célula-célula y matriz-célula asociada a la actina, y poca producción de MEC (22). Tras una lesión tisular, las células residentes y las células inflamatorias liberan citoquinas y factores de crecimiento, entre los que destaca TGF β , que activan a los fibroblastos para migrar al tejido dañado y sintetizar los componentes de la MEC (21). A medida que se va sintetizando nueva MEC, se produce una alteración del microambiente mecánico de la misma, de manera que los fibroblastos pasan de estar protegidos contra el estrés por la MEC reticulada a estar expuestos,

debido a esa remodelación continua. En respuesta al desafío mecánico, los fibroblastos adquieren fibras de tensión contráctiles que se componen de las actinas citoplasmáticas F, β y γ y vimentina (15), dando lugar a lo que se conoce como "protomiofibroblasto", que representa un paso intermedio hacia el "miofibroblasto diferenciado". Las fibras de estrés celular se conectan a proteínas de la MEC por medio de las integrinas $\alpha 5\beta 1$ generando uniones focales, que reciben el nombre de fibronexo *in vivo* (23,24) y que permiten, entre otras cosas, activar el TGF β latente de la matriz (ver apartado 1.1.3); y también conectan a la célula con otras células a través de uniones de adherencia de tipo N-cadherina establecidas *de novo* (18). Además, los protomiofibroblastos expresan y organizan la fibronectina celular, incluida la variante Fn-EDA, cuya expresión aumenta gracias a la acción de TGF β . Ambos factores, en presencia de estrés mecánico, promueven la modulación de los protomiofibroblastos a miofibroblastos diferenciados (18,22). Estos miofibroblastos diferenciados se caracterizan por la expresión *de novo* de α SMA en las fibras de estrés (además de las actinas F, β , γ , vimentina y desmina) lo que le confiere al miofibroblasto una actividad contráctil al menos dos veces más fuerte en comparación con la del fibroblasto negativo para α SMA (25). Estas fibras de estrés α SMA⁺ se conectan con la MEC mediante uniones focales supermaduras, y permiten la interacción célula-célula mediante las uniones adherentes (Figura 3).

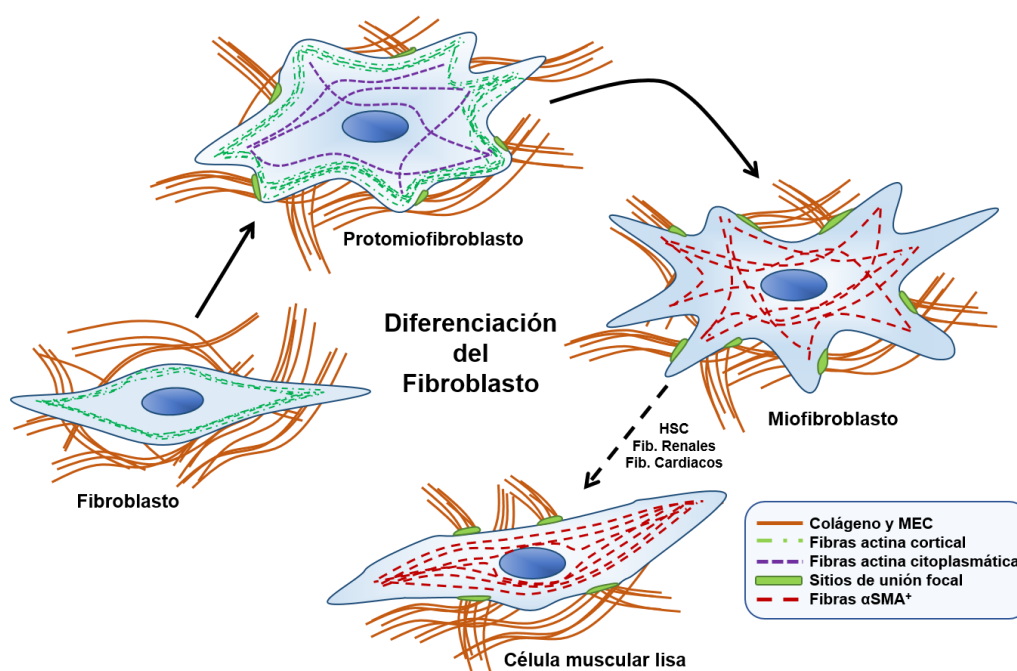


Figura 3. Proceso de transdiferenciación del fibroblasto a miofibroblasto

El proceso de diferenciación de los miofibroblastos sigue dos etapas, en la cual primero se obtiene un fenotipo celular intermedio, el protomiofibroblasto, caracterizado por fibras de estrés celular α SMA⁻ que se conectan a proteínas de la MEC por medio uniones focales maduras, y otras células por medio de uniones adherentes. Posteriormente, el protomiofibroblasto se diferencia a miofibroblasto maduro, que presenta una mayor capacidad contráctil gracias a las fibras de estrés α SMA⁺, uniones focales supermaduras y uniones células-célula que les permite actuar como una unidad contráctil. Otras células como las células estrelladas hepáticas, los fibroblastos renales y cardiacos continúan el proceso de diferenciación y terminan convirtiéndose finalmente en células musculares lisas.

Los mecanismos moleculares por los cuales se activan los fibroblastos y se diferencian a miofibroblastos son muy complejos, pero incluyen a quinasas como las MAPKs AKT, p38, ERK; y la vía de señalización activada por TGF β de las proteínas SMAD (2,3,14,17). Debido a la especial importancia de fibroblastos y miofibroblastos en el depósito de componentes de la MEC,

y la contracción de la herida (por parte de los miofibroblastos), estas células efectoras fibrogénicas constituyen la principal fuente celular de fibrosis, por lo que su estudio y comprensión es fundamental para poder afrontar el proceso fibrótico.

Células especializadas implicadas en fibrosis

En algunos órganos, hay células residentes especializadas, y localizadas en una región concreta del órgano, que contribuyen al exceso de matriz durante la fibrogénesis. Entre estas células se encuentran, por ejemplo, las células estrelladas hepáticas o HSC. Se trata de células perisinusoidales residentes, que conservan características de los fibroblastos, distribuidas por todo el hígado. Comprenden aproximadamente un tercio de las células no parenquimales y el 15% del total de las células residentes en el hígado humano normal (19). En el hígado adulto normal, su principal característica es la presencia de gotitas perinucleares citoplasmáticas cargadas con ésteres de retinilo (vitamina A). Estas células participan en el almacenamiento de retinoides, la vasorregulación a través de las interacciones de las células endoteliales, la homeostasis de la MEC, la desintoxicación de fármacos, la inmunotolerancia y, posiblemente, la preservación de hepatocitos por medio de la secreción de mitógenos. Durante la lesión hepática, las HSC se activan y diferencian a miofibroblastos contráctiles α SMA⁺ con propiedades transcripcionales y secretoras profibrogénicas, y van perdiendo su capacidad de almacenamiento de retinoides.

Otras células implicadas en el proceso de fibrosis

Pese a que las células principales asociadas al proceso de fibrosis son los fibroblastos y miofibroblastos, existen otros tipos celulares que pueden participar en el proceso fibrótico a diferentes niveles. Así, encontramos las MSC derivadas de la médula ósea, que tienen la capacidad de introducirse en distintos órganos y dar lugar a fibroblastos, con capacidad de diferenciarse a miofibroblastos para curar heridas. Además de las MSC derivadas de la médula ósea, hay MSC locales que residen en el nicho perivascular de muchos órganos como los pulmones, el riñón o el hígado, capaces de diferenciarse constituyendo fibroblastos (18).

Por su parte, las células endoteliales, epiteliales y mesoteliales también pueden participar en el proceso fibrótico diferenciándose en progenitores de miofibroblastos, por medio de procesos de transición epitelial-mesenquimal, transición endotelial-mesenquimal y transición mesotelial-mesenquimal, respectivamente (12).

Otro tipo celular implicado en fibrosis son los pericitos, células multipotentes que se presentan junto a las células endoteliales, participando en la regulación del flujo sanguíneo capilar, el aclaramiento fagocítico de los desechos celulares y la formación de la barrera hematoencefálica. Expresan α SMA, pero no están diferenciados terminalmente y pueden transitar hacia fibroblastos, osteoblastos y células musculares lisas (17). También las células musculares lisas de la vasculatura, las cuales expresan α SMA, pueden activarse en respuesta a la lesión y proliferar, migrar y expresar diferentes proteínas de la MEC.

Finalmente, los fibrocitos, células de origen mesenquimatoso, también pueden ingresar en diversos órganos lesionados junto con las células inflamatorias y adquirir un fenotipo miofibroblástico, expresando componentes de la MEC (12).

1.1.3 Componentes moleculares implicados en fibrosis

Factores de crecimiento (TGF β , PDGF, CTGF), citoquinas (IL1, IL4, IL6, IL13, TNF α), quimioquinas (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8), integrinas (α v β 3, α v β 5, α v β 6, α 11 β 1), lípidos bioactivos (prostaglandina F, ácido lisofosfatídico) y otras moléculas (angiotensina II, fibronectina, endotelina-1, VEGF) se encargan de regular la acumulación de MEC y la función de las células mesenquimales, tales como los fibroblastos. Muchas de estas moléculas muestran una expresión o actividad aberrante en enfermedades asociadas a fibrosis, contribuyendo a su patología. Esto los convierte en potenciales biomarcadores y objetivos terapéuticos (26). A continuación, detallaremos los principales componentes moleculares implicados en los procesos de fibrosis.

Factor de crecimiento transformante β (TGF β)

La superfamilia del factor de crecimiento transformante β está compuesta por un gran grupo de proteínas que comprende varios factores de crecimiento, los cuales ocupan un lugar destacado en el desarrollo y la homeostasis de la mayoría de los tejidos humanos. Dentro de esta superfamilia está la subfamilia TGF β , constituida por tres isoformas distintas, las cuales regulan muchas funciones, tales como la homeostasis, el crecimiento, el desarrollo y diferenciación celular o la regulación del sistema inmunológico (27). De las tres, TGF β 1 es la isoforma más abundante y ubicua, siendo producido por una amplia variedad de tipos celulares, incluidas células del sistema inmunológico como los macrófagos y los neutrófilos, células epiteliales activadas, células endoteliales, fibroblastos y miofibroblastos (28). Juega un papel en el crecimiento y la diferenciación de los tejidos. TGF β 2 es expresado por neuronas y células astrogiales en el sistema nervioso embrionario regulando su proliferación. Finalmente, TGF β 3, presenta una función esencial en la morfogénesis normal del paladar y el pulmón, y en la interacción epitelial-mesenquimal. TGF β 1 y TGF β 2 comparten una similitud de secuencia aminoacídica del 71%; mientras que TGF β 3 comparte el 80% de la misma con TGF β 1 y TGF β 2 (27,29). Debido a diferencias en el promotor de las distintas isoformas, la regulación transcripcional es la responsable de que, en respuesta a daño y enfermedad, se exprese la isoforma 1; mientras que las isoformas 2 y 3 se expresan en procesos fisiológicos como pueden ser el control hormonal y el desarrollo (30).

En cuanto a su síntesis, TGF β se genera una pre-pro-proteína con una secuencia señal (del inglés *Signal Peptide*, SP) en el dominio carboxilo-terminal y con largos dominios amino-terminales de latencia denominados LAP (del inglés *Latency associated proteins*). Esta región LAP es necesaria para que se produzca el correcto plegamiento y la dimerización de los péptidos maduros por los dominios carboxilos-terminales, generando homo o heterodímeros de TGF β . Para ello, primero se escinde la región SP y, tras la dimerización, se escinden las regiones LAP. Estas secuencias LAP escindidas continúan interaccionando mediante uniones no covalentes con el dímero de TGF β , lo que da lugar al “Pequeño complejo covalente”. Este sale al espacio extracelular, donde interacciona de forma no covalente con proteínas de unión al TGF β latente (del inglés *Latent TGF β Binding Protein*, LTBP), dando lugar al “Gran complejo covalente” (27,30,31). LTBP se une a LAP mediante un puente disulfuro (30) (Figura 4). LTBP se trata de

una glucoproteína de 120-240 kDa compuesta, por dominios ricos en cisteína, la cual participa en la regulación de la biodisponibilidad latente de TGF β mediante su interacción con la MEC (27).

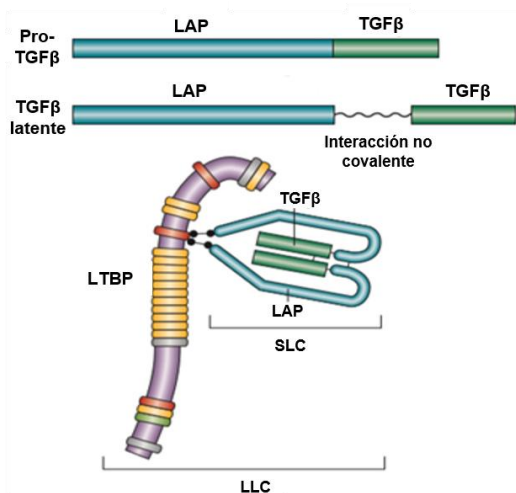


Figura 4. Maduración de TGF β desde la forma pro-TGF β hasta la forma de TGF β latente

En azul se indica la molécula de latencia LAP y en verde la de TGF β . Además, se muestra la formación del Pequeño complejo covalente (del inglés *Small Latent Complex*, SLC) y su interacción con la proteína de unión al TGF β latente para formar el Gran complejo covalente (del inglés *Large Latent Complex*, LLC) (adaptada de (31))

Así, TGF β se produce como un péptido dímérico inactivo de unos 25 KDa, compuesto por dos monómeros estabilizados por interacciones hidrofóbicas y un puente disulfuro, que se secreta en el espacio extracelular como un gran complejo latente (26,29). Existen una gran variedad de moléculas implicadas en la activación de TGF β , entre las que se encuentran proteasas, la trombospondina-1, las integrinas o ROS (27,29). Una vez activa, la molécula de TGF β puede señalar por medio de tres receptores específicos: T β RI y T β RII, que son receptores serina/treonina quinasas transductores de señales; y T β RIII constituido por el betaglicano y la endoglina, los cuales no son transductores de señales pues no presentan la región serina/treonina quinasa, pero pueden controlar el acceso de TGF β a los otros receptores y, en consecuencia, modular la actividad intracelular de TGF β (27,30,32). Existen varios tipos de receptores de tipo I (ALK1-ALK5), pero TGF β señala preferentemente a través de ALK5 (32).

Los receptores T β RI y T β RII se encuentran formando homodímeros por medio de interacciones hidrofóbicas y, en la mayoría de los casos, por un enlace disulfuro entre las subunidades. En la señalización de TGF β , inicialmente, un dímero de TGF β activo interactúa con un dímero de T β RII. Esto induce una serie de cambios conformacionales en el receptor que dan lugar a la fosforilación de los residuos serina/treonina de T β RI, lo que provoca la incorporación de T β RI al complejo, generando el gran complejo 2TGF β -2T β RII-2T β RI y desencadenando la señalización intracelular (27,30,33). Las vías de señalización de TGF β se clasifican en dos tipos, en función de las moléculas implicadas: la vía canónica y las vías no canónicas. La vía canónica se activa directamente por la interacción de TGF β con sus receptores, y la señalización tiene lugar por proteínas SMADs. Estas proteínas son factores de transcripción que se encuentran latentes en el citoplasma y que se activan por fosforilación de sus dominios de serina. Pueden ser clasificadas en tres grupos basados en sus funciones: 1) SMADs reguladas por receptores (R-SMADs) que incluyen SMAD 1, SMAD 2, SMAD 3, SMAD 5 y SMAD 8. De todas ellas, SMAD 2 y SMAD 3 se activan por los receptores de TGF β y pueden actuar formando un dímero, mientras que el resto de proteínas SMADs se activan por medio de otros receptores de la superfamilia TGF β ; 2) SMAD común (Co-SMAD), que se corresponde con SMAD 4. Esta SMAD 4 forma complejos oligoméricos con las R-SMADs y parece que son fundamentales para su actividad en el núcleo; y 3) SMADs inhibitorias (I-SMADs) en las que se incluyen SMAD 6 y SMAD 7. Estas últimas inhiben la señalización de TGF β , evitando la activación de las R-SMADs y las Co-SMADs (26,30,33). En la señalización canónica, una vez formado el complejo 2TGF β -

2TβRII-2TβRI, TβRI recluta y fosforila los dominios de serina de las proteínas R-SMADs, lo que da lugar a la activación del dímero SMAD 2/3. Este complejo fosforilado interactúa y se une a SMAD 4, formando un complejo de mayor tamaño que viaja al núcleo. Cada combinación de monómeros de SMAD se dirige a un subconjunto particular de genes y recluta co-activadores o co-represores transcripcionales propios (26,27,34). Además, los cofactores de SMAD difieren entre los distintos tipos de células, determinando así las respuestas dependientes del tipo celular. Por otro lado, TGFβ puede activar otras vías de señalización, dando lugar a las vías no canónicas. Estas incluyen vías de las MAPKs como ERK 1/2, AKT, p38 o JNK; la señalización NF-κβ; o la vía Wnt/β-catenina, entre otras (27) (Figura 5).

En cuanto a su papel en fibrosis, las isoformas de TGFβ, y en especial TGFβ1, juegan una función central en las vías de señalización de la patogénesis fibrótica, tales como la fibrosis cutánea, la fibrosis pulmonar, la fibrosis renal o la fibrosis hepática, constituyendo la molécula principal reguladora de los procesos fibróticos. Así, se ha observado que TGFβ promueve la síntesis, secreción, procesamiento y reticulación del colágeno, así como la secreción de otras moléculas de la MEC como la fibronectina y la trombospondina-1. TGFβ también ejerce acciones de preservación de la matriz al suprimir la actividad de las MMPs y al inducir la síntesis de inhibidores de las proteasas, como los TIMPs (34,35).

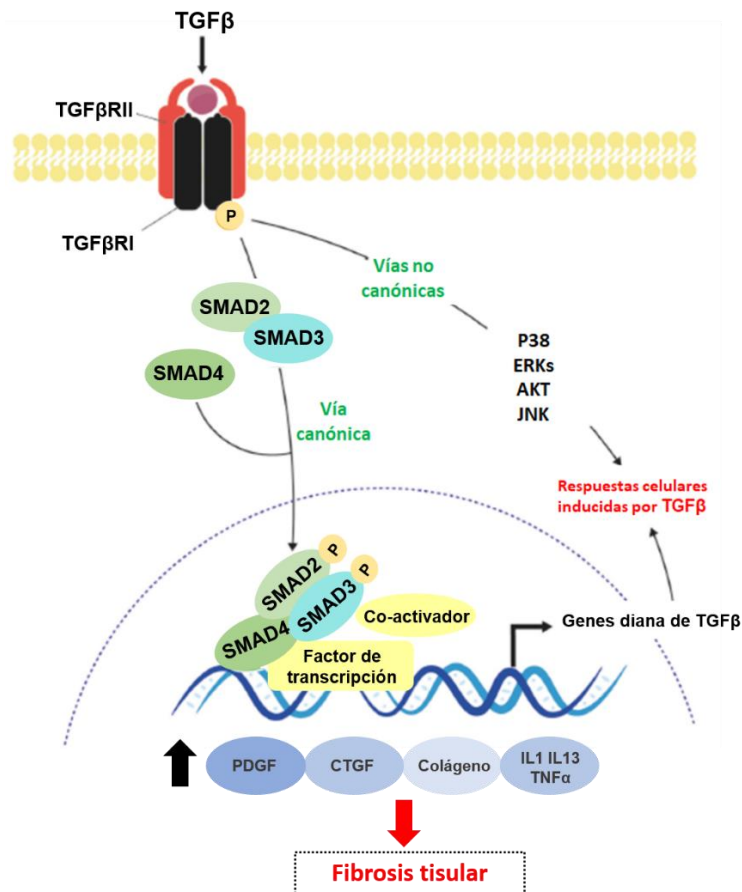


Figura 5. Vías de señalización de TGFβ

La unión de TGFβ1 a sus receptores principalmente activa dos rutas de señalización: la vía clásica o canónica, controlada por las proteínas de la familia SMAD, y la vía no canónica SMAD-independiente, en la que participan MAPKs como p38, ERK, AKT o JNK. La activación de estas vías induce la expresión de moléculas implicadas en el desarrollo y progresión del proceso fibrótico, incluyendo PDGF, CTGF, componentes de la MEC (ej. colágenos) o citoquinas profibróticas (ej. IL1, IL13 o TNFα) (adaptada de (32)).

Uno de los aspectos importantes de la acción de TGF β es la estimulación de otros mediadores que tienen potencial fibrogénico (Figura 5). Estos incluyen, entre otros, CTGF, PDGF y los ligandos del factor de crecimiento epidérmico (del inglés *Epidermal Growth Factor*, EGF). Además, también estimula la expresión de una serie de citoquinas como TNF α , IL1 β o IL13 (28,29).

Se ha observado que los niveles de TGF β se encuentran incrementados en ambientes fibróticos, lo que pone de manifiesto su papel en los procesos de fibrosis. Por ejemplo, se ha detectado que la expresión de las tres isoformas de TGF β aumentan en la piel de pacientes con esclerodermia (31). En un estudio *in vitro*, se mostró que las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con esclerodermia secretan espontáneamente altos niveles de TGF β activo (31,36). Por otro lado, se ha observado que TGF β 1 promueve la fibrosis renal. Así, TGF β 1 puede actuar sobre células mesangiales y fibroblastos renales directamente para inducir la proliferación celular, la migración, la activación y la transcripción de moléculas profibróticas (29).

Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que las tres isoformas de TGF β , en concreto TGF β 1 son potentes inductores de miofibroblastos y de efectos celulares profibróticos. Tras la estimulación de TGF β , las células se activan y experimentan una transición fenotípica a miofibroblastos. La síntesis de α SMA inducida por TGF β requiere SMAD 3, pero también implica las vías de las quinasas FAK, JNK, TAK y AKT (34,37). Por otro lado, la activación de las rutas de las MAPKs ERK 1/2, p38 y AKT, entre otras, pueden estar involucradas en la EMT inducida por TGF β (28,29,34), además de la señalización por medio de SMAD 3 (29). Así, Willis y colaboradores mostraron mediante el uso de células epiteliales alveolares tipo II *in vitro* que TGF β 1 inducía la EMT de las células a fibroblastos (28). Por su parte, la transición fenotípica de las células endoteliales a fibroblastos requiere de señalización TGF β /SMAD (29,34).

Factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF)

El factor de crecimiento de tejido conectivo o CTGF, también conocido como CCN2 (del inglés *Cellular Communication Network factor 2*), es uno de los miembros mejor estudiados de la familia CCN, una familia de proteínas reguladoras de la MEC, involucrada en el control de una variedad de funciones biológicas importantes, que incluyen la proliferación celular, la diferenciación, la adhesión y la angiogénesis (38).

CTGF se expresa de forma abundante durante la etapa embrionaria, pero dicha expresión se encuentra bastante limitada durante la edad adulta. Su expresión es inducida por estímulos tales como factores de crecimiento (entre los que destaca TGF β), citoquinas, hormonas, mitógenos, luz ultravioleta, privación de oxígeno y estrés mecánico. Una vez sintetizado, CTGF se encuentra como una proteína soluble secretada en la MEC de 36-38 kDa, cuyas funciones biológicas son reguladoras, y pueden dividirse en cuatro grupos: 1) unirse a receptores específicos para iniciar la transducción de señales; 2) unirse a las citoquinas, mediando su unión a los receptores de la superficie celular e iniciando vías de señalización; 3) mediar el recambio de la MEC; y 4) favorecer la regulación de la actividad de las citoquinas y los factores de crecimiento (38).

CTGF es uno de los principales reguladores de los eventos moleculares que ocurren en el espectro de las respuestas fibróticas normales y patológicas. De hecho, regula múltiples comportamientos de fibroblastos que contribuyen al desarrollo de fibrosis, incluida la adhesión y migración, la proliferación y diferenciación, y la producción de MEC. Además, se sabe que la

inducción de CTGF está regulada por varias moléculas profibróticas como TGF β 1, angiotensina II y endotelina (39).

Por otro lado, se ha demostrado que CTGF se expresa altamente en diversas afecciones fibróticas. Así, en un estudio se encontraron niveles elevados de CTGF en el suero de pacientes con esclerosis sistémica. Esos niveles se correlacionaron también con la progresión de la patología (40). Además, la administración del anticuerpo IgG FG-3019 frente a CTGF en un modelo murino de esclerosis sistémica mejoró significativamente la fibrosis. De hecho, los animales con deficiencia de CTGF tienen menos miofibroblastos y depósito de MEC, lo que indica que CTGF es necesario para la inducción de fibrosis en estos animales (41). En un modelo murino de fibrosis peritoneal en el que se empleó el mismo anticuerpo frente a CTGF se descubrió que mejoraba la fibrosis mediante la inhibición de la proliferación de fibroblastos dependiente de CTGF, la diferenciación de miofibroblastos y la angiogénesis (39). El papel de CTGF en los fibroblastos asociados a esclerodermia depende de TGF β y, juntos, ambos factores causan fibrosis persistente en modelos animales de esclerosis sistémica (42). TGF β induce la expresión de CTGF en fibroblastos a través de la vía de SMAD 3. Sin embargo, la sobreexpresión en los fibroblastos en esclerodermia es independiente de estas vías y depende de vías como ERK (43).

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

La familia de factores de crecimiento derivados de las plaquetas se encuentra formada por cuatro polipéptidos distintos (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C y PDGF-D) que forman homo o heterodímeros unidos por un puente disulfuro (44). Las isoformas de PDGF son secretadas por multitud de células entre las que se incluyen las plaquetas, los macrófagos, las células endoteliales y los fibroblastos (11). Los dímeros de PDGF ejercen sus acciones por medio de su interacción con los receptores PDGFR, los cuales se encuentran formados por dos subunidades diferentes (α y β) que pueden formar homo y heterodímeros. De manera que la interacción con los ligandos de PDGF, provoca la dimerización del receptor y su autofosforilación en residuos específicos de tirosina del dominio citoplasmático (44). Esta activación de los receptores inicia múltiples rutas que incluyen a distintas quinasas como las de las rutas de las MAPKs AKT y ERK, quinasas de la familia Src y la fosfolipasa C γ (PLC γ), lo que da como resultado respuestas celulares importantes que incluyen proliferación, quimiotaxis y reorganización de actina (37).

PDGF se encuentra involucrado en procesos fibróticos que afectan a múltiples órganos, incluyendo fibrosis cutánea, pulmonar, renal y hepática. Así, en etapas iniciales de fibrosis, PDGF promueve la proliferación y/o el reclutamiento de fibroblastos, pericitos y otros tipos celulares implicados en fibrosis (45–47). Mientras que en etapas posteriores, estimula la producción de colágeno, ROS, fibronectina y proteoglicanos, TGF β 1, CCL2 e IL6, entre otras moléculas (11,47). De hecho, los fibroblastos pueden considerarse tanto una fuente principal del factor de crecimiento como una diana del mismo, ya que secretan PDGF-A y también expresan PDGFR α en su superficie celular, actuando así de forma autocrina y paracrina. Por su parte, PDGF-B es liberado principalmente por macrófagos y células estrelladas hepáticas, lo que sugiere un papel importante de su señalización en la fibrosis hepática (37). Por otro lado, se ha observado que la expresión de ligandos y receptores de PDGF aumenta en la glomerulonefritis humana y en la fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina (48). Además, se ha observado que la inhibición de los receptores de PDGF atenúa la fibrosis. Así en un modelo murino de fibrosis pulmonar se produjo una reducción significativa del desarrollo de la fibrosis al inhibir el receptor PDGF (49). Por el contrario, ratones transgénicos que expresan un receptor α de PDGF constitutivamente

activo desarrollan fibrosis progresiva en la piel y múltiples órganos. Además, los fibroblastos cutáneos obtenidos de pacientes con esclerodermia presentan una expresión elevada de PDGF y de su receptor β . En esos mismos pacientes, los niveles del factor de crecimiento también se encontraban aumentados en el líquido broncoalveolar (11).

Proteína Morfogénica Ósea (BMP)

Las proteínas morfogénicas óseas (del inglés *Bone Morphogenetic Protein*, BMP) son proteínas miembros de la superfamilia de factores de crecimiento TGF β . Las BMP se unen a sus receptores específicos asociados a la membrana (BMPR), lo que induce a la fosforilación del receptor tipo I favoreciendo la activación y fosforilación de las proteínas SMAD 1, SMAD 5 y SMAD 8. Estas forman complejos con SMAD 4 y se translocan al núcleo para inducir la transcripción génica.

Se ha observado que algunas BMP pueden participar en la patogénesis de la fibrosis, aunque varias ejercen efectos antifibróticos. Parece que los efectos antifibróticos están relacionados con la inducción de la expresión de las proteínas SMAD 6 y SMAD 7, de actividad inhibitoria. Además, BMP-7 bloquea la activación de las vías no canónicas de TGF β y favorece la actividad de las MMPs, favoreciendo así el recambio de la MEC (37). Pese a este papel antifibrótico, hay estudios que sugieren también un papel profibrótico de miembros de las BMP. En este sentido, parece que BMP-9 puede estimular la producción de ciertas proteínas implicadas en la fibrosis hepática (50).

Angiotensina II

La Angiotensina II (AngII) ha sido reconocida durante mucho tiempo como el principal mediador vasoactivo del sistema renina-angiotensina (del inglés *Renin-Angiotensin System*, RAS). Este sistema funciona de tal manera que, al disminuir la perfusión renal se produce la liberación de renina por parte de las células yuxtglomerulares del riñón. Esta enzima corta a la molécula de angiotensinógeno producido en el hígado en angiotensina I la cual, posteriormente, se convierte en angiotensina II mediante la acción de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) en el pulmón (51). AngII actúa a través de dos receptores específicos, el receptor de angiotensina 1 (AT1) y el receptor de angiotensina 2 (AT2). AT1 regula la presión arterial, la homeostasis del sodio y el agua, la proliferación celular y la producción de citoquinas y proteínas de la MEC. AT2 también regula el control de la presión arterial, la natriuresis renal, favorece la inhibición del crecimiento celular y la infiltración de células inflamatorias renales (52).

Aunque siempre se ha pensado que la AngII actuaba como una hormona circulante, ahora se sabe que existe un RAS tisular local en casi todos los órganos y tejidos, incluido el corazón, los vasos sanguíneos, el hígado y la piel. Estos RAS tisulares son sistemas funcionalmente autónomos que han demostrado desempeñar un papel importante en el desarrollo de la fibrosis (51). Así, los estudios han demostrado que los receptores AT1 y AT2 están regulados al alza después de la lesión. La activación de AT1 estimula el reclutamiento de células inflamatorias, la angiogénesis, la proliferación celular y la acumulación de MEC (51,52). Además, se cree que la AngII es producida localmente por macrófagos y fibroblastos activados y que ejerce sus efectos al inducir la actividad oxidasa de NADPH, estimular la producción de TGF β 1, desencadenar la proliferación y la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos secretores de colágeno.

Además, la AngII también mejora la señalización de TGF β 1 al aumentar los niveles de SMAD 2 y al aumentar la translocación nuclear de SMAD 3 fosforilada (1). Para que la AngII pueda ejercer sus efectos por medio de AT1, se activan diferentes rutas de señalización entre las que se incluyen la ruta de la PKC y las vías MAPKs, como ERK, p38 y JNK (53).

Sin embargo, los mecanismos responsables de los efectos regenerativos asociados con AT2 siguen sin estar claros en la actualidad, aunque existe evidencia de que la activación de AT2 da como resultado la atenuación de las cascadas de señalización de TGF β 1 (51). Esto está relacionado con la inhibición de las rutas de las MAPKs, la activación de proteínas fosfatasas y la producción de ceramida (53).

Por otro lado, también se ha observado que el RAS está vinculado a la inducción del Inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) lo que inactiva, a su vez, al plasminógeno y lleva a una acumulación excesiva de componentes de la MEC (53).

Citoquinas involucradas en el proceso de fibrosis

Existe una gran cantidad de evidencia de que las citoquinas inflamatorias juegan un papel importante en la fibrosis. Entre las distintas citoquinas que se liberan y participan en el proceso fibrótico, podemos destacar las siguientes:

▪**IL1 α e IL1 β** : son citoquinas que ejercen potentes propiedades inflamatorias. Ambas moléculas pueden inducir un fenotipo profibrótico mediante la inducción de la secreción de PDGF, la proliferación de fibroblastos y la síntesis de componentes de la MEC (48). Así, por ejemplo, en un modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina, se observó que la IL1 β inducía la expresión de osteopontina, una proteína de la matriz, en fibroblastos pulmonares favoreciendo el depósito de componentes de la MEC y la fibrosis del tejido (54).

▪**IL4**: aunque el grado en el que la IL4 participa en la fibrosis varía en diferentes enfermedades, se considera un potente mediador profibrótico. De hecho, se han encontrado muchas evidencias en este sentido. Así, se ha visto que la IL4 estimula la proliferación de fibroblastos, la quimiotaxis, la síntesis de colágeno y la producción de TGF β , CTGF y TIMP (11). Además, se ha encontrado que IL4 se presenta en el suero de pacientes con esclerosis sistémica, en los cuales el número de linfocitos T productores de IL4 aumenta en la sangre periférica y la piel (55). Además, los receptores para IL4 se encuentran en muchos subtipos de fibroblastos de ratón y humanos. Por otro lado, la inhibición de IL4 da lugar a una reducción de la fibrosis dérmica en un modelo murino de esclerodermia (1).

▪**IL5**: esta citoquina también puede promover la fibrosis al reclutar eosinófilos, los cuales son una importante fuente de citoquinas fibrogénicas, incluidas TGF β 1, PDGF e IL13. De hecho, la IL5 y los eosinófilos tisulares se han observado en una variedad de enfermedades asociadas a fibrosis. La inhibición de IL5 mediante un anticuerpo neutralizante anti-IL5 ha dado lugar a la reducción de la fibrosis en un modelo de fibrosis pulmonar. Parece que la IL5 y su efecto sobre los eosinófilos podría tener un papel de amplificador de la fibrosis en vez de actuar como mediador directo (1,56).

▪**IL6**: la IL6 es producida por monocitos, linfocitos T, fibroblastos y células endoteliales. Se ha observado que IL6 participa en la fibrogénesis estimulando la producción de colágeno. De

hecho, se ha encontrado que los niveles séricos de esta citoquina están elevados en la esclerodermia y se correlacionan con la gravedad de la patología (11).

▪**IL13:** la IL13 comparte muchas actividades funcionales con la IL4 debido a que ambas citoquinas usan el mismo transductor de señal de la cadena α del receptor de IL4 (IL4R α) y la vía de señalización STAT6 (57). Sin embargo, la IL13 se ha identificado como la citoquina efectora dominante de la fibrosis en varios modelos experimentales de fibrosis (10). Así, en la esquistosomiasis, con el bloqueo de IL13, el depósito de colágeno disminuyó en más del 85%, a pesar de la producción continua y no disminuida de IL4 (57). Los efectos profibróticos de IL13 implican mecanismos basados en la estimulación de la producción de TGF β por los macrófagos, así como la estimulación directa de la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno (11)

▪**Otras interleuquinas:** la IL21, producida por las células T, favorece el desarrollo de respuestas TH2, ya que aumenta la expresión del receptor de la IL4 e IL13 en los macrófagos (1). Por otro lado, la IL25 y la IL33 también parecen jugar un papel en la inducción y/o amplificación de la inmunidad tipo 2 (48).

▪**TNF α :** el factor de necrosis tumoral α es de una citoquina que es producida por macrófagos y linfocitos activados, células epiteliales y células endoteliales. Actúa sobre células mononucleares, neutrófilos y células endoteliales estimulando la producción de factores de crecimiento, como TGF β , PDGF o el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; citoquinas profibróticas como IL1 o IL6; y quimioquinas como CXCL8 y CCL2 (48). Su papel en fibrosis quedó patente al demostrar en un modelo de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina que los niveles de TNF α aumentaron, y que los ratones *knockout* para el receptor de TNF α no lograron desarrollar la fibrosis (1,58).

▪**IFN-I:** los interferones tipo I (IFN-I) incluyen interferones α (IFN α) y β (IFN β). Son citoquinas inmunomoduladoras, cuyo papel en fibrosis no está claro. En general, se cree que los interferones actúan como inhibidores potentes de las respuestas fibróticas (59). Se cree que IFN γ inhibe la fibrosis, al menos en parte, al antagonizar la actividad profibrótica de TGF β 1. IFN γ inhibe la fosforilación inducida por TGF β de SMAD 3 y la activación posterior de genes que responden a TGF β , así como proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno en los miofibroblastos activados. Además, en esclerodermia se ha observado un aumento de la expresión de IFN-I, así como de genes regulados por esta citoquina. Sin embargo, no está claro si la señalización elevada de IFN-I en esclerodermia contribuye a la fibrosis o en cambio representa un intento de limitar la lesión y atenuar la fibrosis (59).

Quimioquinas involucradas en el proceso de fibrosis

Las quimioquinas pueden dividirse en dos grandes grupos: el grupo de quimioquinas CXC y el de quimioquinas CC, los cuales se describen a continuación:

▪**Quimioquinas CXC:** son proteínas de unión a heparina estructuralmente caracterizadas por un motivo CXC común (motivos formados por residuos de cisteína, C, separados por un aminoácido, X) y por la presencia/ausencia del motivo ERL (aminoácidos Glutámico-Arginina-Leucina, E-R-L), que dicta su actividad angiogénica. De manera que aquellas quimioquinas que presentan el motivo ERL tienen actividad angiogénica, actividad que ejercen por medio del receptor CXCR2. Entre estas quimioquinas se encuentran IL8/CXCL8 y la proteína epitelial

activadora de neutrófilos-78 (ENA-78/CXCL5). Por el lado contrario, las quimioquinas que no tienen el motivo ERL y que, por tanto, presentan efectos angiostáticas son la menorquina inducida por IFN γ (MIG/CXCL9), la proteína inducible por IFN γ (IP-10/CXCL10) y el quimioatrayente de células T inducible por IFN γ (I-TAC/CXCL11). Estas quimioquinas ejercen sus efectos por medio del receptor CXCR3 (48). El desequilibrio entre ambos grupos se encuentra relacionado con alteraciones observadas en procesos fibróticos. Así, por ejemplo, en pacientes con fibrosis pulmonar se ha observado que los niveles de las quimioquinas angiogénicas (IL8/CXCL8 y ENA-78/CXCL5) se encuentran elevados, mientras que los de quimioquinas angiostáticas (IP-10/CXCL10) se encuentran significativamente reducidos en comparación con individuos sanos (60).

▪**Quimioquinas CC:** este grupo de quimioquinas incluye a la proteína quimiotácticas de monocitos-1 (MCP-1/CCL2), la proteína inflamatoria de macrófagos-1 α (MIP-1 α /CCL3), RANTES (CCL5), la quimioquina reguladora de la actividad del pulmón (PARK /CCL18) y la quimioquina derivada de macrófagos (MDC/CCL22), entre otras. Se trata de moléculas responsables del reclutamiento de monocitos, que son secretadas por distintos tipos celulares como linfocitos, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales. Se ha visto que la sobreexpresión de estas proteínas puede tener efectos patológicos en patologías asociadas a fibrosis. Así, se ha observado que la expresión de CCL2 y CCL3 se encuentra incrementada en el lavado broncoalveolar (del inglés *BronchoAlveolar Lavage*, BAL) de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (48).

Así, las quimioquinas sobreexpresadas en pacientes con esclerodermia o en modelos animales de esclerodermia incluyen CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8, CCL3, CCL5 y CCL18, entre otras (11).

Propiedades mecánicas de la MEC e integrinas involucradas en el proceso de fibrosis

La morfología y función de los fibroblastos está muy influenciada por la interacción con la MEC y los cambios que se producen en la misma. Los mecanismos por los cuales los cambios en la rigidez de la MEC son reconocidos por los fibroblastos residentes no se conocen bien pero se ha propuesto que la quinasa de adhesión focal (del inglés *Focal Adhesion Kinase*, FAK) o la proteína quinasa asociada a Rho (del inglés *Rho-associated protein kinase*, ROCK) y los cambios en la tensión del citoesqueleto pueden ser responsables (11).

Por su parte, la interacción de los fibroblastos con la MEC también se encuentra mediada por las integrinas de la superficie celular, involucradas en la localización de factores de crecimiento y en la regulación de su actividad (59). Cada vez hay más estudios centrados en la formación de los miofibroblastos dependiente de la activación de TGF β latente mediada por las integrinas de la superficie celular de los fibroblastos estresados biomecánicamente. Así, entre las diferentes integrinas asociadas al proceso de fibrosis destacan:

▪**Integrinas de la subclase α v (α v β 3, α v β 5 y α v β 6):** estas proteínas median la unión a motivos RGD (aminoácidos Arginina-Glicina-Aspártico, R-G-D) de moléculas de la MEC, entre las que destaca TGF β . De manera que estas integrinas activan a la molécula latente de TGF β , a través su interacción con los motivos RGD de LAP. Se ha descrito que esto puede ocurrir por medio de dos posibles mecanismos. Por un lado, la interacción con RGD provocaría un cambio conformacional del complejo latente LAP-TGF β , favoreciendo la liberación de TGF β y su

activación. Por otro lado, la activación de TGF β puede requerir de enzimas proteasas. En este caso, habría una acción simultánea de interacción de las integrinas con el dominio RGD y de actividad de enzimas proteasas (como MMP2 o MMP9) que escindirían a TGF β dando lugar a su forma activa (61,62).

En estudios recientes que han abordado el papel de la señalización de las integrinas en patologías asociadas a fibrosis se ha observado que las integrinas $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ y $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ están significativamente elevadas en los fibroblastos de pacientes con esclerodermia y pueden mediar la activación del TGF β latente (59,61).

▪ **Integrina de la subclase β1 , $\alpha\text{11}\beta\text{1}$:** la expresión de integrina $\alpha\text{11}\beta\text{1}$ está fuertemente regulada por el estrés mecánico en la MEC y se correlaciona positivamente con la formación de miofibroblastos, pues por medio del estrés mecánico se activa la señalización de TGF β , el cual induce mediante la vía canónica la expresión de la subunidad α11 de la integrina, así como de αSMA ; tras esto, la presencia de integrina $\alpha\text{11}\beta\text{1}$ estabiliza la expresión de la proteína αSMA . Además, la remodelación dinámica de las redes de colágeno por los fibroblastos depende fundamentalmente de la integrina $\alpha\text{11}\beta\text{1}$ *in vitro* e *in vivo* (61).

Enzimas proteolíticas implicadas en fibrosis

En un proceso normal de curación de la herida, a medida que la cicatriz madura, se produce la regulación y degradación proteolítica de la MEC con el fin de alcanzar la homeostasis tisular. Entre los sistemas de proteasas más importantes encargados de este proceso se encuentran la familia de las MMPs. Al final del proceso fibrótico, estas proteasas se encargan de degradar los colágenos I y III, escindir las quimioquinas y limitar la inflamación, favoreciendo la recuperación de la homeostasis tisular (47). Sin embargo, estas proteasas también están implicadas en la activación proteolítica de diversos factores profibróticos, como TGF β . Por tanto, como las distintas proteasas pueden tener diferentes impactos en la fibrosis, emplearlas como diana terapéutica resulta muy complejo. Un ejemplo lo encontramos en que en algunos estudios la disminución de la actividad de MMP2 y MMP9 se encuentra relacionada con la mejora en la fibrosis renal, mientras que en otros el mantenimiento de MMP9 es el relacionado con dicha mejora (46).

Otras moléculas implicadas en fibrosis

▪ **Fibronectina.** Las fibronectinas son un grupo de unas 20 glucoproteínas multifuncionales involucradas en una variedad de procesos fisiológicos que pueden encontrarse en el plasma formando dímeros o en la matriz extracelular formando fibrillas, donde interactúa con los componentes de la MEC y los receptores de la superficie celular. Una vez sintetizadas las distintas fibronectinas, se adiciona un dominio adicional, que completa la proteína final. Estos dominios adicionales pueden ser de dos tipos: dominio adicional-A (Fn-EDA) o -B (Fn-EDB) (47). El papel de las distintas isoformas no se comprende bien, pero se sabe que las fibronectinas que llevan el dominio EDA (Fn-EDA) están prácticamente ausentes en el tejido adulto normal, mientras que en condiciones patológicas Fn-EDA es abundante, siendo un componente estructural de la MEC. Además, Fn-EDA es crucial para la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos por acción de TGF β (24,47).

▪**Moléculas angiogénicas.** Se han visto implicadas en fibrosis diferentes moléculas con actividad angiogénica. Entre ellas se encuentra VEGF, un mitógeno altamente específico para las células endoteliales producido principalmente por ellas mismas, además de monocitos y fibroblastos, que promueve la proliferación de las células endoteliales en el sitio de la herida. Además, otras moléculas que están implicadas en la angiogénesis son el factor de crecimiento insulínico tipo 1 y el factor de crecimiento epidérmico, las cuales han demostrado mejorar la migración de las células epiteliales al sitio de la herida (47).

▪**Endotelina-1.** Se trata de un péptido con una potente actividad vasoconstrictora que puede aumentar la producción de moléculas de la MEC como el colágeno tipo I y III e inhibir la producción de MMP1 en fibroblastos humanos. De hecho, se han encontrado niveles aumentados de endotelina-1 en varias enfermedades fibróticas. Además, la endotelina-1 puede tener un papel potencial en la generación de miofibroblastos a través de EMT o EndoMT (37).

▪**Lípidos bioactivos.** Han surgido como potentes moduladores de la función de los fibroblastos y reguladores de la biosíntesis y la acumulación de la MEC. Aunque algunos prostanoides inhiben las respuestas fibróticas y la remodelación de los tejidos, se ha demostrado que la prostaglandina F está elevada en los pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar y es capaz de estimular la producción de colágeno y la proliferación de fibroblastos; por su parte, el ácido lisofosfatídico induce quimiotaxis de fibroblastos y la producción de CTGF (59).

▪**TLR.** Los receptores tipo Toll (del inglés *Toll-Like Receptor*, TLR) son proteínas transmembrana esenciales del sistema inmunológico innato que, además de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos microbianos, reconocen ligandos no microbianos llamados “patrones moleculares asociados al daño” (del inglés *Damage Associated Molecular Patterns*, DAMPs). Después de una lesión, se liberan pasivamente al espacio extracelular moléculas que normalmente son inaccesibles para el sistema inmunológico innato (como, por ejemplo, Fn-EDA) y que constituyen DAMPs para el TLR4. Así, el sistema inmunológico reconoce estos DAMPs y genera una respuesta inflamatoria y la consiguiente fibrosis (47,59).

▪**PPAR.** Los receptores activados por proliferador de peroxisomas (del inglés *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*, PPAR) son un conjunto de factores de transcripción activados por ligando implicados en diversos procesos fisiológicos, como la homeostasis de la glucosa, el metabolismo de los lípidos y las lipoproteínas, la proliferación y diferenciación celular y la apoptosis. Se han identificado diferentes isoformas de PPAR: PPAR α ; PPAR β/δ ; y PPAR γ del cual se pueden distinguir PPAR γ 1 y PPAR γ 2 (63). Existen evidencias que parecen indicar que estos factores pueden jugar un papel en la regulación de los procesos de fibrosis. Así, en un modelo murino de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina, los ratones *knockout* para PPAR α desarrollaron una fibrosis más exacerbada que los ratones *wild-type* (64). Además, el tratamiento de ratones *wild-type* con fibrosis pulmonar con agonistas de PPAR α y PPAR γ mejoró la supervivencia y redujo la fibrosis. De hecho, es posible que PPAR γ actúe en fibrosis oponiéndose a los efectos fibrogénicos de TGF β en cuanto a la diferenciación de los fibroblastos. Por otro lado, parece que las isoformas PPAR β/δ se ven incrementadas tras una lesión en la piel, mientras que animales *knockout* para ellas muestran un proceso una cicatrización de la herida defectuoso (63).

Vías de señalización implicadas en el desarrollo y su papel en fibrosis

Las vías de señalización Wnt/ β -catenina, Hedgehog y Notch son vías de señalización con funciones clave en el desarrollo embrionario y la organogénesis, que se encuentran altamente reguladas en la edad adulta. De manera que la reactivación de la señalización de estas vías en adultos generalmente se asocia con enfermedades, como cáncer y fibrosis (59).

Así, la señalización aberrante Wnt/ β -catenina está involucrada en varias patologías fibróticas, como la fibrosis pulmonar, renal, dérmica y hepática, entre otros. En estas patologías, se ha observado que Wnt/ β -catenina favorece diversos procesos profibróticos, incluida la activación de miofibroblastos (37,46).

Por su parte, en cuanto a la vía Hedgehog, se ha observado que TGF β aumenta la expresión de los mediadores de esta vía, lo que favorece a su vez, una potente estimulación de la transición de fibroblastos a miofibroblastos y de la producción de colágeno (65). Además, se ha comprobado que inhibidores de esta vía reducen la fibrosis y la inflamación experimentales (46).

Finalmente, se ha demostrado que la activación de la vía Notch en los procesos relacionados con patologías renales, se relacionan con la apoptosis de podocitos, la activación de fibroblastos y la inflamación renal (66). Y en un modelo de esclerodermia se detectó una señalización Notch marcadamente activada en la piel y los pulmones de los ratones (11).

1.2 Enfermedades crónicas asociadas a procesos de fibrosis

1.2.1 Aspectos generales de las patologías fibróticas

La fibrosis afecta a órganos diversos como pueden ser la piel, los pulmones, los riñones, el hígado o el corazón. Y, aunque el proceso central es común en todos ellos, existen rasgos característicos según el órgano en el que se desarrolla. Además, la fibrosis es un rasgo común de diversas patologías que incluyen: 1) enfermedades sistémicas, como son la esclerosis sistémica, la fibrosis sistémica nefrogénica o la enfermedad de injerto esclerodérmico contra huésped; y 2) trastornos específicos de órganos, como la fibrosis cutánea y pulmonar o las enfermedades fibróticas de causas quimioterapéuticas e inducidas por radiación (67) (Figura 6). Las enfermedades fibróticas constituyen un problema de salud importante en todo el mundo debido a la gran cantidad de individuos afectados (1,3,4). Pese a ello, el conocimiento incompleto del proceso fibrótico, la heterogeneidad de su etiología y manifestaciones clínicas y la falta actual de terapias efectivas dificultan su tratamiento e incrementan la gravedad de las patologías asociadas a fibrosis (37). A continuación, se describen algunas características del proceso fibrótico en diversos órganos y algunas de las patologías asociadas al mismo.

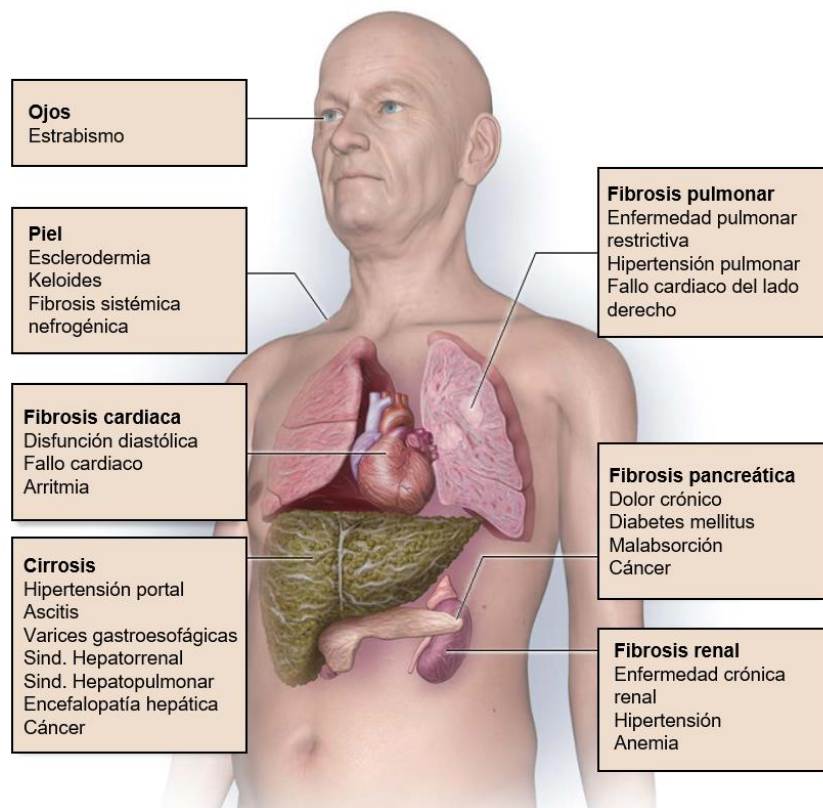


Figura 6. Enfermedades fibróticas más comunes

La fibrosis afecta a diversos órganos, lo cual da lugar al desarrollo de múltiples patologías, con consecuencias letales en la mayoría de las ocasiones (tomada de (6)).

Fibrosis pulmonar y patologías asociadas

Los pulmones están constantemente expuestos a múltiples lesiones, pero presentan una elevada capacidad de reparación y recuperación. Sin embargo, si un insulto o lesión se hace crónico, puede desembocar en un proceso de fibrosis pulmonar (68). La fibrosis pulmonar se trata de un proceso patológico altamente heterogéneo con pocas opciones terapéuticas y una alta tasa de mortalidad. Incluye un grupo heterogéneo de trastornos pulmonares caracterizados por la destrucción progresiva e irreversible de la arquitectura pulmonar que conduce, finalmente, al mal funcionamiento pulmonar, la interrupción del intercambio gaseoso y la muerte por insuficiencia respiratoria (7).

Aunque la fibrosis pulmonar puede asociarse a una amplia gama de enfermedades y factores ambientales, en la mayoría de los pacientes es idiopática y progresiva (6). Entre los factores de riesgo se incluyen las lesiones tóxicas, traumáticas, autoinmunes, lesiones inducidas por fármacos (como Bleomicina), infecciones virales crónicas, envejecimiento y factores genéticos (68–70). Entre ellos, la edad es el factor de riesgo demográfico más fuerte en la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), principal tipo de fibrosis pulmonar, y se estima que los factores genéticos explican hasta un tercio del riesgo individual inherente de la enfermedad (68).

Se cree que muchas formas de fibrosis pulmonar son inducidas, al menos inicialmente, por una fuerte respuesta inflamatoria (7). Sin embargo, la lesión de las células epiteliales alveolares se considera el evento clave para el inicio de la enfermedad. La superficie de los alvéolos, donde

tiene lugar el intercambio de gases, está cubierta principalmente por dos tipos de células epiteliales alveolares: 1) las células epiteliales alveolares tipo I (ATI), que cubren el 90% de la superficie de la vía aérea y cuya función principal es el intercambio de gases; y 2) las células epiteliales alveolares tipo II (ATII), las más abundantes, cuya función es mantener el espacio alveolar mediante la secreción de proteínas tensioactivas y otros componentes de la MEC. Es esa producción de surfactantes lo que permite que ocurra el intercambio gaseoso al disminuir la tensión superficial intra-alveolar (69,71). Además, son células progenitoras de las ATI. De manera que, la lesión de las ATII induce a su senescencia acelerada lo que se caracteriza por la liberación de gran cantidad de citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento y moléculas que median la comunicación célula-célula y modifican fuertemente el microambiente (68). Esto favorece la activación y reclutamiento de células inmunológicas con la consiguiente generación de una respuesta inflamatoria. Además, se induce la proliferación y activación de miofibroblastos, los cuales llevan a cabo el depósito continua de MEC en la membrana basal y la contracción del órgano (69). Este ambiente perpetúa, además, la cascada de apoptosis y proliferación de las células epiteliales mediante la liberación de moléculas tales como TGF β , AngII o ROS (69–71). Todo ello conduce a la panalización del parénquima alveolar y la reducción de la distensibilidad del pulmón limitando la función pulmonar. La fibrosis dificulta el intercambio de gases, generando una oxigenación anormal y disnea clínica (Figura 7), además de conducir a hipertensión pulmonar, insuficiencia cardíaca y, finalmente, insuficiencia respiratoria (6,72).

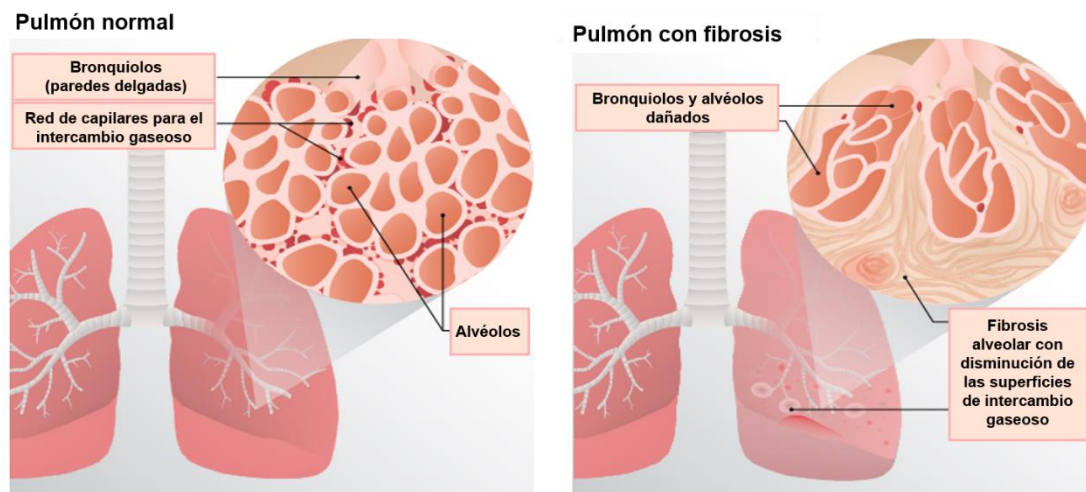


Figura 7. Daño alveolar en la fibrosis pulmonar

La fibrosis pulmonar desemboca en dilatación de los bronquios, remodelación alveolar y fibrosis del parénquima. Todo esto contribuye al deterioro del intercambio de gases, particularmente la oxigenación, con la consiguiente insuficiencia respiratoria (tomada de (73)).

Según la distribución de la fibrosis, existen 3 patrones distintivos de fibrosis pulmonar: 1) neumonía intersticial inespecífica fibrótica; 2) fibrosis centrada en las vías respiratorias; y 3) neumonía intersticial habitual fibrótica, dentro de la cual se encuentra la FPI (74) (Figura 8).

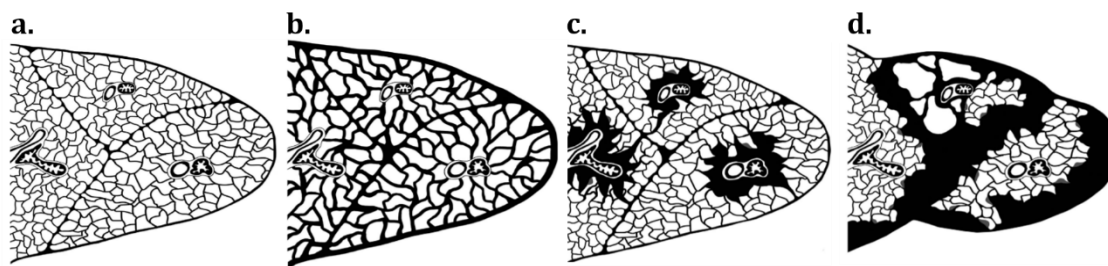


Figura 8. Representación esquemática de los patrones básicos de fibrosis pulmonar

a) Pulmón sano: paredes alveolares delgadas con haces broncovasculares en el centro de los lobulillos y septos interlobulares muy finos. **b)** Neumonía intersticial inespecífica fibrótica: afectación difusa de las paredes alveolares y la pleura con engrosamiento y fusión. **c)** Fibrosis centrada en las vías respiratorias: fibrosis centrilobular con apariencia estrellada y puentes ocasionales de una vía aérea a otra. Presenta focos de fibroblastos dispersos. **d)** Neumonía intersticial habitual fibrótica: marcada fibrosis irregular de distribución principalmente periférica y subpleural (tomada de (74)).

Entre las diferentes patologías asociadas a fibrosis que afectan al pulmón destaca el “daño pulmonar agudo” (ALI, por sus siglas en inglés *Acute lung injury*), la cual se trata de una patología caracterizada por una relación entre la presión parcial de oxígeno arterial (PaO_2) y la fracción de oxígeno inspirado (FiO_2), $[\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2]$, inferior o igual a 300 mmHg. Una forma más grave de esta patología es el “síndrome de dificultad respiratoria aguda” (ARDS, por sus siglas en inglés *Acute Respiratory Distress Syndrome*) definido por una hipoxemia aguda con una $[\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2] \leq 200$ mmHg. Ambas patologías, de carácter progresivo, se caracterizan por la presencia de infiltrados bilaterales irregulares, generación de daño alveolar difuso y rotura del epitelio alveolar. El desarrollo de estos síndromes se inicia cuando se genera una lesión en el epitelio alveolar, la cual desencadena una respuesta inflamatoria por parte de neutrófilos que se adhieren al endotelio capilar dañado. Además, los macrófagos alveolares liberan citoquinas proinflamatorias, tales como IL1, IL6 o $\text{TNF}\alpha$, que favorecen, a su vez, la llegada y activación de los neutrófilos. Todo ello, genera una tormenta de citoquinas inflamatorias que daña aún más el tejido lesionado. Pese a que en algunos pacientes esta fase aguda puede resolverse, en otros da lugar a la activación descontrolada de miofibroblastos tisulares, pudiendo progresar a una alveolitis fibrosante con hipoxemia persistente (75). Entre los diferentes factores de riesgo asociados al desarrollo de ALI/ARDS los principales son la neumonía y la sepsis (76). En este sentido, en la actualidad, es de sumo interés señalar que se ha reportado que los pacientes infectados con el virus *SARS-CoV-2* tienen como principal causa de ingreso hospitalario la neumonía intersticial, la cual puede complicarse, generando ALI/ARDS de elevada alta mortalidad (77). De hecho, estas complicaciones pulmonares son las principales responsables de la mortalidad producida por el virus, afectando, al menos a un 40-50% de los pacientes. A esto le sigue como segunda causa un síndrome hiperinflamatorio que cursa con un fallo multiorgánico fatal, en el cual el perfil de citoquinas proinflamatorias incluye IL2, IL7, el factor estimulante de la colonia de granulocitos, $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, la proteína inducible 10, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 y la proteína inflamatoria de macrófagos 1α (78). Como se ha indicado previamente, la fibrosis pulmonar es una consecuencia de los síndromes ALI/ARDS, por lo que los pacientes que padecen la enfermedad causada por el *SARS-CoV-2*, COVID-19, son susceptibles de desarrollar procesos fibróticos pulmonares. De hecho, de los pacientes con COVID-19 que desarrollan ARDS, un 20% progresa a ARDS de elevada gravedad y alveolitis fibrosante irreversible (79). Por otro lado, un rasgo destacable es que, pese a la erradicación total del virus en pacientes recuperados de COVID-19, el proceso fibrótico desarrollado es irreversible. Este hecho puede dar lugar a una morbilidad y mortalidad importantes pues el virus afecta, principalmente, a personas de edad avanzada o con

patologías pulmonares preexistentes. Además, actualmente las consecuencias a largo plazo de COVID-19, así como el desarrollo de secuelas crónicas aún se desconocen (77,79). En este sentido, el desarrollo de diferentes terapias basadas en detener la tormenta de citoquinas o el desarrollo del proceso fibrótico asociados a COVID-19 cobran cada vez más importancia. Así, se ha evaluado el uso de corticosteroides para prevenir el desarrollo de ARDS; o el uso de inhibidores de la AngII para evitar la progresión de la fibrosis, entre otros tratamientos (77). Pese a ello, aún es necesario seguir investigando posibles tratamientos que limiten y reviertan de forma efectiva el daño generado por el SARS-CoV-2, así como las posibles secuelas que el virus pueda provocar.

Otra patología fibrótica pulmonar de gran importancia es la FPI, una neumonía intersticial crónica, progresiva y fibrosante de etiología desconocida. La FPI representa entre el 17% y el 86% de todos los casos de las enfermedades intersticiales pulmonares (80). Se trata de una enfermedad cuya incidencia y prevalencia no están claras, aunque se encuentran en aumento (80,81). Los mejores datos disponibles sugieren una incidencia de aproximadamente 10,7 por cada 100000 personas para hombres; y 7,4 por cada 100000 personas para mujeres. La prevalencia de FPI es ligeramente mayor en 20,2 hombres por 100000 y 13,2 mujeres por 100000 (80). Sin embargo, los datos son muy variables según la región. Así, por ejemplo, en Europa y América del Norte la incidencia estimada de FPI oscila entre 2,8 y 19 casos por cada 100000 personas por año, estando los valores más altos en el Reino Unido y en Canadá, respectivamente. Por su parte, la tasa más baja de FPI a nivel mundial se encuentra en Asia (Corea del Sur, Taiwán y Japón), con tasas de incidencia que varían de 1,2 a 4,16 por cada 100000 personas por año (82). La FPI se trata de la neumonía intersticial fibrótica más frecuente y de peor pronóstico (74), pues es irreversible, tiene un curso clínico impredecible y variable y se asocia con un pronóstico extremadamente pobre. La FPI generalmente se manifiesta como dificultad para respirar, crepitación inspiratoria bibasilar, aumento de la tos y la disnea, y empeoramiento de las pruebas de función pulmonar, además del golpeteo de los dedos en el 50% de los pacientes (81). Pese a que la etiología de la FPI es desconocida se sabe que los factores de riesgo asociados incluyen, entre otros, fumar, exposiciones ambientales, patógenos microbianos y factores genéticos (Tabla 1) (82).

Factores	
Exposiciones ambientales	Humo de tabaco e incendios/Polvo de madera/Polvo de metal/Piedra/Arena
Exposiciones ocupacionales	Agricultura/Ganadería/Barberos/Esteticistas
Demográficos/clínicos	Edad avanzada/Sexo masculino/Enfermedad por reflujo gastroesofágico
Mutaciones genéticas	MUC5B (mucina 5B)/TERT (genes de la telomerasa)/Proteína Surfactante C/Proteína Surfactante A2

Tabla 1. Factores de riesgo asociados a la FPI

Entre los factores de riesgo principales para padecer FPI se encuentran la edad y el sexo. De hecho, la prevalencia de FPI aumenta con la edad, teniendo la mayoría de los pacientes más de 50 años en el momento del diagnóstico. Además, hay una mayor proporción de hombres afectados que de mujeres (tomada de (80)).

Fibrosis cutánea y patologías asociadas

La piel es el órgano más grande y pesado del cuerpo humano, representando en promedio el 16% de la masa corporal y cubriendo en torno a 2 m² de su superficie. Su función principal es la de actuar como una barrera y proteger al individuo contra la deshidratación, la entrada de patógenos, la radiación UV y las lesiones térmicas o mecánicas. Además, tiene otras funciones importantes entre las que se encuentran las funciones inmunológicas, sensoriales y termorreguladoras. También participa en la síntesis de la vitamina D (61).

La piel se trata de un órgano cuya estructura puede dividirse en tres capas, con funciones distintas. Desde el exterior al interior son: a) la epidermis, capa celular dividida en 5 estratos (estrato córneo, granuloso, espinoso, basal o germinativo y lúcido); b) la dermis, responsable de elasticidad y resistencia de la piel, compuesta principalmente por una MEC conformada por fibroblastos y células inmunológicas; y c) la hipodermis, compuesta principalmente de grasa subcutánea junto con vasos linfáticos y sanguíneos que conecta la piel con el músculo subyacente.

Debido a que la fibrosis cutánea afecta a la estructura dérmica, lo que lleva a una alteración estructural y funcional de la misma, es importante destacar que la MEC dérmica se compone, principalmente, de colágeno (como las fibras de colágeno I, III y V junto con moléculas de colágeno VI, VII, XIV y XII); además de otros elementos estructurales como glucoproteínas y proteoglicanos; y otros elementos con diversas funciones (folículos pilosos, glándulas, terminaciones nerviosas sensoriales, vasos linfáticos y capilares sanguíneos) (83). Así, la fibrosis cutánea se trata de un proceso patológico caracterizado por la proliferación y diferenciación de fibroblastos y el depósito excesivo de MEC en la dermis (84), principalmente colágeno tipo I, III y VII, además de fibrillas de fibrilina y elastina. También se generan niveles elevados de enzimas modificadoras de colágeno responsables de una mayor formación de enlaces cruzados entre las moléculas de colágeno (59). Sin embargo, la patogenia de la enfermedad aún no está del todo clara. La inflamación crónica, la infección, las reacciones alérgicas y autoinmunes, y el daño de la piel debido a la radiación, la lesión química o mecánica pueden inducir a la proliferación descontrolada de fibroblastos y la síntesis de MEC. Entre las moléculas implicadas en la activación de los fibroblastos se encuentran citoquinas y factores de crecimiento como TGFβ y CTGF, siendo TGFβ la molécula profibrótica más importante (84) (Figura 9).

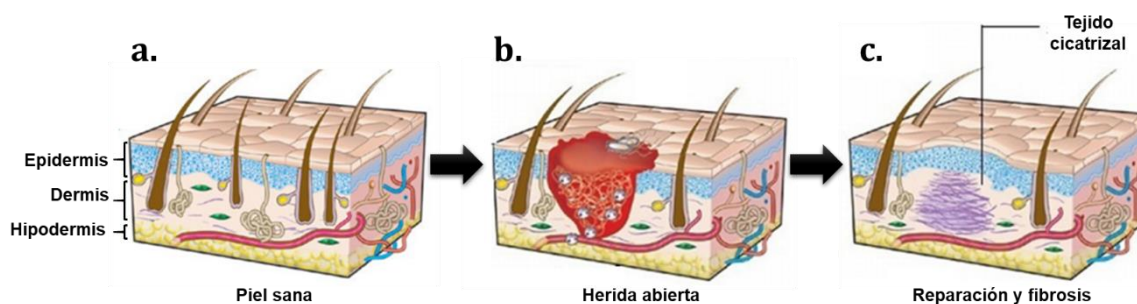


Figura 9. Representación de la fibrosis cutánea

En la piel sana las tres capas (epidermis, dermis e hipodermis) se diferencian claramente, conservando su estructura y función (a). Cuando se produce un daño en la piel, la lesión de las células epiteliales y endoteliales favorece un proceso de coagulación y de respuesta inflamatoria (b) que desemboca en la proliferación y activación de fibroblastos, dando lugar a la síntesis de MEC la cual sustituye al tejido dañado (c). Cuando este proceso se vuelve crónico, se produce un exceso de acumulación de MEC en la dermis, alterando su estructura y función (adaptada de (85)).

Entre las patologías fibróticas que afectan a la piel, la esclerodermia o esclerosis sistémica (del inglés *Systemic Sclerosis*, SSc) es la enfermedad prototípica (86). Se trata de un desorden autoinmune complejo que afecta al tejido conectivo de etiología desconocida, aunque actualmente se considera el resultado de las interacciones entre factores ambientales (como la sílica, los disolventes, los pesticidas o los agentes infecciosos, entre otros) y la predisposición genética del individuo (factores implicados en señalización celular (NF- κ B, STAT4), citoquinas (TGF β , IFN γ) y alelos HLA (HLA-DRB1, DQB1, DQA1, DPB1), entre otros) (87,88). Presenta tanto una prevalencia como una incidencia muy variables según la zona pasando de 50 a 300 casos por millón de personas en el primer caso, y de 2,3 a 22,8 casos por millón de persona por año en el segundo, afectando más a mujeres que a hombres (87,89). Puede aparecer en cualquier etapa de la vida, dándose mayoritariamente el pico de edad en torno a los 50 años (87). La SSc se trata de una enfermedad de carácter heterogéneo pues, aunque el órgano principalmente perjudicado es la piel, también pueden afectarse otros tales como los pulmones, corazón, riñones o tracto gastrointestinal. De manera que, en función de su extensión, existen dos variantes de la enfermedad: 1) la SSc cutánea limitada, variante menos severa en la cual la fibrosis queda limitada a la superficie del cuello, la cara y extremidades distales. Además, se caracteriza por lo que se conoce como síndrome de CREST (calcinosis, síndrome de raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia). La hipertensión pulmonar también es frecuente; y 2) la SSc cutánea difusa, tipo más severo que afecta a grandes áreas de la piel y a órganos internos. Presenta un progreso más rápido y se encuentra asociada a complicaciones relacionadas con los órganos tales como: fibrosis pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar arterial, fallo congestivo del corazón, crisis renal o fallos gastrointestinales (59,67).

Fibrosis hepática y patologías asociadas

El hígado es un órgano muy plástico que presenta una elevada capacidad de sanación y recuperación de su estructura funcional. Se trata de un órgano fundamental, pues realiza gran cantidad de tareas tales como la detoxificación de la sangre, el metabolismo de los hidratos de carbono y los lípidos, la síntesis proteica o la secreción de la bilis.

El tejido hepático se encuentra estructurado en los llamados lobulillos hepáticos. Estos se tratan de agrupaciones poligonales de hepatocitos, unidades funcionales hepáticas, dispuestos en hileras entre las cuales discurren los sinusoides hepáticos. Los sinusoides conectan una vena centrolobulillar con las llamadas tríadas portales (conformadas por la vena portal, la arteriola portal y el conducto biliar) situadas en la periferia de los distintos lobulillos, y permiten el flujo de sangre, oxígeno y nutrientes en el interior del hígado. Además, en los mismos se localizan las células de Kupffer que constituyen los macrófagos hepáticos. Por otro lado, en el espacio situado entre los sinusoides y las láminas de hepatocitos, llamado espacio perisinusoidal de Disse, se pueden encontrar las HSC las cuales, como ya se ha descrito, son los principales reservorios de vitamina A y otros ácidos retinoicos y constituyen el principal tipo celular asociado con el proceso fibrótico.

Pese a la elevada plasticidad del hígado, cuando un proceso inflamatorio se vuelve crónico y la acumulación de MEC persiste, se produce una sustitución progresiva del parénquima hepático por tejido cicatrizal, cuya consecuencia final recibe el nombre de cirrosis. Hay gran variedad de estímulos que pueden generar fibrosis hepática como son la hepatitis viral, toxinas (alcohol), el hígado graso, la enfermedad del tracto biliar o la sobrecarga de metales pesados. Independientemente de su etiología, la evolución de la fibrosis hepática se caracteriza, de forma

general, por un daño inicial en los hepatocitos que da lugar a la perpetuación de la necrosis parenquimatosa, alteraciones en la composición de la MEC, reclutamiento de células inflamatorias en el sitio de la lesión y activación de las HSC y las células de Kupffer (90,91). La activación de las HSC hace que estas células adquieran un fenotipo profibrótico de manera que van disminuyendo sus reservorios lipídicos y van transformándose a miofibroblastos con capacidad para contraerse y generar una gran cantidad de colágeno (siendo el más abundante en el hígado el tipo I seguido del tipo III y del IV (92)) y otros componentes de la MEC (91). De hecho, el contenido total de componentes colagenosos y no colagenosos en la fibrosis hepática puede aumentar de tres a cinco veces. A nivel molecular, los factores de crecimiento, las citoquinas y las quimioquinas, y las ROS desempeñan un papel importante en el desarrollo fibrótico (90). Entre las principales moléculas implicadas se encuentran PDGF, principal mitógeno y activador de las células HSC, TGF β , regulador principal del proceso fibrótico, y citoquinas tales como TNF α , IFN, IL1 o IL17 (93).

La fibrosis hepática representa un problema de salud significativo que se estima que afecta a más de 100 millones de personas (90). Además, la cirrosis generada presenta una baja recuperación y una elevada mortalidad. Su progresión suele ser lenta, desarrollándose durante un período que puede variar entre 20 a 40 años según los factores genéticos y ambientales de cada individuo (94). Por otra parte, la cirrosis subyace a diversidad de patologías graves con variedad de efectos adversos. Entre los efectos adversos que provoca se encuentra la hipertensión portal cuya característica principal es que debido al incremento de la resistencia vascular intrahepática, consecuencia de la fibrosis, se produce un aumento en el gradiente de presión entre la vena portal y la vena cava inferior (91,92,95). Como resultado de la elevada presión, pueden surgir varias complicaciones, tales como: ascitis, varices esofágicas y gástricas y encefalopatía hepática; así como complicaciones secundarias a la disfunción circulatoria, como el síndrome hepatorenal, el hepatopulmonar o el ortopulmonar (96).

La forma más frecuente de patología hepática es la enfermedad del hígado graso no alcohólico, la cual constituye una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Esta patología afecta del 10% al 24% de la población general en varios países, aumentando en paralelo con la obesidad. Así, la prevalencia aumenta del 57,5% a 74% en personas obesas. La enfermedad del hígado graso no alcohólico afecta al 2,6% de los niños y del 22,5% al 52,8% de los niños obesos (97,98). Aunque los mecanismos subyacentes al proceso de esta enfermedad aún no se conocen bien parece que el daño inicial conduce a una lesión hepática lipotóxica, la cual favorece una inflamación prolongada que impulsa una remodelación fibrogénica del hígado, que culmina en cirrosis (98).

Fibrosis renal y patologías asociadas

El riñón se trata de un órgano cuya función principal consiste en eliminar los productos residuales del metabolismo y reabsorber los que son útiles, desempeñando un papel importante en la homeostasis del líquido corporal. Además, tiene funciones como órgano endocrino. La unidad estructural y funcional del riñón recibe el nombre de nefrona, la cual se encuentra conformada por dos elementos principales: i) el corpúsculo renal formado por el glomérulo renal (conjunto de capilares) y la cápsula de Bowman (cubierta de la red de capilares), donde tiene lugar la filtración de la sangre; y ii) un sistema de túbulos (túbulos contorneados distal y proximal, asa de Henle, túbulo colector y conducto colector) en el cual tienen lugar procesos de reabsorción

y secreción de metabolitos, regulación de la osmolaridad sanguínea y recogida del producto final de varias nefronas, la orina.

Tal y como se ha descrito para los pulmones, la piel o el hígado, cuando se produce un daño en el tejido renal se genera una respuesta inflamatoria y de cicatrización de la herida que cuando se hace crónica favorece la aparición de fibrosis. La progresión de la fibrosis renal se caracteriza por la pérdida de células renales y su reemplazo por MEC en los glomérulos y el intersticio (99). Así, dentro de la fibrosis renal, se pueden distinguir dos tipos según su localización: 1) la fibrosis glomerular; y 2) la fibrosis túbulo-intersticial. Los mecanismos subyacentes a ambos procesos fibróticos son comunes: i) respuesta inflamatoria descontrolada; ii) proliferación de miofibroblastos y depósito excesivo de MEC; y iii) pérdida de estructura y funcionalidad del órgano (100). En el caso de la fibrosis glomerular, las células mesangiales (células de músculo liso especializadas) participan activamente en la patogénesis sintetizando y liberando citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, así como factores de crecimiento profibróticos. Además, estas células pueden sufrir cambios fenotípicos y liberar componentes de la MEC (100). En el caso de la fibrosis túbulo-intersticial las células tubulares juegan un papel importante ya que cuando están lesionadas liberan quimioquinas y citoquinas capaces de atraer células inflamatorias al intersticio renal favoreciendo, a su vez, la liberación de citoquinas profibróticas, la proliferación de fibroblastos y la síntesis de MEC. De hecho, las células epiteliales tubulares pueden adquirir un fenotipo de miofibroblasto (101). Además, las células tubulares pueden liberar factores de crecimiento y estimular directamente la producción de MEC por los fibroblastos intersticiales (100). Entre esos factores de crecimiento, AngII puede promover el cambio fenotípico de fibroblastos a miofibroblastos que invaden los espacios periglomerulares y peritubulares, contribuyendo a el depósito de MEC en el área túbulo-intersticial (53).

Un ejemplo de patología asociada a fibrosis renal es la enfermedad renal crónica (ERC), afección que presenta una elevada prevalencia, pues se estima que en los países desarrollados más del 10% de los adultos presentan algún grado de la patología (99,102). La ERC se trata de un síndrome definido como “alteraciones persistentes en la estructura, función o ambas de los riñones con implicaciones para la salud del individuo” (103). La ERC constituye un grave peligro para la salud humana, pues resulta, finalmente, en el fallo renal. Además, la mayoría de los pacientes con ERC tienen riesgo de enfermedad cardiovascular acelerada y muerte. De hecho, según las estimaciones de la OMS (Organización Mundial de la Salud), el 1,5% de las muertes en todo el mundo en 2012 fueron atribuibles a esta patología, lo cual la clasificó en el decimocuarto lugar en la lista de las principales causas de muerte (102). Las principales causas de ERC son la diabetes y la hipertensión, y tiene una mayor prevalencia en personas mayores de 65 años (99,102,103).

Fibrosis cardíaca y patologías asociadas

El corazón se trata del órgano principal del sistema circulatorio, compuesto también por los vasos sanguíneos y linfáticos. Se encuentra formado por dos aurículas y dos ventrículos, cuyas paredes se encuentran conformadas por tres capas, que de la más interna a la más externa son: i) endocardio; ii) miocardio; y iii) pericardio. De las tres, la capa más gruesa es el miocardio, cuya unidad funcional son los miocitos cardíacos, células musculares unidas mediante uniones GAP, que presentan capacidad para contraerse y comportarse como un sincitio. Así, mediante la contracción de estas células se produce la contracción cardíaca, gracias a la cual se llevan a cabo las funciones del corazón, tales como el bombeo de la sangre y la distribución del oxígeno y los nutrientes por el organismo.

El corazón presenta la capacidad de remodelarse en respuesta a las demandas ambientales y una variedad de estímulos. Entre esos estímulos, la lesión del miocardio es causa de una hipertrofia patológica de los miocitos, que se acompaña de un exceso de acumulación de MEC, lo que puede aumentar el riesgo de insuficiencia cardíaca y arritmia (104). De manera que, la acumulación de MEC provoca una mayor rigidez del corazón e induce a una señalización patológica de los cardiomiocitos, lo que resulta en insuficiencia cardíaca progresiva. Además, la MEC excesiva perjudica el acoplamiento mecanoeléctrico de los cardiomiocitos favoreciendo el riesgo de arritmias (105) y muerte súbita cardíaca (106). En el corazón, la fibrosis se atribuye a los fibroblastos principalmente cardíacos, los cuales se diferencian a miofibroblastos en un proceso impulsado por factores como TGFβ1, endotelina-1 y angiotensina II (6).

La fibrosis cardíaca puede manifestarse de dos formas: 1) la fibrosis intersticial reactiva, que tiene lugar en espacios perivasculares; y 2) la fibrosis focal de reemplazo, que tiene lugar en el sitio de pérdida de miocitos (6,106) (Figura 10).

Como ya se ha descrito, la fibrosis culmina con el fallo del órgano afectado, lo que expone al paciente al riesgo de muerte. Así, por ejemplo, la insuficiencia cardíaca es la causa principal de mortalidad de adultos en el mundo desarrollado. En términos generales, la prevalencia de insuficiencia cardíaca se puede estimar en 1–2% en el mundo occidental y la incidencia se acerca a 5–10 por 1000 personas por año. Aunque las personas menores de 50 años casi nunca la padecen, en los mayores de 50 años la prevalencia y la incidencia aumentan progresivamente con la edad. Además, se presenta con mayor frecuencia en hombres que en mujeres (107,108).

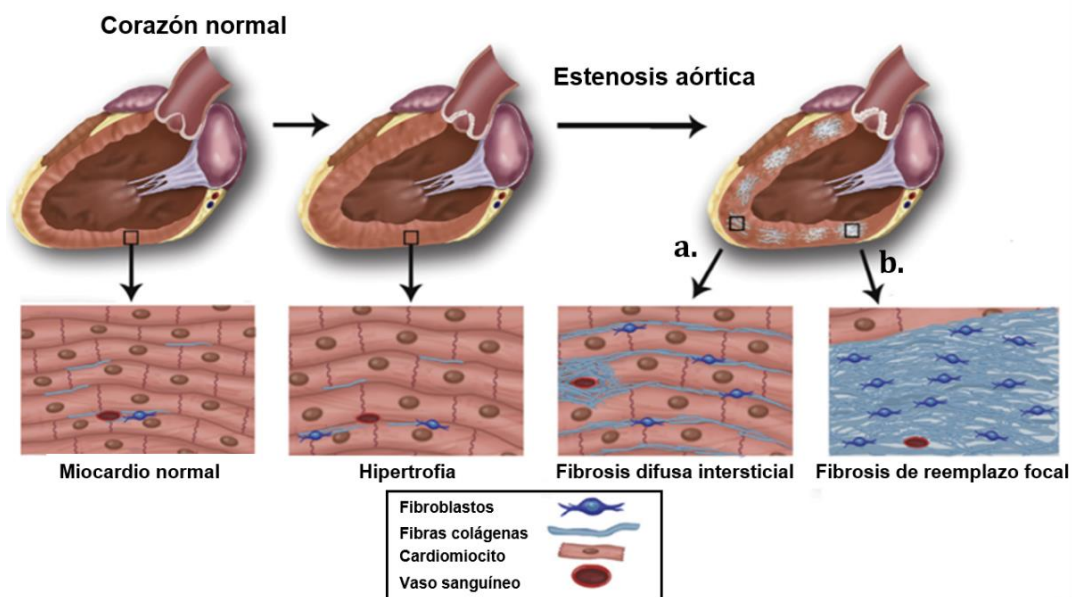


Figura 10. Representación de la transformación de un corazón sano en uno fibrótico

Debido a una lesión, el corazón sufre un proceso de hipertrofia en el cual se produce un aumento del volumen de los miocitos y una remodelación y un incremento del depósito de MEC, desarrollándose finalmente una fibrosis intersticial difusa (a) y/o una fibrosis focal de reemplazo (b). De manera que el patrón fibrótico va variando de la siguiente manera: a) en la fibrosis intersticial reactiva, los espacios perivasculares van siendo ocupados por colágeno fibrilar y conforme avanza la fibrosis, se va generando una malla de fibras de colágeno que rodea a los miocitos; b) en la fibrosis de reemplazo, las fibras de colágeno van ocupando el vacío generado por la pérdida de los miocitos atrofiados, que van muriendo por necrosis o apoptosis (109–112) (tomada de (112)).

Además de los órganos ya vistos, la fibrosis también ocurre en las articulaciones, la médula ósea, el cerebro, los ojos, los intestinos, el páncreas o el peritoneo (6). Por tanto, se puede hablar de una gran variedad de patologías asociadas al proceso de fibrosis que afectan a órganos muy diversos. En conjunto, todas las patologías asociadas a fibrosis constituyen en torno a un tercio de las defunciones que se producen en el mundo desarrollado, hecho que motiva a la búsqueda de marcadores de susceptibilidad asociados a fibrosis y al desarrollo de fármacos y tratamientos que permitan abordar las distintas patologías.

1.2.2 Factores endógenos asociados a fibrosis

El desarrollo de estrategias que permitan identificar los procesos fibróticos constituye una maniobra de gran utilidad que permitiría abordar las patologías asociadas a fibrosis con mayor precisión, seguridad y rapidez. En este sentido, la identificación de factores endógenos que, además de indicar el desarrollo de un proceso fibrótico patológico, permitan determinar la susceptibilidad de una persona a sufrirlo de forma más o menos exacerbada, podría convertirse en una herramienta vital para el desarrollo de terapias y tratamientos adecuados. En este sentido surge el concepto de factor endógeno de susceptibilidad, y la búsqueda de los mismos asociados a fibrosis.

En la actualidad aún no se conocen factores endógenos capaces de indicar de forma específica, precisa e inequívoca si un individuo es más o menos susceptible a padecer un proceso fibrótico. Es decir, aún no se conocen factores de susceptibilidad al proceso de fibrosis propiamente dicho. Aunque bien es cierto que sí se han identificado determinados biomarcadores asociados, en mayor o menor medida, al mismo. El marcador biológico o biomarcador, definido en 1998 como "un marcador característico que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica" por el NIH (del inglés *National Institutes of Health*), es una herramienta muy necesaria para el diagnóstico diferencial, la predicción de la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento (113). Idealmente, los biomarcadores deberían ser fácilmente muestreados y específicos, aunque en el caso de los procesos asociados a fibrosis aún no se ha encontrado ningún factor que cumpla ambos requisitos de forma idónea.

En función de la patología y el órgano, el estudio de factores de susceptibilidad y biomarcadores puede convertirse en un tema muy amplio y complejo. Así, por ejemplo, los marcadores séricos hepáticos de fibrosis pueden dividirse en aquellos que reflejan la inflamación y la función del hígado (marcadores indirectos) y aquellos que están relacionados con el metabolismo de la MEC (marcadores directos). Sin embargo, el grado de precisión de estos marcadores solo es de alrededor del 80% para la diferenciación entre fibrosis no moderada y severa es decir, para la diferenciación dicotómica de pacientes en dos categorías de fibrosis cruda (114), lo que hace necesario continuar la búsqueda de biomarcadores más precisos.

En FPI, la mayoría de los biomarcadores propuestos entre 1993 hasta 2016 son: i) marcadores epiteliales alveolares como el antígeno de Krebs von den Lungen-6 y la proteína tensioactiva A y D; ii) quimioquinas como CCL18 e IL8; y iii) factores de crecimiento y moléculas de adhesión como el factor de crecimiento similar a la insulina 2, molécula de adhesión intercelular -1 y 2 o VEGF; iv) marcadores de remodelación de la MEC como MMP1, MMP7 y Periostina; y v) las células circulantes y los fibrocitos, que cada vez ganan más interés en ese sentido (115). Además de estos marcadores, en un estudio publicado por Mahers y colaboradores

en 2019 se observó que los marcadores de formación de colágeno presentaban una elevada utilidad pronóstica en FPI. Durante la formación de colágeno, los propéptidos se separan de las proteínas de procolágeno para formar proteínas de colágeno maduras. Esta escisión da como resultado la formación de fragmentos de proteínas denominadas neoepítomos. En su estudio, Mahers y colaboradores encontraron que los neoepítomos PRO-C3 y PRO-C6 (neoepítomos de la síntesis de colágeno-3 y colágeno-6, respectivamente) se encontraban elevados en individuos con FPI en comparación con los controles y diferían en los niveles entre enfermedad estable y progresiva. Además, los niveles basales de C1M, C3M, C6M y CRPM (fragmentos de colágeno degradados por las MMPs) también fueron elevados en sujetos con FPI en comparación con el control saludable (116).

Por su parte, en patologías asociadas a fibrosis cutánea como la SSc, los principales biomarcadores son: i) factores de crecimiento y citoquinas como TGF β , CTGF o la IL6; ii) quimoquinas como CCL2 o CXCL4; iii) moléculas de adhesión como ICAM-1; iv) biomarcadores vasculares, entre los que se incluyen VEGF, el factor von Willebrand, la endotelina-1, la trombomodulina, la trombospondina, el péptido natriurético cerebral, endostatina, activador del plasminógeno, prostaciclina, tromboxano y metabolitos circulantes de óxido nitroso; v) moléculas angiostáticas, que incluyen angiostatina, endoglina, endostatina, trombospondina y receptor de VEGF; y vi) autoanticuerpos específicos (117). Además, el estudio genético de pacientes con SSc también puede arrojar luz sobre la presencia de marcadores específicos.

En el caso del riñón, la biopsia sigue siendo el único medio seguro de diagnosticar clínicamente la fibrosis renal. Pero, como se ha comentado, la validación de biomarcadores de fibrosis no invasivos sería muy útil. Así, Mansour y colaboradores publicaron en 2017 una revisión sistemática de todos los estudios clínicos publicados con datos de biomarcadores renales e identificaron 3 proteínas detectables en la sangre o la orina como posibles biomarcadores para predecir el deterioro de la función renal: TGF β , CCL2 y MMP2 (118). Por otro lado, el análisis de los péptidos urinarios podría resultar útil en este sentido. Por ejemplo, se ha observado que los péptidos C1M y C3M aumentaron en la orina de 9 a 100 veces en 3 modelos diferentes de fibrosis renal en ratas y se correlacionaron estrechamente con la remodelación del colágeno tisular (119). Otros biomarcadores interesantes en fibrosis renal son CTGF plasmático o CTGF N-terminal, un fragmento proteolítico de CTGF cuya filtración en la orina aumenta en situaciones patológicas, hecho que se correlaciona con el aumento de CTGF en el plasma; la disminución de EGF en la orina o el incremento de la señalización del receptor EGFR (por acción de otros ligando diferentes a EGF); y el aumento de la señalización de PDGFR β mediada por PDGF-B/PDGF-D (120).

Un aspecto novedoso es el estudio de los cambios en la metilación del ADN como biomarcadores. Así, por ejemplo, se ha observado que la metilación diferencial de PPAR γ se puede utilizar para determinar la gravedad de la fibrosis en muestras de tejido hepático. Aunque este enfoque requiere una biopsia de tejido invasiva, se ha demostrado que las marcas de hipermetilación en el gen de PPAR γ también se pueden detectar en la sangre y que se correlacionan con la fibrosis hepática avanzada y la cirrosis. Finalmente, gracias a las técnicas de imágenes como la resonancia magnética y la tomografía por emisión de positrones, surge la posibilidad de utilizar dichos métodos para medir y monitorizar de manera no invasiva los biomarcadores de enfermedades fibróticas *in situ*. Sin embargo, el elevado coste de estas técnicas en comparación con la medida de biomarcadores en el suero o la orina hace que, por el momento, estas técnicas no sean tan empleadas (121).

Pese a que se han descubierto diferentes biomarcadores asociados a enfermedades fibróticas, tal y como se ha descrito, la mayoría se encuentran relacionados con el proceso inflamatorio y no con el proceso fibrótico propiamente dicho. Además, muchos de los métodos empleados para detectar y analizar el biomarcador son invasivos, pues se hace necesario el uso de biopsias. Por otro lado, un aspecto especialmente destacable e importante es que aún no se han encontrado factores endógenos que, además de indicar si una persona presenta o no el desarrollo de un proceso fibrótico, permita dilucidar si un paciente puede ser más o menos susceptible a sufrirlo. Es decir, pese a que ya se conocen algunos biomarcadores relacionados con fibrosis aún se hace necesario encontrar un factor endógeno capaz de indicarnos la susceptibilidad de un paciente a sufrir una fibrosis más o menos exacerbada, y que se encuentre relacionado de forma directa con el propio proceso fibrótico (siendo, además, fácilmente medible), lo que hace necesario seguir investigando en este sentido.

1.2.3 Tratamientos de las enfermedades fibróticas

Dada la complejidad de las patologías asociadas a fibrosis, encontrar un tratamiento eficaz se está convirtiendo en un camino muy complicado. En la actualidad, aunque se están probando gran variedad de tratamientos distintos la mayoría se encuentran aún en fase experimental o en fase de ensayos clínicos, algunos con resultados prometedores. Por el momento, debido a la falta de procedimientos eficaces, los pacientes reciben tratamientos de carácter sintomatológico, con el fin de mejorar su situación, pero sin poder parar o revertir la enfermedad.

Así, por ejemplo, en la SSc se emplean fármacos que incluyen esteroides tópicos, corticoides sistémicos, ciclofosfamida, la ciclosporina A o la D-penicilamina para el tratamiento de las afecciones cutáneas; o incluso ciclos de fototerapia con radiación UV-A y fotoquimioterapia con psolarenos. Para el síndrome de raynaud se recomienda utilizar principalmente vasodilatadores, antiagregantes y calcioantagonistas. También se emplea el tratamiento con antibióticos para las úlceras cutáneas. Además, se recomienda el uso de analgésicos para aliviar el dolor de los pacientes e incluso la fisioterapia. Por su parte, para las cardiopatías se recomiendan antiinflamatorios no esteroideos o bajas dosis de corticosteroides, en el caso de pericarditis; y altas dosis de glucocorticoides, diuréticos o dietas bajas en sal para la miocarditis. Para las afecciones pulmonares como la hipertensión pulmonar se emplean vasodilatadores como el sildenafil o el bosentan (122). Para el tratamiento de la FPI también se emplean inmunosupresores y corticosteroides (123). En el caso de afectación del riñón se emplean principalmente inhibidores de la ECA, de la AngII y de la renina, así como diálisis (124). Por su parte, debido a que el hígado es un órgano muy plástico y se ha observado que la fibrosis puede ser reversible, el tratamiento actual de las fibrosis hepáticas se basa, principalmente, en eliminar el agente causal en caso de que haya posibilidad. Así por ejemplo, se lleva a cabo el empleo de antivirales en el caso de la hepatitis crónica C (125). Como fracaso del tratamiento médico emerge la amputación o el trasplante del órgano dañado. Esta sería la última opción terapéutica debido a que los pacientes presentan una alta mortalidad en la lista de espera y durante el primer año de trasplante (126).

Por otro lado, además de los tratamientos sintomatológicos, se han propuesto múltiples estrategias para abordar las patologías asociadas a fibrosis. Así, para la fase inicial en la cual se produce el infiltrado inflamatorio, se ha planteado seguir estrategias antiinflamatorias. Sin embargo, no está demostrado que el tratamiento con antiinflamatorios altere el pronóstico de la

enfermedad fibrótica (126). Entre las aproximaciones antiinflamatorias se encuentran algunas tales como el empleo de bloqueadores de la vía NF- κ B, como la hormona adrenocorticotropina, lo que a su vez provocaría una inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias (127). Algunos grupos han desarrollado anticuerpos que se dirigen selectivamente a citoquinas individuales o bien a grupos de citoquinas, como la inhibición conjunta de IL4 e IL13 (4). Otra estrategia sería la basada en inhibidores de la migración de leucocitos, como puede ser la colchicina, la cual se acumula en los neutrófilos e inhibe su adhesión y reclutamiento, además de interrumpir el tráfico intracelular de mediadores inflamatorios y de fibrosis adicionales; o inhibidores de moléculas que regulan negativamente la fibrosis como los antagonistas de PPAR (127).

En cuanto a las fases de proliferación y activación de miofibroblastos y de depósito de MEC existe gran variedad de aproximaciones. Muchas estrategias se basan en el bloqueo de las moléculas implicadas en la síntesis de proteínas de la MEC, tales como TGF β y CTGF (127). Por ejemplo, GC1008 es un anticuerpo humanizado que se une y bloquea la función de las tres isoformas de TGF β . En un ensayo clínico realizado con GC1008, el tratamiento revirtió rápidamente los marcadores de fibrosis de la piel de pacientes con SSc, lo que se reflejó en la disminución de la patología a nivel cutáneo con menos infiltración de miofibroblastos en la dermis y una disminución en la expresión de genes regulados por TGF β , como CTGF (128). Otro enfoque para bloquear la vía TGF β , es el que se basa en el bloqueo de la interacción de su forma latente con la integrina α v β 6, hecho que inhibe su activación. Así, se está evaluando la eficacia de STX-100, un anticuerpo anti- α v β 6 humanizado, en un ensayo clínico con dosis múltiples en pacientes con FPI. Por otro lado, la pirfenidona, un fármaco con propiedades antifibróticas, antioxidantes y antiinflamatorias, que interfiere con la expresión, la secreción y el efecto del TGF β . Ya se han realizado varios ensayos clínicos en fase III con pirfenidona, la mayoría de los cuales presentan resultados muy prometedores en el tratamiento de la FPI. De hecho, este medicamento ya está aprobado en Europa y Japón para el tratamiento de esta patología. En cuanto al bloqueo de CTGF, FG-3019, un anticuerpo anti-CTGF, se ha probado en muchos ensayos clínicos tempranos en fibrosis y ha avanzado a ensayos de fase 2 en FPI y fibrosis hepática (4).

Por otro lado, el Nintedanib, un inhibidor de los receptores tirosina quinasa de PDGF, el factor de crecimiento de fibroblastos y VEGF, se emplea para el tratamiento de la FPI en Europa y EE.UU (129).

Otra estrategia se basa en el uso de bloqueadores de la endotelina. En este sentido, se demostró que el Atrasentan, un antagonista de los receptores de la endotelina, era capaz de reducir la albuminuria en pacientes con enfermedad renal diabética. Sin embargo, presenta efectos secundarios, como la retención de líquidos, que limitan su uso (127).

Debido a que TNF es una citoquina que se ha visto implicada en procesos fibróticos, emplearla como diana terapéutica puede tener efectos positivos. Se ha observado que la administración local de anti-TNF inhibe la actividad contráctil de los miofibroblastos derivados de los pacientes de Dupuytren, una patología fibrótica de la fascia palmar, los cuales redujeron la expresión de α SMA (130).

Por su parte, IFN γ es el antifibrótico más utilizado. Un estudio realizado con 330 pacientes con FPI mostró que el empleo de esta citoquina favorecía una disminución de la mortalidad en el

momento de iniciar el estudio, indicando que la efectividad de este tratamiento tiene lugar, principalmente, durante las fases iniciales de la enfermedad (126).

Por su parte, en fibrosis renal, muchos ensayos clínicos han confirmado la importancia de inhibir el RAS. Por ello, actualmente, la terapia estándar para tratar a los pacientes con ERC es bloquear el RAS utilizando inhibidores de la ECA o bloqueadores de los receptores de AngII (127).

En resumen, se están explorando múltiples estrategias y tratamientos que permitan afrontar el proceso fibrótico y acabar con la fibrosis asociada a patologías crónicas. Pese a todo, aún no se han encontrado dianas terapéuticas 100% efectivas, que consigan frenar o incluso revertir la fibrosis, y sin presentar efectos secundarios. Por ello, aún queda mucho camino, y se hace necesario seguir investigando múltiples vías y mecanismos que permitan desarrollar tratamientos para afrontar los desafíos que suponen los procesos fibróticos.

1.3 Neuropeptido Cortistatina

Como se ha indicado, debido a la incidencia de las patologías fibróticas y a la falta de terapias efectivas, surge la necesidad de buscar nuevos factores capaces de afrontar de forma específica el proceso fibrótico. En este sentido surge Cortistatina, un neuropeptido que podría jugar un papel importante en la regulación de los procesos de fibrosis, actuando como un factor endógeno de susceptibilidad a sufrir fibrosis y como una diana terapéutica en el caso de padecerla. A continuación, se detallan los aspectos generales del péptido, así como su papel en la regulación del sistema inmunológico y los antecedentes que ponen de manifiesto que Cortistatina podría tener un papel relevante en los procesos fibróticos.

1.3.1 Aspectos generales de Cortistatina

Cortistatina es un neuropeptido cíclico descubierto hace en torno a 25 años, de expresión circadiana, cuyo nombre lo recibe en base a su elevada expresión cortical y a su habilidad de suprimir la actividad neuronal en esa región, antagonizando el efecto del neuropeptido acetilcolina. Fue en 1996 cuando se obtuvo su ADNc (ADN complementario) del cerebro de rata y se llevó a cabo su caracterización inicial por Luis De Lecea y colaboradores (131). Se sintetiza como pre-pro-Cortistatina con 112 aminoácidos en rata, 108 en ratón y 114 en humano. La molécula de pre-pro-Cortistatina presenta una señal de secreción en la región amino-terminal de 27 residuos, que es eliminada dando lugar a la molécula de pro-Cortistatina (132,133). Esta molécula incluye una serie de di-aminoácidos básicos (KR, RK, KK, RR) en la región carboxilo-terminal, que constituyen sitios de acción de prohormonas convertasas. Al actuar estas enzimas sobre dichos aminoácidos se obtienen las moléculas de Cortistatina propiamente dichas. Según el par de aminoácidos sobre los que actúen las enzimas se obtienen moléculas de Cortistatina de diferentes tamaños, de las cuales las más relevantes biológicamente tanto en rata como en ratón son Cortistatina-14 y Cortistatina-29 (de 14 y 29 aminoácidos respectivamente); mientras que en humano son Cortistatina-17 y Cortistatina-29 (de 17 y 29 aminoácidos). Las moléculas de Cortistatina de rata y ratón presentan una elevada homología (90%) entre sí, mientras que la de rata y humano presentan una homología del 71% y la de ratón y humano de un 55% (132,133). Además, en el procesamiento proteolítico se generan otras formas de Cortistatina como Cortistatina-13, cuya función biológica aún no se conoce.

Aunque la expresión de Cortistatina se observa principalmente en la corteza cerebral y el hipocampo, otras zonas cerebrales, tales como el bulbo olfatorio, el cuerpo estriado y el hipotálamo también muestran expresión de su ARNm (ARN mensajero), aunque a niveles mucho más bajos. Además, su expresión también se ha podido comprobar en otros órganos periféricos como son el corazón, pulmón, próstata, colon, riñón y páncreas entre otros, así como en muchos tumores (132,134). Así, Cortistatina es liberada por: i) células del sistema nervioso: pese a que inicialmente se encontraron en interneuronas GABAérgicas del córtex y del hipocampo, también es liberada por la microglía, los astrocitos y por las neuronas nociceptivas periféricas; ii) células endoteliales y células musculares lisas; iii) células endocrinas: el ARNm de Cortistatina se expresa en la glándula adrenal, tiroides, paratiroides, estómago, yeyuno, íleon, colon, recto, riñones y ano; y la proteína Cortistatina es expresada por células del tracto gastrointestinal, células neuroendocrinas, y pancreáticas; y iv) células del sistema inmunológico: principalmente los linfocitos T y B, los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas (132).

Cortistatina pertenece a la misma familia que el neuropéptido Somatostatina (SST), con la cual presenta una alta homología, siendo ambos productos de diferentes genes situados en diferentes cromosomas. Así, el gen de Somatostatina (*somatostatina*) de ratón se encuentra en el cromosoma 16, mientras que el de Cortistatina (*cortistatina*) se localiza en el cromosoma 4. En el caso del gen *cortistatina* humano, este se localiza en el brazo corto del cromosoma uno (1p36.22) (Gene ID: 1325. NCBI) (135,136), mientras que *somatostatina* se localiza en el brazo largo del cromosoma 3 (3q27.3) (Gene ID: 6750. NCBI). La homología es tal que, por ejemplo, Cortistatina-14 de ratón comparte 11 de sus 14 aminoácidos con Somatostatina-14. Además, Cortistatina también presenta en su estructura los dos residuos de cisteína que permiten la formación de un puente disulfuro que da lugar a su conformación cíclica, y el dominio FWKT de Somatostatina que le permite unirse a sus receptores (Figura 11), SSTR (del inglés *Somatostatin Receptors*) (SSTR1, SSTR2A, SSTR2B, SSTR3, SSTR4 y SSTR5). Cortistatina puede unirse también a variantes truncadas de SSTR5 (137,138). La unión a estos receptores le permite a Cortistatina presentar algunas de las funciones propias de Somatostatina, por medio de la disminución de la actividad de la enzima adenilato ciclasa con la consiguiente disminución de la cantidad de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) citoplasmática, un importante segundo mensajero en la señalización celular (131,139,140). Además, también se induce la activación de canales de potasio, lo que favorece la salida de este ion al espacio extracelular y la hiperpolarización de la célula, teniendo como consecuencia secundaria el descenso del calcio intracelular y la disminución de la actividad de la PKC, importante en la señalización celular (131,139) (Figura 12a). Entre las funciones que Cortistatina y Somatostatina tienen en común se incluyen la depresión de la actividad neuronal, la inhibición de la proliferación celular y regulación de secreciones endocrinas y exocrinas (131,133).



Figura 11. Comparación entre la estructura secundaria de Cortistatina y Somatostatina de ratón

Se muestran las estructuras de Cortistatina-29 y Cortistatina-14; y de Somatostatina-28 y Somatostatina-14. Se indica el puente disulfuro entre los dos aminoácidos de cisteína (C-C). En amarillo, se resalta el dominio FWKT que permite la unión de las moléculas a los receptores de Somatostatina.

Pese a la homología que Somatostatina y Cortistatina presentan, a la capacidad de Cortistatina de unirse a los receptores de Somatostatina y a las funciones que los dos neuropéptidos tienen en común, se ha observado que la expresión de ambos tanto a nivel del sistema nervioso central como a nivel periférico no se superponen con precisión ni se regulan de la misma forma (141,142). Además, se ha reportado que Cortistatina presenta funciones propias y diferentes a las que ejerce Somatostatina. Así, se ha comprobado que Cortistatina induce el sueño de onda corta, antagonizando el efecto del neuropéptido acetilcolina, mientras que Somatostatina ejerce un efecto contrario. Cortistatina también es responsable de la reducción de la actividad locomotora (131,133). Por otro lado, Cortistatina inhibe la calcificación vascular. De hecho, en un estudio publicado en 2009 se demostró en un modelo de calcificación vascular en ratas que el tratamiento con Cortistatina mejoraba significativamente los valores hemodinámicos y la distensibilidad arterial, hecho reflejado en aspectos como la disminución de la presión sanguínea o la disminución del depósito de calcio, entre otros. También se observó *in vitro* una inhibición dosis-dependiente de la calcificación de las células musculares lisas vasculares (143). Cortistatina, al igual que Somatostatina, lleva a cabo la regulación de las funciones neuroendocrinas. Sin embargo, esta regulación no siempre se produce de la misma manera. Por ejemplo, se ha observado que Cortistatina aumenta la producción de prolactina, mientras que Somatostatina la inhibe (142). Además, es importante destacar que Cortistatina, pero no Somatostatina, es expresada por células inmunológicas, lo que pone de manifiesto su papel inmunorregulador (140,141), que se detallará en el apartado 1.3.2.

La capacidad de Cortistatina para llevar a cabo estas funciones propias y diferentes de Somatostatina parece depender de dos residuos adyacentes inmediatamente al puente disulfuro (P y K) y de su capacidad de unión a otros receptores diferentes a los de Somatostatina. De hecho, Cortistatina es capaz de unirse al receptor de Grelina GHSR1 α (del inglés *Growth Hormone Secretagogue Receptor Type 1 α*) con tanta afinidad como Grelina (144), favoreciendo la vía cAMP/PKA. De manera que, de forma opuesta a los receptores de Somatostatina, la activación del receptor GHSR1 α induce a la actividad de la adenilato ciclasa favoreciendo un aumento de la cAMP citoplasmática lo cual activa, a su vez, a la enzima PKA y desencadena la señalización celular (Figura 12b). Además, Cortistatina también puede interactuar con el receptor huérfano humano MrgX2 (del inglés *Mas-related gene X2 receptor*) (145), expresado en células de la raíz del ganglio dorsal y los mastocitos, el cual favorece el influjo de calcio al citoplasma (Figura 12c). Finalmente, es posible que Cortistatina se una a otros receptores específicos aún no descritos

(Figura 12d). La unión de Cortistatina a estos receptores diferentes a los de Somatostatina podría explicar las diferentes acciones que ambos pueden realizar. Además, la existencia de otros factores como la posible dimerización de los receptores de Somatostatina y/o la influencia de las proteínas accesorias pueden explicar las diferencias funcionales entre Somatostatina y Cortistatina (146). De manera que, dependiendo del contexto, el tipo celular y el receptor activado, Cortistatina desencadena la activación de diferentes rutas de señalización que incluyen variaciones en los niveles de cAMP, la inhibición/activación de diversas quinasas como PKC o PKA y variaciones en las concentraciones del calcio intracelular, lo que se refleja en las distintas funciones que puede llevar a cabo el neuropéptido.

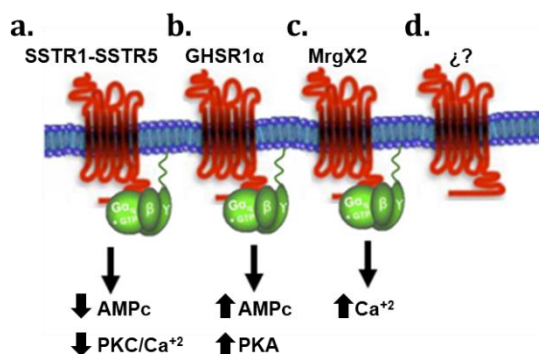


Figura 12. Receptores de Cortistatina

a) Receptores de Somatostatina SSTR1-SSTR5; b) receptor de Grelina GHSR1α; c) receptor humano MrgX2; d) otros posibles receptores aún no conocidos. Abreviaturas: AMPc, adenosina monofosfato cíclico; PKC, proteína quinasa C; Ca²⁺, ion de calcio; PKA, proteína quinasa A (adaptada de (147)).

1.3.2 Papel inmunorregulador de Cortistatina

Cuando se produce una infección o un trauma, la actuación del sistema inmunológico para poder resolver el problema es fundamental para la supervivencia del organismo afectado. Pese a que esta actuación es crucial, una vez eliminado el desafío, el proceso inflamatorio debe limitarse debido a que una respuesta excesiva puede provocar una inflamación crónica, seguida del correspondiente daño colateral del tejido. De hecho, una respuesta inflamatoria exacerbada y crónica aumenta el riesgo de desarrollar procesos de autoinmunidad, debido a que las células inmunitarias sobre-activadas comienzan a reconocer y reaccionar frente a antígenos propios (autoantígenos) (148). Aunque durante muchos años las investigaciones relacionadas con la promoción de la autotolerancia y la recuperación de la homeostasis inmunitaria se han centrado en la regulación de factores inmunosupresores tales como la IL10, el estudio de los neuropéptidos como potentes moduladores del sistema inmunológico con capacidad antiinflamatoria cada vez tiene más adeptos.

Se ha reportado que Cortistatina, pero no Somatostatina, es expresada por células del sistema inmunológico, tales como los linfocitos T y B, los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas. Además del neuropéptido, los receptores por los que Cortistatina ejerce sus acciones biológicas también son expresados en varias células inmunológicas (Tabla 2) (140,149).

Todo ello, indica que Cortistatina actúa regulando la actividad de estas células actuando a diferentes niveles como son la proliferación, la diferenciación o la activación de las mismas.

Células del SI	STT	CST	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	GHSR1 α	MrgX2
Timocitos	-	+	-	-	+	-	-	-	+
Linfocitos T	-	+	+	-	+	-	-	+	+
Linfocito B	-	+	+	-	+	-	-	+	-
Líneas celulares linfoides T y B	-	+	+	+	+	-	-	+	-
Monocitos	-	+	+	-	+	-	-	+	-
Macrófagos	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Células dendríticas	-	+	+	+	-	-	-	-	-

Tabla 2. Expresión Somatostatina (SST), Cortistatina (CST) y los diferentes receptores de Cortistatina en las distintas células del sistema inmunológico (SI) (tomada de (149))

Así, se ha observado que Cortistatina disminuye las funciones de los linfocitos T autorreactivos actuando directamente sobre la diferenciación de las células. Esto evita, a su vez, la infiltración y/o activación de neutrófilos y macrófagos, así como el depósito de inmunocomplejos (Figura 13a) (137,150). Además, inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias (tales como TNF α , IL1 β o IL6), quimioquinas (como CCL2, CCL3 o CCL5) y ROS por parte de los macrófagos y las células residentes (Figura 13b). Por otro lado, Cortistatina favorece la inducción de células T reguladoras con la consiguiente producción de IL10, de papel inmunosupresor, así como la inducción de las células TH2 (135,137) (Figura 13c). Finalmente, también se ha reportado que Cortistatina induce neuroprotección y/o neuroregeneración (Figura 13d) (137,151).

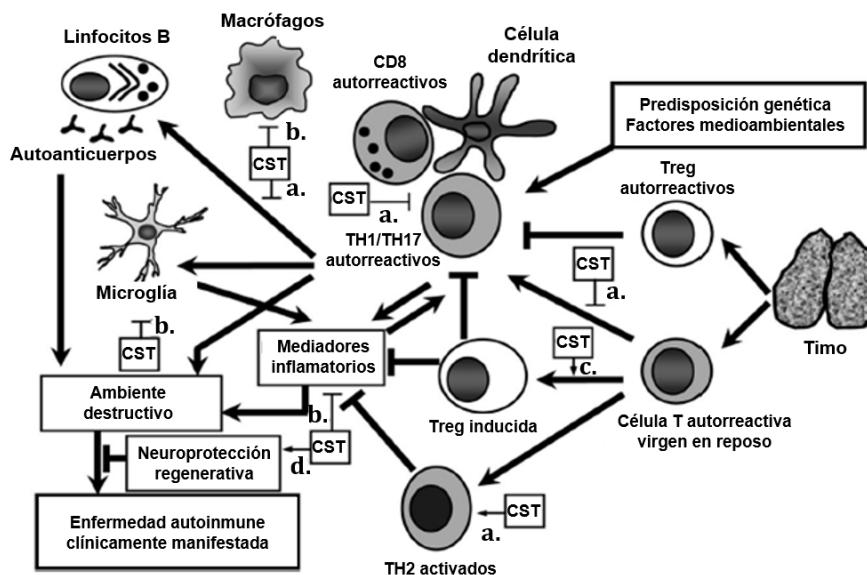


Figura 13. Papel inmunorregulador de Cortistatina

Cortistatina regula el sistema inmunológico actuando a diferentes niveles. Así, Cortistatina regula a los linfocitos TH1 y TH17 autorreactivos (a), los macrófagos y las células residentes (b) y los linfocitos T reguladores (c). Además, Cortistatina ejerce efectos neuroprotectores (d) (tomada de (137)).

El papel inmunorregulador que ejerce Cortistatina se ha visto en diversos modelos animales de inflamación y autoinmunidad, como son los modelos de artritis reumatoide, inflamación intestinal, choque séptico, esclerosis múltiple y miocarditis, entre otros. En dichos modelos, Cortistatina produjo una disminución de la severidad de la patología y de la letalidad, hechos relacionados con la disminución de linfocitos T autorreactivos y la respuesta inflamatoria, y la inducción de las células T reguladoras. En este sentido, en un estudio previo de nuestro laboratorio publicado en 2006, se observó que la administración de Cortistatina a un modelo murino de colitis mejoraba de forma significativa la gravedad de la patología inflamatoria, disminuyendo la pérdida de peso corporal, la diarrea y la inflamación, y aumentando la tasa de supervivencia de los animales. Estos hechos se relacionaron con la disminución de la respuesta autoinmune impulsada por las células TH1 y la participación de las células T reguladoras (152). En otra investigación publicada ese mismo año, se reportó que el tratamiento con Cortistatina de diversos modelos de shock séptico, como el modelo de endotoxemia, protegía a los animales contra la letalidad y evitaba la histopatología inflamatoria (153). Así mismo, en un modelo murino de artritis reumatoide, el tratamiento con el neuropéptido redujo de forma muy significativa la gravedad de la enfermedad, suprimiendo por completo la inflamación asociada (Figura 14a). Este efecto fue el resultado de la reducción de las respuestas TH1 y la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, y la activación de la respuesta T reguladora, tal y como se había observado en las investigaciones previas (154). Por otro lado, en un modelo de miocarditis en ratones, la administración de Cortistatina redujo de forma significativa la prevalencia y los signos de hipertrofia y lesión cardíaca de la patología e impidió la infiltración de células inflamatorias en el miocardio (Figura 14b). Además, se observó una correlación dosis-dependiente entre los niveles de Cortistatina y la gravedad de la enfermedad (155).

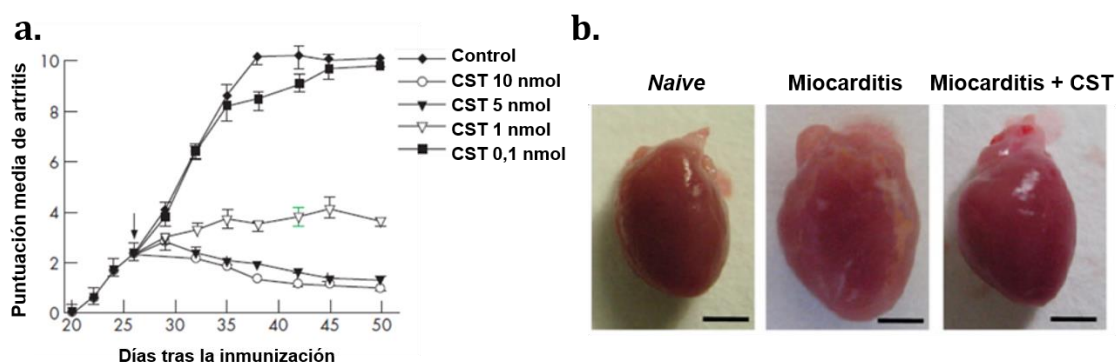


Figura 14. Efecto de Cortistatina en artritis reumatoide y miocarditis

a) La administración de Cortistatina elimina la inflamación asociada a un modelo murino de artritis reumatoide de manera dosis-dependiente (CST, Cortistatina). **b)** Cortistatina reduce los signos de hipertrofia y lesión cardíaca en un modelo de miocarditis murino. Los ratones que no fueron sometidos al modelo de miocarditis (ratones *Naive*) presentan un corazón normal; mientras que aquellos sometidos al modelo de miocarditis experimental autoinmune sufren hipertrofia, la cual se ve reducida al tratar a los animales con Cortistatina (tomadas de (154,155)).

Por otro lado, recientemente nuestro grupo ha reportado una investigación en la que la administración de Cortistatina a ratones con un modelo experimental de ALI provocado por la administración intranasal de LPS reduce de forma importante los signos patológicos de la enfermedad (156). Así, mientras que los ratones no tratados con Cortistatina mostraron un influjo importante de células inflamatorias en el pulmón, entre las que destacaron los neutrófilos, junto con una liberación exagerada de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias tales como $TNF\alpha$, $IL1\beta$, $IL6$ o $MIP1$, que dieron lugar a una mayor extravasación capilar, edema y acumulación de

proteínas en el pulmón; el tratamiento con Cortistatina redujo de forma notable todos estos marcadores, disminuyendo la infiltración leucocitaria y la producción de moléculas inflamatorias lo que se tradujo en una reducción de la inflamación pulmonar y el mantenimiento de la estructura alveolar (Figura 15a y b). Además, el tratamiento con Cortistatina de macrófagos aislados del BAL de los ratones con ALI redujo de forma significativa la producción de los mediadores inflamatorios (Figura 15c). Estos datos ponen de manifiesto el importante papel regulador de Cortistatina en los procesos inflamatorios asociados a ALI/ARDS.

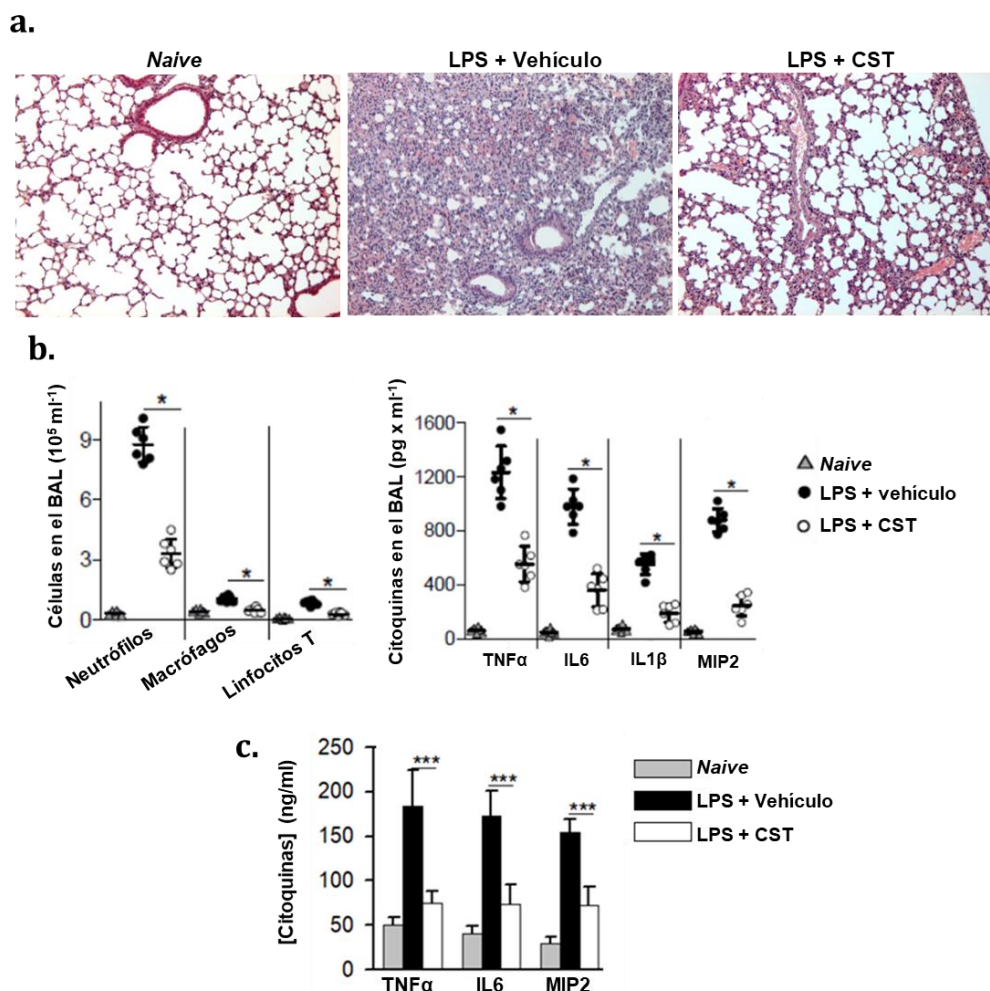


Figura 15. Efecto del tratamiento con Cortistatina de ratones con ALI

a) El tratamiento con Cortistatina reduce los signos histopatológicos de ALI inducida por LPS. **b)** La administración de Cortistatina a ratones con ALI reduce la infiltración celular y la producción de citoquinas proinflamatorias. **c)** La administración de Cortistatina a macrófagos procedentes de animales con ALI disminuye de forma significativa la producción de citoquinas proinflamatorias (156).

Finalmente, un hecho curioso observado en 2013 por E. González Rey y colaboradores en un modelo murino de esclerosis múltiple (modelo de encefalomiелitis experimental autoinmune) es que Cortistatina endógena puede presentar efectos paradójicos (151). En su investigación, observaron que ratones con expresión nula de Cortistatina (animales *knockout*) presentaban un retraso en la aparición de los síntomas de la enfermedad y un índice clínico reducido, en comparación a los ratones con expresión normal del neuropéptido (ratones *wild-type*). Los mismos resultados se obtuvieron en el modelo de artritis reumatoide, colitis crónica y sepsis. Debido a la relación entre el sistema inmunológico y el neuroendocrino en la recuperación de la homeostasis inmunológica, se pasó a estudiar el segundo. El resultado obtenido de este estudio

reflejaba que los ratones *knockout* para Cortistatina tenían niveles aumentados de glucocorticoides antiinflamatorios en comparación con animales *wild-type*. La explicación de este hecho es que Cortistatina regula y disminuye la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y, por tanto, los ratones con ausencia total del neuropéptido tienen la actividad de ese eje aumentada, favoreciendo una inmunosupresión generalizada y una disminución de la severidad de las enfermedades autoinmunes inducidas. Sin embargo, en ese mismo trabajo se reportó que era en la inflamación sistémica y no en la local donde se observaban estos efectos. De hecho, en un modelo de artritis monoarticular de rodilla la falta de Cortistatina aumentó la susceptibilidad a sufrir un proceso inflamatorio local, con mayores niveles de TNF α y MPO, y un diámetro mayor de la articulación. Por otro lado, otros estudios realizados con animales deficientes para Cortistatina, indican que la falta del neuropéptido genera una exacerbación de la enfermedad. Así, en el modelo de ALI inducido por LPS, la falta de Cortistatina tanto parcial como total, favoreció el desarrollo de un proceso inflamatorio significativamente aumentado en comparación con los animales con expresión normal. Esto se vio reflejado en una mayor extravasación de células proinflamatorias, una mayor producción citoquinas y quimioquinas, y edema, lo que se tradujo en un incremento del daño pulmonar (156). Por su parte, en otro estudio publicado en 2020 sobre la implicación de Cortistatina en la inflamación de las vías respiratorias asociada a asma se observó que los ratones deficientes en la expresión de Cortistatina presentaban respuestas asmáticas exageradas en comparación con ratones con una expresión normal del neuropéptido. Este hecho se relacionó con una regulación de Cortistatina sobre la quimioquina CCL2 y la vía de señalización Nf- κ B (157). Por tanto, aún son necesarios más estudios que sean capaces de dilucidar este efecto paradójico observado para Cortistatina.

1.3.3 Papel de Cortistatina en los procesos de fibrosis

Además de su papel como molécula inmunorreguladora y antiinflamatoria hay evidencias que sugieren que Cortistatina podría tener efectos reguladores beneficiosos y directos sobre las respuestas fibróticas asociadas a patologías crónicas. Entre dichas evidencias se encuentra el hecho de que Cortistatina se expresa en tejidos afectados por la fibrosis generada tras un daño crónico, tales como la piel, los pulmones, el corazón, los riñones y el hígado.

Otra evidencia importante sobre el posible papel de Cortistatina en la regulación de los procesos de fibrosis es que el neuropéptido actúa por medio de los receptores de Somatostatina y Grelina, péptidos que presentan funciones antifibróticas. Así, se ha observado que Somatostatina y sus análogos ejercen efectos antifibróticos en varios modelos animales de fibrosis intestinal, de hígado y de pulmón. En este sentido, por ejemplo, Borie R. y colaboradores publicaron en 2008 un trabajo en el que generaron un modelo de FPI mediante inyección intra-traqueal de Bleomicina y estudiaron el efecto de la administración de un análogo de Somatostatina denominado SOM230. Observaron que dicho tratamiento reducía la inflamación y la infiltración de células del sistema inmunológico en el pulmón y el líquido alveolar. Además, también se redujo la proliferación de fibroblastos dependientes de TGF β , así como la producción de colágeno, y se indujo la expresión de mediadores antifibróticos (158). Por otro lado, en un trabajo en el que se cuantificó en ratas el incremento del volumen pulmonar como consecuencia de la acumulación de MEC mediante imagen de resonancia magnética tras la administración de Bleomicina, se observó que la administración de SOM230 presentaba efectos terapéuticos y reducía el edema generado en los animales tratados (159). Por su parte, en un estudio publicado en 1993 los investigadores comprobaron que la administración de un análogo de Somatostatina llamado Octreótido a

animales con un modelo de fibrosis hepática inducida por ligación del ducto biliar, disminuía la proliferación celular en las vías biliares y la acumulación de MEC periportal (160). Además, se ha visto que Octreótido inhibe la actividad de las células HSC. Así, Han y colaboradores observaron que las células LX2, una línea inmortalizada de células HSC, veían reducida su proliferación, así como su capacidad para expresar TGF β y α SMA, y para liberar endotelina-1 y colágeno cuando eran expuestas a Octreótido (161). En 2018, otro estudio en el que los investigadores probaron ese mismo análogo de Somatostatina, Octeotrido, en un modelo de fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono en ratas también hallaron que el tratamiento con el mismo disminuía la expresión de marcadores de fibrosis como α SMA y colágeno tipo I. Además, observaron que, *in vitro*, las células LX2 disminuían su proliferación de forma proporcional a la concentración de Octreótido empleada, así como la expresión de los factores implicados en la vía Wnt/ β -catenina, asociando así el mecanismo antifibrótico de Octreótido a dicha vía (162).

Por su parte, se ha observado que también Grelina presenta efectos antifibróticos. En un estudio publicado en 2013 por Y. Ota y colaboradores se reportó que en pacientes de SSc los niveles de Grelina, pero no de su receptor GHSR1 α , se encontraban disminuidos, y que la severidad de la enfermedad era dependiente de la disminución de Grelina acilada. En ese mismo trabajo, también se observó que la administración de Grelina a cultivos de fibroblastos procedentes de estos pacientes disminuía la expresión de TGF β , así como la producción de colágeno tipo I (163). En otro estudio publicado ese mismo año por Koca y colaboradores se obtuvo que el tratamiento con Grelina de un modelo murino de SSc inducida por Bleomicina favorecía una reducción en el engrosamiento dérmico, así como una disminución de la actividad de los miofibroblastos y de la infiltración inflamatoria (164). En otro trabajo publicado en 2010 se observó que la administración de Grelina recombinante atenuaba los procesos de fibrosis en el hígado y que animales deficientes en el péptido desarrollaban una fibrosis hepática exacerbada. Además, se observó que en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas los niveles de Grelina disminuían en el suero conforme avanzaba la patología, y la expresión de Grelina hepática se correlacionaba con la expresión de marcadores de fibrosis (165).

Debido a que Cortistatina tiene un papel inmunorregulador más potente que Somatostatina y Grelina, y que actúa por medio de los receptores de ambos neuropéptidos, sería lógico pensar que Cortistatina puede tener un potencial papel antifibrótico más efectivo. Por otro lado, no hay estudios que evidencien que la disminución de Somatostatina endógena se relacione con sufrir un proceso fibrótico más o menos exacerbado; mientras que de Grelina sólo hay una investigación que reporte que la disminución de su concentración en el suero de pacientes con SSc se encontraba relacionada con la progresión de la patología (165). Por tanto, no existen antecedentes suficientes que pongan de relieve el papel de Somatostatina y Grelina como biomarcadores o factores endógenos de susceptibilidad a sufrir fibrosis, papel que podría jugar Cortistatina debido a su posible función en la regulación de los procesos fibróticos.

Además, las células involucradas en respuestas fibrogénicas, como los fibroblastos de piel, pulmón y corazón, las HSC, las células epiteliales pulmonares y las células mesangiales presentan receptores del neuropéptido (161,163–166).

Por otro lado, hay estudios que indican que Cortistatina también puede ser expresada por células que no son fibrogénicas pero que están relacionadas con fibrosis, entre las que se encuentran las células endoteliales, las células musculares lisas (Figura 16a) y los pericitos

vasculares (137,167). Además de ser fuente del neuropéptido, estas mismas células presentan receptores para el mismo, regulando así Cortistatina la actividad de células que no son efectoras fibrogénicas pero que tienen papeles profibróticos. En este sentido, en un estudio publicado por nuestro grupo en 2013 (167) se reportó que al recrear una situación de aterosclerosis por medio de la ligación de la arteria carótida en ratones, los niveles de Cortistatina aumentaban de forma proporcional a la respuesta de las células al tipo de ligación, parcial o total. Además, ratones deficientes para la expresión de Cortistatina desarrollaron un mayor grado de lesión que los ratones de expresión normal. Los investigadores también comprobaron que las células musculares lisas de carótidas y arterias aórticas de ratón, así como las placas ateroscleróticas humanas, presentaban una elevada expresión de Cortistatina. Además, en un estudio *in vitro*, se observó que Cortistatina inhibía la proliferación de las células musculares lisas humanas activadas por PDGF (Figura 16b), por medio de su interacción con los receptores SSTR2, SSTR5 y GHSR1 α y la inducción de cAMP y p38 MAPK, y la inhibición de la actividad de las MAPKs AKT y ERK. Así mismo, se observó que la administración de Cortistatina también afectaba a la migración de estas células (Figura 16c) inhibiendo la formación de lamelipodios, por medio de su interacción con GHSR1 α . Todos estos hechos constituyen evidencias del papel antifibrótico indirecto de Cortistatina. Sin embargo, se hace necesario estudiar el papel directo de Cortistatina sobre las células efectoras fibrogénicas, tales como los fibroblastos. Además, se ha visto que Cortistatina presenta efectos anti-angiogénicos, lo que limita la progresión fibrótica (167–169).

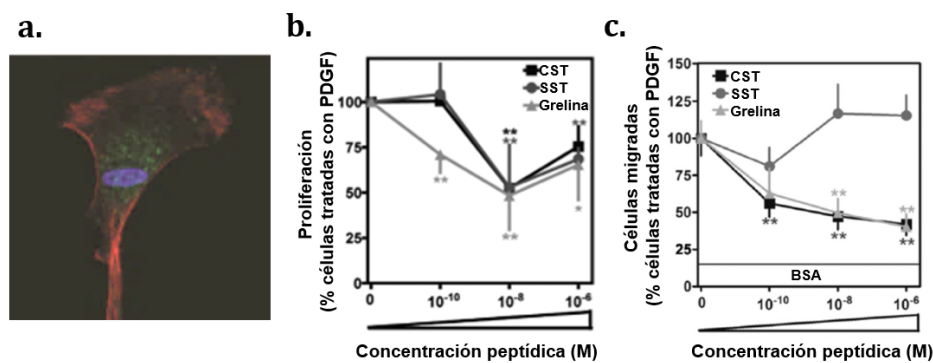


Figura 16. Presencia de Cortistatina en células relacionadas con fibrosis y sus efectos sobre la proliferación y la migración de las mismas

Cortistatina se expresa en células implicadas en fibrosis tales como las células musculares lisas de carótidas de ratón (en verde se marca Cortistatina, en rojo α SMA y en azul el núcleo celular) (a) sobre las cuales actúa disminuyendo su proliferación (b) y su migración (c). CST, Cortistatina; SST, Somatostatina; (tomadas de (167)).

Por otro lado, Cortistatina también inhibe la progresión de la aterosclerosis y la formación de células espumosas a través de la promoción del eflujo de colesterol en macrófagos. Esta función la realiza por medio de mecanismos que involucran la inducción de la expresión de PPAR γ (Figura 19a) (170), factor que disminuye las respuestas fibróticas y que favorece la conversión de los macrófagos de fenotipo proinflamatorio (fenotipo M1) a fenotipo antiinflamatorio (fenotipo M2) (63). De hecho, Cortistatina es producida por los macrófagos durante la respuesta inflamatoria, regulando la liberación de citoquinas involucradas en la progresión de la fibrosis (152,153). Incluso se ha reportado que los macrófagos aislados de ratones con deficiencia en Cortistatina respondieron con respuestas inflamatorias exacerbadas tras la estimulación con LPS, lo que refuerza la hipótesis de que Cortistatina actúa como una ruptura endógena de la inflamación (Figura 19b) (151).

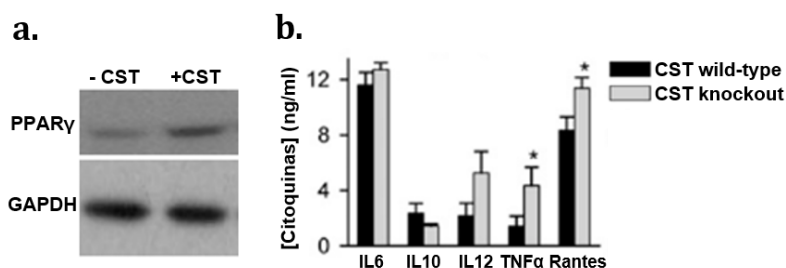


Figura 17. Efecto de Cortistatina en macrófagos

Cortistatina endógena induce la expresión de PPAR γ (a) y disminuye la respuesta proinflamatoria (b) de los macrófagos estimulados con LPS (tomadas de (151,170)).

En resumen, el hecho de que: i) Cortistatina tenga un elevado potencial inmunorregulador; ii) Cortistatina actúe por medio de los receptores de Somatostatina y Grelina (neuropéptidos con un papel inmunorregulador y antifibrótico); iii) tanto los receptores de Cortistatina como el propio neuropéptido sean expresados por células relacionadas con fibrosis; iv) Cortistatina sea expresada en tejidos que suelen verse afectados por fibrosis; v) Cortistatina regula las rutas de señalización relacionadas con fibrosis tales como las vías de las MAPKs p38, AKT y ERK; y que vi) Cortistatina tiene efectos beneficiosos en miocarditis, patología caracterizada por la inflamación e infiltración de células del sistema inmunológico en el miocardio con la subsiguiente pérdida de miocitos y la generación de fibrosis; refuerza la idea de que este neuropéptido puede contribuir de forma importante en la regulación de las respuestas fibróticas asociadas a patologías crónicas, actuando como un factor endógeno de susceptibilidad a padecer patologías fibróticas y como una posible diana terapéutica para tratarlas.

1.4 Vehiculización, protección y biodisponibilidad de las moléculas farmacológicas

Como ya se ha descrito, en la actualidad las terapias de las patologías asociadas a fibrosis crónica se basan en el uso de tratamientos dirigidos a paliar los síntomas de la enfermedad, pero sin “atacar” el problema central, el proceso fibrótico. Y, si bien es cierto que ya se están empezando a desarrollar algunos tratamientos más específicos, la biología de cada individuo, las dosis, el tipo y la frecuencia de administración o la especificidad de acción del tratamiento en cuestión son parámetros que necesitan ser revisados con el fin de lograr la mayor eficiencia posible del mismo. Además, un aspecto especialmente necesario a tener en cuenta es la vida media de las diferentes moléculas empleadas. De hecho, en el caso de los neuropéptidos la vida media se ve muy reducida debido a la acción de las peptidasas tisulares y plasmáticas. Por tanto, los neuropéptidos presentan un intervalo de tiempo bastante limitado para poder ejercer sus acciones, una vez alcanzado el sitio de acción. Debido a ello, se hace necesario administrar dosis elevadas y frecuentes de la molécula para poder obtener los resultados terapéuticos deseados. Además, debido a esto y a la presencia de receptores de estas moléculas en múltiples localizaciones del organismo, surge la posibilidad de generar efectos pleiotrópicos. Por ello, el desarrollo de estrategias que permitan por un lado aumentar la vida media de las moléculas empleadas en terapia y, por otro, focalizar su acción en el lugar deseado es un objetivo muy importante a considerar.

Entre las diferentes estrategias que tienen en cuenta estos aspectos se encuentra la nanotecnología farmacéutica, la cual considera que la vehiculización de los principios activos

puede hacer más eficiente la administración de los fármacos (171). Existen una variedad de nanopartículas empleadas para vehicular los fármacos, como las nanocápsulas, los nanotubos de carbono, los fullerenos, los dendrímeros, etc (172). Un ejemplo del empleo de nanopartículas en fibrosis es el uso de nanocápsulas con la enzima colagenasa tipo I, metaloproteínasa que rompe los enlaces generados entre las fibras de colágeno de la MEC (173). Sin embargo, pese a que estas nanopartículas pueden ofrecer importantes ventajas frente al uso de fármacos de manera convencional, como son una disminución en los efectos secundarios o una mayor versatilidad en el diseño de las formulaciones, hay otros aspectos importantes a tener en cuenta como su posible toxicidad o la biodisposición del fármaco (174).

Otro mecanismo de vehiculización de fármacos se basa en el empleo de vectores virales, los cuales consisten en virus modificados para que sean seguros (eliminando los genes que les dan su capacidad patógena), pero que mantienen sus capacidades para transferir y expresar el material genético recombinante. Debido a esta capacidad, los vectores virales son empleados para llevar a cabo la liberación de secuencias génicas específicas en tipos celulares concretos en terapia génica. Los vectores virales incluyen diversos tipos víricos entre los que se encuentran los retrovirus y lentivirus, adenovirus, el virus adenoasociado y el virus del herpes simple (175). Sin embargo, estos vectores pueden presentar una serie de desventajas que varían en función del virus del que procedan, tales como la admisión de un tamaño limitado del transgén, la expresión temporal, el tropismo por un tejido específico, la integración aleatoria o la generación de una respuesta inmunológica elevada, entre otros (176).

Por otro lado, otro método no viral de liberación de genes y principios activos es el mecanismo basado en liposomas, pequeñas partículas esféricas constituidas por una bicapa de fosfolípidos. Entre las ventajas de esta aproximación se encuentra su nula patogenicidad, su amplio rango de uso (pues se pueden emplear para vehicular múltiples tratamientos como drogas de bajo peso molecular, proteínas terapéuticas o ácidos nucleicos), su bajo coste y su fácil producción y administración (pueden administrarse por diversas vías según la necesidad, dérmica, intravenosa, aérea...). Sin embargo, su eficiencia de transfección y eficacia son algo bajas en comparación con otras aproximaciones como son los vectores virales (175).

Otro método de mantener latente el principio activo y aumentar su vida media es el empleo de biopolímeros basados en el uso de elastina. Estos biopolímeros se encuentran formados por la repetición de un dominio hidrofóbico de la proteína tropoelastina humana, y responden a un estímulo, la temperatura, de forma que a un rango de temperatura determinado permanecen solubles, mientras que al superarlo adquieren un estado amorfo. Este cambio es reversible permitiendo a la estructura volver a su conformación original al invertir la temperatura. La unión de moléculas terapéuticas de bajo peso molecular a estos biopolímeros permite la generación de estructuras en las cuales el principio activo queda protegido por la elastina hasta el momento en el que esta cambia de conformación permitiendo su liberación, lo que favorece una disminución de la toxicidad y un aumento de la eficacia del tratamiento (177).

Otra forma de conseguir el efecto terapéutico, pero con mayor control en la toxicidad es el uso de las denominadas prodrogas. Este método se basa en el uso de una sustancia activa, cuya estructura se modifica con el fin de obtener una molécula en la cual el principio activo queda protegido frente a la degradación, y que permanece de forma latente en el organismo siendo capaz de activarse de forma específica en el lugar donde debe ejercer su acción biológica (171). De esta forma, se consigue, por un lado, alargar la vida media del compuesto latente y, por otro, aumentar

su especificidad de acción. Una ventaja destacable de esta aproximación frente a la expuestas anteriormente se encuentra en la posibilidad de generar prodrogas basadas en moléculas ya existentes en el organismo, tales como neuropéptidos o citoquinas, de manera que se conseguiría potenciar el efecto terapéutico naturalmente presente en el individuo. Por otro lado, este mecanismo es especialmente útil en aquellas aproximaciones que emplean como tratamiento moléculas con una vida media corta y que sufren una rápida degradación (en pocas horas o, incluso, minutos), disminuyendo su efectividad. Entre estas moléculas se encuentran citoquinas como IFN β , o neuropéptidos como Cortistatina, cuya vida media a temperatura ambiente es de 30 minutos, aproximadamente. Una estrategia basada en este principio es la de crear una construcción similar a la molécula latente de TGF β . Basándose en la estructura de TGF β latente G. Adams y colaboradores reportaron en 2003 una estrategia capaz de incrementar la vida media de las citoquinas empleadas en inmunoterapia (178). Mediante esta estrategia, generaron una molécula latente de IFN β la cual se encontraba protegida por un escudo molecular frente a la degradación y podía ser activada en condiciones de inflamación, tal y como observaron en el líquido sinovial de pacientes de artritis reumatoide. La estructura de la molécula consistía en un fragmento de la secuencia madura de la secuencia LAP de TGF β 1 (que comprende los aminoácidos L29-S273), seguido de una secuencia espaciadora (del inglés *Linker 1*, L1: GGGGA), un sitio de corte para MMPs y otra secuencia espaciadora (del inglés *Linker 2*, L2: GGGGAAA), generando una construcción “LAPL1MMPL2”. Esta construcción se unió a una molécula de IFN β por su región amino-terminal (LAPL1MMPL2-IFN β) o por la carboxilo-terminal (IFN β -LAPL1MMPL2). Al dimerizar dos moléculas de este tipo por las regiones LAP se obtuvieron dos estructuras (en función de si dimerizaban dos LAPL1MMPL2-IFN β o dos IFN β -LAPL1MMPL2) (Figura 18). Se observó que la molécula IFN β -LAPL1MMPL2 presentaba mayor actividad, mientras que LAPL1MMPL2-IFN β tenía una conformación muy similar a la de TGF β 1 y permanecía latente o inactiva. Así, se vio que solo en ambientes ricos en MMPs, como el ambiente inflamatorio que se da en artritis reumatoide, LAPL1MMPL2-IFN β podía ser hidrolizado, liberando a la citoquina para ejercer su acción de forma localizada (178). Posteriormente, en 2016, el mismo grupo reportó resultados similares mediante la generación de moléculas LAPL1MMPL2-VIP (VIP: Péptido Vasoactivo Intestinal, del inglés *Vasoactive Intestinal Peptide*) y LAPL1MMPL2-MSHs (MSH: Hormona Estimulante de Melanocitos, del inglés *Melanocyte Stimulating Hormones*). Además, se observó que, debido a la mayor protección frente a la degradación que ofrece esa estructura, la cantidad de citoquina latente necesaria para obtener resultados era mucho menor que la cantidad de citoquina libre, siendo 30 veces menor en el caso de LAPL1MMPL2-MSH que de MSH libre, por ejemplo (179).

Por último, un aspecto importante a tener en cuenta de esta aproximación es que se basa en un mecanismo natural de latencia implicado en fibrosis: el mecanismo de latencia de LAP-TGF β . Por lo tanto, el desarrollo de una molécula de Cortistatina latente basada en el mismo podría suponer una herramienta especialmente útil y de interés para el tratamiento de diversas patologías, como las inflamatorias y, en concreto, las fibróticas. Por un lado, favorecería una mayor vida media del compuesto en el organismo del individuo tratado, una activación localizada del mismo en la zona dañada, así como un aumento en su biodisponibilidad que haría necesaria menos cantidad de Cortistatina para obtener resultados beneficiosos.

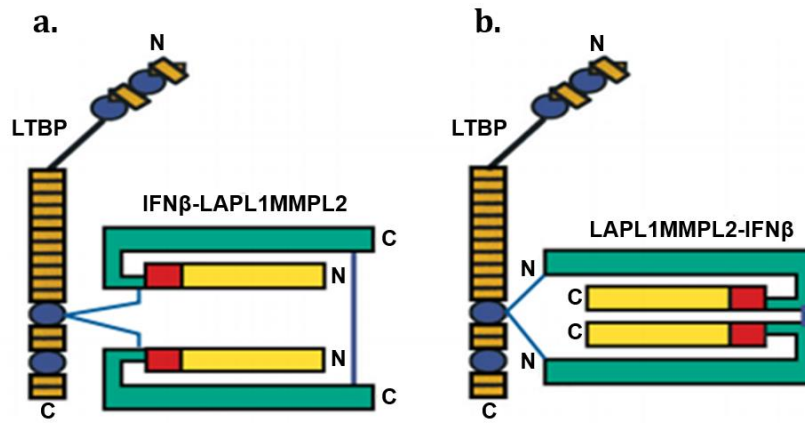


Figura 18. Conformaciones de la construcción de la citoquina latente

Se representa de forma esquemática la conformación dimérica de la construcción IFN β -LAPL1MMPL2 (a) y LAPL1MMPL2-IFN β (b) y su interacción con la proteína de unión al factor de crecimiento TGF β latente (LTBP), implicada en el direccionamiento de la excreción de TGF β a la MEC. En ambas construcciones se muestra en amarillo la molécula de IFN β , en rojo el fragmento que incluye los *linkers* y el sitio de corte de las MMPs y en verde la fracción LAP. En la región carboxilo-terminal de LAP se forman los puentes disulfuro que conectan los monómeros (tomada de (178)).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La fibrosis es una de las principales causas de enfermedades crónicas asociadas a órganos parenquimales, suponiendo en torno a un 45% de las muertes que se producen en el mundo desarrollado. Además, recientemente el proceso fibrótico ha cobrado más notoriedad debido a que la neumonía intersticial causada por el virus SARS-CoV-2 puede desembocar en un proceso fibrótico hipóxico de alta mortalidad. Pese a que, en las distintas patologías el proceso fibrótico es común y se encuentra muy conservado, aún no se han desarrollado tratamientos específicos capaces de actuar directamente sobre el mismo, siendo todos de carácter sintomatológico. Todo ello hace que sea de especial necesidad la búsqueda de factores de susceptibilidad y dianas terapéuticas que permitan frenar o incluso revertir dichos procesos. En este sentido, debido al papel que juega la inflamación en el establecimiento de la fibrosis, a la capacidad de Cortistatina para regular a las células del sistema inmunológico y a la existencia de numerosas evidencias de su posible acción sobre el propio proceso de fibrosis, nuestra hipótesis es que el neuropéptido Cortistatina puede tener un papel regulador importante en enfermedades fibróticas actuando a varios niveles y en diferentes fases de la enfermedad. Así, este neuropéptido tendría la capacidad, no sólo de evitar el desarrollo del proceso de fibrosis por medio de su papel antiinflamatorio, sino que también podría actuar de forma directa sobre las células efectoras fibrogénicas limitando su progresión o promoviendo la resolución de la fibrosis ya establecida. Estas acciones permitirían emplear a Cortistatina como un biomarcador de fibrosis y como un posible tratamiento frente a las patologías asociadas a procesos fibróticos. Sin embargo, un inconveniente que presenta el tratamiento con neuropéptidos desde el punto de vista clínico, es su corta vida media y su rápida degradación por parte de las peptidasas tisulares. Por tanto, para conseguir el efecto deseado se hace necesario administrar frecuentemente grandes dosis. Esta administración puede desencadenar la aparición de efectos pleiotrópicos debido a que sus receptores están distribuidos por todo el organismo. Teniendo esto en cuenta y, si es cierto que Cortistatina presenta un efecto terapéutico en enfermedades crónicas asociadas a procesos de fibrosis, entonces resulta de interés generar una herramienta molecular basada en el uso de este péptido, que aumente su vida media y su especificidad de acción.

Siguiendo esta hipótesis, los objetivos generales de este proyecto consisten en:

- 1) Estudiar el papel de Cortistatina en la regulación endógena de los procesos de fibrosis asociados a enfermedades crónicas relevantes.
- 2) Estudiar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el potencial efecto antifibrótico de Cortistatina.
- 3) Estudiar el posible efecto terapéutico de la administración de Cortistatina en enfermedades crónicas asociadas a procesos de fibrosis.
- 4) Desarrollar nuevas estrategias terapéuticas basadas en el uso de Cortistatina capaces de incrementar su eficacia en términos de biodisponibilidad.

Estrategia

Objetivo 1. Para evaluar el papel endógeno de Cortistatina en la regulación de procesos de fibrosis, se emplearon ratones C57BL/6J con una dotación génica normal (animales CST^{+/+}), parcial (animales CST^{+/-}) y nula (animales CST^{-/-}) de Cortistatina. Para poder evaluar el papel endógeno de Cortistatina en diferentes modelos preclínicos de desórdenes fibróticos que afectan a distintos órganos, se desarrollaron dos modelos experimentales de fibrosis: esclerodermia y fibrosis pulmonar, ambos inducidos mediante la administración intradermal e intratraqueal de

Bleomicina, respectivamente. Una vez finalizados los modelos, se obtuvieron las muestras de piel, pulmón y lavado broncoalveolar, y se analizaron tanto a nivel histológico como molecular.

Objetivo 2. Debido al ambiente heterogéneo y complejo a nivel celular y molecular existentes en los modelos *in vivo*, se hace muy complicado dilucidar si Cortistatina ejerce alguna acción directa sobre la fibrosis, o si el posible efecto antifibrótico se debe más bien a alguna acción indirecta del neuropéptido sobre el proceso inflamatorio previo. Por ello, se hace necesario un estudio *in vitro* en el que se empleen células efectoras fibrogénicas para estudiar el efecto directo de Cortistatina en la respuesta fibrótica. Para ello, se aislaron y cultivaron fibroblastos, principales células profibróticas, de la piel y los pulmones de animales $CST^{+/+}$, $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$. Para determinar si la falta de Cortistatina alteraba la respuesta fibrótica de estas células, los fibroblastos de los diferentes genotipos se activaron con TGF β 1 y se estudiaron los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la regulación de la respuesta fibrogénica.

Objetivo 3. Para poder analizar si Cortistatina presenta un efecto terapéutico en enfermedades crónicas asociadas a procesos de fibrosis se emplearon ratones C57BL/6J $CST^{+/+}$. A estos animales se les indujeron los modelos de esclerodermia y de fibrosis pulmonar mediante la administración de dosis altas de Bleomicina, con el fin de inducirles una fibrosis severa. Una vez bien establecido el proceso fibrótico, los animales fueron tratados con Cortistatina, tanto a nivel local como sistémico. Una vez finalizados los modelos, las muestras de piel y pulmón se analizaron tanto a nivel histológico como molecular.

Objetivo 4. Con el objetivo de incrementar la eficacia en términos de biodisponibilidad del tratamiento con Cortistatina y superar los inconvenientes asociados a su corta vida media y su rápida degradación, se buscó generar una construcción de Cortistatina latente, capaz de llevar a cabo su acción en el lugar de interés. Para ello, nos basamos en la estructura de la secuencia de latencia de TGF β , LAP, y una secuencia de corte de enzimas MMPs. De esta forma, la molécula de Cortistatina quedaría protegida por el escudo molecular que proporciona LAP y se escindiría en ambientes ricos en MMPs como son el inflamatorio y fibrótico, permitiendo la liberación de Cortistatina y su acción reguladora. Una vez generada la molécula de Cortistatina latente se determinó su eficacia y funcionalidad en los modelos de esclerodermia y fibrosis pulmonar inducidos mediante la administración de dosis altas de Bleomicina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Objetivo 1. Estudio del papel de Cortistatina en la regulación endógena de los procesos de fibrosis asociados a enfermedades crónicas relevantes

3.1.1 Animales de experimentación

Para llevar a cabo el estudio del papel de Cortistatina en la regulación endógena de los procesos de fibrosis (objetivo 1), se emplearon ratones C57BL/6J adultos (3 meses). En función de la expresión genética de Cortistatina, los animales se dividieron en tres grupos: un grupo de animales con una dotación génica normal (animales $CST^{+/+}$); un grupo con una dotación génica parcial del péptido (animales $CST^{+/-}$); y un grupo con una dotación génica nula de Cortistatina (animales $CST^{-/-}$). Inicialmente, la colonia de ratones C57BL/6J $CST^{-/-}$ se generó en colaboración con el Dr. Luis de Lecea (Univ. Stanford, USA) siguiendo los protocolos descritos previamente (142). Posteriormente se generaron ratones $CST^{+/-}$, por cruzamiento de C57BL/6J $CST^{-/-}$ hembras con C57BL/6J $CST^{+/+}$ machos, y el cruce de parejas reproductoras de ratones $CST^{+/-}$ fue la base para la generación de la colonia de ratones de los 3 genotipos: $CST^{+/+}$, $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$. Con la excepción del modelo de esclerodermia en el que solo se utilizaron ratones hembra por la mayor incidencia de esta enfermedad entre las mujeres, para el resto de experimentos se emplearon ratones tanto machos como hembras (20-24 g de peso corporal).

Todas las colonias fueron mantenidas en la Unidad de Experimentación Animal del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, donde recibieron los cuidados de los técnicos y veterinarios acreditados. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales (10 ratones/jaula con lecho de viruta de madera y material de anidación) en condiciones de alimentación estándar (Global Diet 2018, Harlan) y con agua del grifo *ad libitum* y bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas a una temperatura y humedad constantes ($22 \pm 1^\circ\text{C}$ y 60-70% de humedad relativa).

Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo a las pautas éticas de experimentación aprobadas por la el Comité de Cuidado y Uso Animal y el Comité Ético del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y realizadas de acuerdo a las pautas de la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo sobre el uso, manejo y protección de animales de laboratorio. Los modelos experimentales y los métodos empleados fueron aprobados por el Comité de la Unidad de Cuidados de Animales del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPBLN-CSIC).

3.1.2 Modelos de fibrosis y obtención de muestras

Aunque, en general, los procesos de fibrosis asociados a patologías crónicas comparten vías comunes, existen diferencias entre los distintos órganos y las diversas patologías, lo que hace necesario evaluar el papel endógeno de Cortistatina en diferentes modelos preclínicos de desórdenes fibróticos que afectan a distintos órganos. Por ello, dentro de este primer objetivo se estudiaron dos modelos de fibrosis: el modelo de esclerodermia inducido por Bleomicina; y el modelo de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina.

La Bleomicina, identificada por primera vez en 1966 por Umezawa y colaboradores mientras estudiaban la fermentación de *Streptomyces verticillus* (180), se emplea como agente quimioterapéutico en el tratamiento de diversas neoplasias como linfomas, carcinomas testiculares y carcinomas de células escamosas de cérvix, cabeza y cuello. Se ha visto que, a pesar de su actividad anti-neoplásica, la Bleomicina puede tener cierta toxicidad, siendo responsable del daño pulmonar observado en el 3-5% de los pacientes (181). Además, constituye un potente iniciador de daño y fibrosis en ratones y otros animales. Como consecuencia de esto, su administración se ha establecido como modelo experimental de fibrosis, siendo Yamamoto y colaboradores los responsables del primer protocolo en 1999.

La toxicidad inducida por Bleomicina ocurre en órganos en los que hay ausencia de la enzima que provoca su hidrólisis e inactivación, denominada Bleomicina hidrolasa. Esos órganos se corresponden con los pulmones, la piel y las membranas mucosas (181). El modelo de fibrosis inducido por Bleomicina se caracteriza por la aparición de lesiones vasculares, la infiltración de células mononucleares en la lesión, el desarrollo de anticuerpos anti-nucleares y el engrosamiento de la dermis y el tejido alveolar como consecuencia de la acumulación de colágeno. El mecanismo de acción de la Bleomicina es citotóxico, y se basa en la rotura del ADN de cadena doble como simple. Para ello, se combina con el hierro-II y el oxígeno mediante interacciones electrostáticas lo que favorece la producción de ROS que rompen el ADN, generando grandes daños en las células afectadas. Además, estas ROS inducen peroxidación lipídica y oxidación proteica. Esto favorece una respuesta inflamatoria y la liberación de mediadores profibróticos que inducen la activación de células efectoras fibrogénicas y la producción de MEC (181,182). Ventajas importantes del modelo de fibrosis inducido por Bleomicina son su fácil administración, la cual puede hacerse mediante inyecciones intradérmicas, subcutáneas, intraperitoneales, intratraqueales, administración intranasal, etc, dependiendo del modelo que se quiera generar; y la reproducibilidad que presenta. La administración de este antibiótico, genera rápidamente una respuesta inflamatoria aguda, con la consiguiente generación de inflamación crónica y fibrosis. En función de la dosis de Bleomicina y la cepa murina empleada, se obtiene una intensidad de daño variable. Así, se ha observado que los animales más susceptibles al antibiótico son los ratones de la cepa C57BL/6J, mientras que los ratones C3H/HeJ and Balb/c son resistentes (181).

Modelo de esclerodermia inducido por Bleomicina

Para llevar a cabo el modelo de esclerodermia inducido por Bleomicina los animales recibieron inyecciones i.d de 3,2 U/kg de ratón de Sulfato de Bleomicina (Calbiochem). Estas administraciones se realizaron una vez cada dos días en un punto muy localizado de la espalda previamente afeitada, durante un total de 28 días (Figura 19). Para realizar las administraciones de Bleomicina todos los animales fueron anestesiados con Isoflurano (Piramal Healthcare Uk Limited).

Transcurridos los 28 días, los animales fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂, y las muestras de estudio (piel y pulmones) fueron extraídas y almacenadas según las necesidades del experimento.

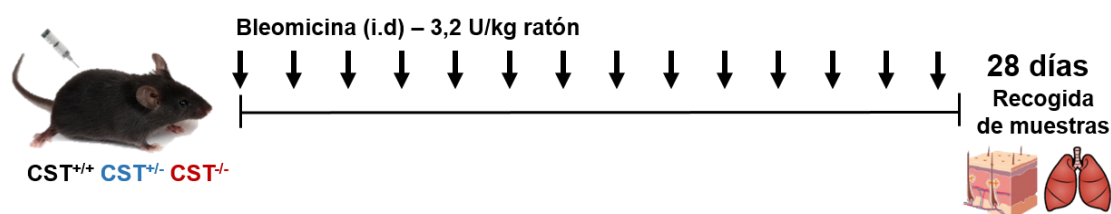


Figura 19. Modelo de esclerodermia inducido por Bleomicina

Para poder obtener las muestras de piel de los animales de estudio el órgano, previamente afeitado, se tomó con unas pinzas y se cortó mediante el uso de tijeras. El corte se realizó en forma de cuadrado de 1 cm de lado de manera que, en total, se cortaron fragmentos de 1 cm².

Un aspecto destacable de la esclerodermia es que en torno a un 40% de los pacientes que la padecen sufren complicaciones pulmonares asociadas a fibrosis pulmonar (183). Por tanto, se recogieron y analizaron los pulmones de los animales utilizados en estos estudios. Así, para la obtención de los pulmones, se afeitó la región del tórax y se realizó una incisión con forma de “V”, lo que permitió levantar la caja torácica y exponer los pulmones. Los distintos lóbulos pulmonares fueron recogidos, separados y almacenados para poder realizar diferentes análisis.

Las muestras de piel y pulmón extraídos se trataron según las necesidades de cada experimento. Así, los órganos empleados para los estudios histológicos se introdujeron en formalina tamponada al 10%; mientras que aquellos utilizados para los análisis de expresión génica y proteica se introdujeron en nitrógeno líquido, con el fin de lograr una congelación instantánea que impidiera la degradación del tejido. Tras esto, las muestras se almacenaron a -80°C.

Modelo de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina

Para inducir fibrosis pulmonar a los ratones, estos fueron anestesiados mediante una inyección i.p de una mezcla de xilacina (10 mg/kg) y ketamina (80 mg/kg). Tras esto, se afeitó la zona de la garganta, se realizó una pequeña incisión para tener acceso a la tráquea y se administró una inyección i.t de Sulfato de Bleomicina. Pese a que en un principio se emplearon 3,2 U/kg del antibiótico, debido a la elevada mortalidad generada en los ratones CST^{+/-} y CST^{-/-} se utilizaron, finalmente, 1,8 U/kg de ratón para el desarrollo de este objetivo 1. Finalmente, se suturó la herida y se dejó a los ratones de manera que pudieran recuperarse de la operación.

Este modelo de fibrosis pulmonar se siguió durante 21 días, momento en el cual los animales fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂, y las muestras fueron extraídas y almacenadas según las necesidades de cada experimento. Además de la recogida de muestras al final del modelo, para poder estudiar las posibles diferencias generadas en el proceso de fibrosis entre ratones CST^{+/+}, CST^{+/-} y CST^{-/-} a tiempos más tempranos, se obtuvieron muestras a los 7 días del inicio del mismo (Figura 20). Durante todo el modelo se monitorizó la supervivencia y el peso de los diferentes grupos de animales.

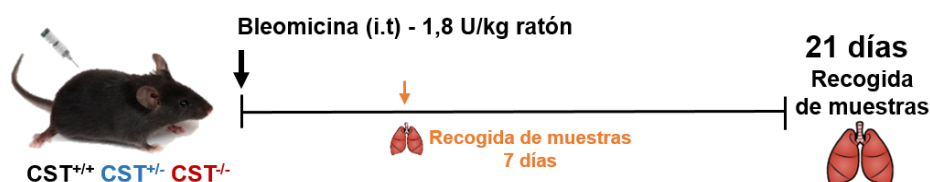


Figura 20. Modelo de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina

Para lograr la obtención de los pulmones, se realizó el protocolo anteriormente descrito. Todas las muestras se trataron y almacenaron según las necesidades de cada experimento, tal y como se ha detallado anteriormente.

Por otro lado, además de las muestras pulmonares, se obtuvo el BAL de estos ratones. Para ello, se realizó una incisión de 1 cm en la zona media de la parte anterior del cuello y se expuso la tráquea (Figuras 21a y 21b). Tras esto, se realizó una pequeña incisión entre los dos discos cartilagosos y se introdujo un catéter en la tráquea mediante la inserción de una aguja de 23 G en un tubo flexible de polietileno transparente 21 G (diámetro interno: 0,58 mM, diámetro exterior: 0,96 mM, y longitud: 0,5 cm). Este catéter se estabilizó mediante un nudo firme con hilo de algodón (Figura 21c). A continuación, se acopló una jeringa al catéter y se infundió al pulmón 1 ml de tampón fosfato salino (del inglés *Phosphate Buffered Saline*, PBS) 1X (Biowest) con 0,1 M de EDTA (Sigma-Aldrich). Finalmente, se aspiró la solución inyectada al mismo tiempo que se masajeara el tórax, obteniendo en la mayoría de ocasiones el 90% de dicha solución (Figura 21d).

El BAL obtenido se centrifugó durante 8 minutos a 400 g a 4°C. El pellet se resuspendió en tampón ACK (Amonio-Cloro-Potasio: NH_4Cl 0,15 M (Sigma-Aldrich) + $KHCO_3$ 10 mM (Sigma-Aldrich) + Na_2 EDTA 0,1 mM) para producir la lisis de eritrocitos por plasmólisis. Tras esto, se cuantificó el número total de células vivas (apartado 3.1.1) y se analizó el porcentaje de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T en mediante citometría de flujo (apartado 3.1.2). Alternativamente, las poblaciones de células se examinaron contando al menos 200 células en preparaciones CytoSpin del BAL teñidas con Wright-Giemsa. Por su parte, los sobrenadantes se emplearon para determinar los niveles de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias usando ELISA sándwich específicos ($TNF\alpha$, IL6, IL1 β y MIP2 de Preprotech; y TGF β 1 Abcam) siguiendo las especificaciones del fabricante y empleando el lector de placas *VersaMax Microplate Reader* (Molecular Devices) y el programa *SoftMax Pro* (Molecular Devices). El sobrenadante del BAL también se empleó para medir el contenido de proteína total, con el objetivo de analizar el edema pulmonar, usando un kit de ensayo de proteínas BCA de ácido bicinconínico (Pierce).

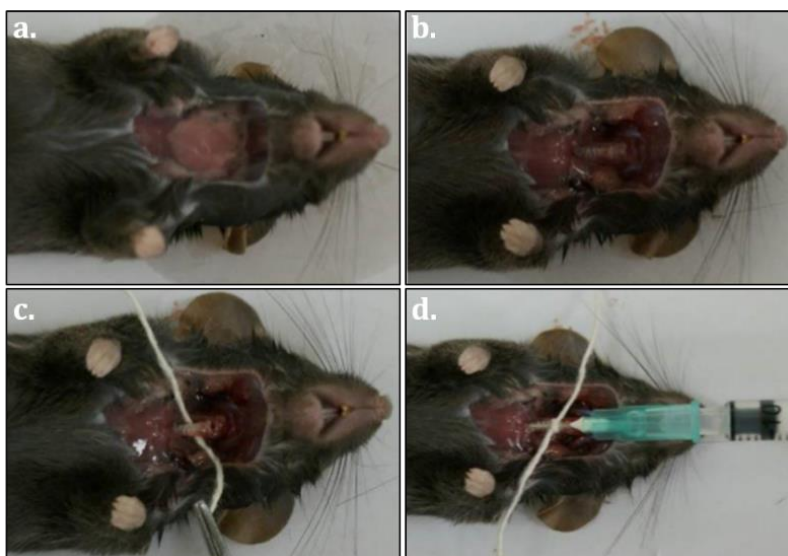


Figura 21. Procedimiento quirúrgico para la extracción del BAL

3.1.3 Cuantificación del número total de células vivas

Para contar la cantidad de células vivas, se preparó una dilución de la suspensión celular con *Erythrosin B staining solution* (ATCC) y se transfirieron 10 μ l de la misma a una cámara Neubauer. En dicha cámara se realizó el conteo de las células que conservaban su estructura birrefringente, excluyendo aquellas que adquirirían un color rosáceo. Una vez contadas las células presentes en los cuatro cuadrantes de la cámara se calculó la cantidad total de células presentes en el esterilin mediante la fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de células totales} = \left(\frac{n^{\circ} \text{ de células contadas}}{n^{\circ} \text{ de cuadrantes contados}} \times FD \right) \times 10^4 \times Vt$$

Donde:

n° de células contadas son las células birrefringentes contadas con la cámara de Neubauer.

n° de cuadrantes contados son los cuadrantes contados en la cámara de Neubauer. En este caso 4.

FD es el factor de dilución de las células.

Vt es el volumen total en el que se resuspendieron las células.

3.1.4 Análisis de poblaciones celulares en el BAL por citometría de flujo

Para llevar a cabo la citometría de flujo se emplearon 10^5 células/muestra, las cuales fueron incubadas con un anticuerpo anti-2.4 G2 (Mouse BD Fc Block™) y 7-Aminoactinomicina D (Calbiochem) a concentración 1:100 a 4°C durante 10 minutos, con el objetivo de evitar la unión inespecífica a los receptores Fc y excluir las células muertas, respectivamente. Tras esto, las células se lavaron con PBS con 0,1% de BSA y se incubaron a 4°C durante 30 minutos con 4-5 μ g/ml de los anticuerpos empleados para el marcaje de la población leucocitaria, linfocitos T, macrófagos y neutrófilos (Anexo. Tabla 1). Finalmente, se estudiaron las poblaciones celulares en un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences) empleando, al menos, 20.000 eventos usando gráficos de dispersión frontal/lateral y la tinción con 7-aminoactinomicina D (emisión a

647 nm; excitación a 546 nm). Los datos obtenidos fueron analizados con el *software FlowJo v10.0.7* (BD Biosciencias) con el fin de determinar los porcentajes de las diferentes poblaciones celulares en el número total de células obtenidas del BAL.

3.1.5 Estudio de la actividad mieloperoxidasa (MPO) de neutrófilos

Para determinar la infiltración de los neutrófilos se midió también la actividad mieloperoxidasa (MPO). Para ello, se homogeneizaron, en primer lugar, los lóbulos del pulmón izquierdo, empleando 50 mg/ml de tampón fosfato (50 mM, pH 6,0) con bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 0,5%. Posteriormente, las muestras fueron congeladas y descongeladas tres veces, y se centrifugaron a 30000g durante 20 minutos. Los sobrenadantes se diluyeron con tampón de ensayo (tampón fosfato 50 mM pH 6,0 + 0,167 mg/ml de o-dianisidina (Sigma) + 0,0005% H₂O₂) en proporción 1:30. Se midió la variación de absorbancia mediante el lector de placas *VersaMax Microplate Reader* y el programa *SoftMax Pro* a una longitud de onda de 450 nm durante un tiempo de 1 a 3 minutos (ΔA_{450}). Finalmente, se calculó la actividad MPO en función del peso pulmonar húmedo de forma que:

$$\text{Actividad MPO} = \frac{13,5 \times \Delta A_{450}}{g \text{ pulmón}}$$

Donde el coeficiente 13,5 se determinó empíricamente. De manera que la actividad de 1 U MPO es la cantidad de enzima que reducirá 1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ /min.

3.1.6 Medida de la permeabilidad vascular

Con el fin de medir el edema pulmonar, además de analizar la cantidad de proteína total del BAL (apartado 3.1.2) se analizó la permeabilidad vascular empleando un ensayo de extravasación del colorante Evans Blue. Para ello, tres horas antes del sacrificio de los ratones se inyectaron 20 mg/kg de Evans Blue (Sigma) en la cola de los animales. En el momento de la muerte se extrajo sangre, mediante una punción cardíaca con una jeringuilla heparinizada. Tras esto se perfundió a los animales usando PBS a través del ventrículo derecho con el fin de eliminar el tinte intravascular de los pulmones. A continuación, se aisló y homogeneizó el tejido pulmonar y se extrajo el colorante, por medio de la adición de 2 volúmenes de formamida y la incubación O/N a 60°C. Tras la incubación, se realizó una centrifugación a 5000 g durante 30 minutos, tras lo cual se midió la absorbancia de Evans Blue, tanto en los sobrenadantes obtenidos como en el plasma, con el espectrofotómetro *VersaMax Microplate Reader*. La presencia de pigmentos de hemo se corrigió de la siguiente forma:

$$A_{620} \text{ corregida} = A_{620} - (1,426 \times A_{740} + 0,030)$$

Donde A₆₂₀ indica la longitud de onda de máxima absorbancia de Evans Blue y A₇₄₀ la de mínima (1%). El índice de Evans Blue fue calculado como la relación [cantidad de colorante en pulmón/ cantidad de colorante en el plasma].

3.1.7 Estudio histológico de los tejidos

Con el fin de estudiar la infiltración celular, así como la alteración morfológica y el depósito de colágeno asociados al proceso de inflamación y fibrosis en los tejidos de los animales modelo

se llevaron a cabo las tinciones histológicas tricrómico de Masson y rojo Sirio-Ácido pícrico. Además, se realizó una inmunofluorescencia indirecta de α SMA para poder discriminar en qué condiciones de estudio había más expresión de esta proteína y, por tanto, más diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos.

Previamente al proceso de tinción, las muestras de interés (piel y pulmones) pasaron por un proceso de fijación, deshidratación, inclusión en bloques de parafina y corte al microtomo. Para ello, las muestras se introdujeron en formalina tamponada al 10% (PanReac AppliChem) durante 24 horas a temperatura ambiente (TA). Tras ese tiempo, la formalina se renovó y se dejó el tejido sumergido durante otras 24 horas. Tras un tiempo total de 48 horas en formalina, esta fue sustituida por etanol (VWR) al 70%. Finalmente, las muestras fijadas y deshidratadas fueron incluidas en bloques de parafina en colaboración con el Dr. O'Valle en el departamento de Anatomía patológica e historia de la ciencia de la Facultad de medicina de la Universidad de Granada (UGR). Para ello, se seleccionaron secciones de los diferentes órganos a estudiar y se colocaron en casetes de plástico (Casa Álvarez), los cuales fueron introducidos en un procesador automático de tejidos Excelsior ES (Thermo Fisher). En dicho procesador, los tejidos fueron pasando por una serie de reactivos que iban preparando al tejido hasta la inclusión final en parafina: formalina tamponada (1 hora), etanol al 70% (1 hora), etanol al 96% (2 horas), etanol absoluto (3 horas), xileno (PanReac AppliChem) (3 horas) y parafina (PanReac AppliChem) (4 horas). Tras esto, las muestras se orientaron adecuadamente y los bloques se confeccionaron con el tejido embebido en parafina en una estación de montaje con dosificador de parafina caliente y placa fría a 4°C (Modelo EC350, Casa Álvarez). Una vez obtenidos los bloques, las muestras incluidas fueron cortadas transversalmente en secciones de 4 μ m de grosor con el microtomo (Leica RM2125 RTS). Se dejaron estirar en un baño con agua destilada a 40°C y se recogieron de forma secuencial en portaobjetos de Polisina (Thermo Fisher). Antes de la realización de las tinciones en cuestión, se procedió a la fijación del tejido sobre los portaobjetos, dejándolos durante 10 minutos a 65°C. A continuación, los cortes se hidrataron sumergiéndolos tres veces en xilol durante 10 minutos cada vez y en una batería de etanoles de graduación decreciente durante 2 minutos en cada uno (etanol absoluto (x2), etanol al 90%, 80%, 70%). Para la tinción Tricrómico de Masson y la inmunofluorescencia, la hidratación se completó sumergiendo los cortes en etanol al 50% durante otros dos minutos, y agua destilada 5 minutos.

Tinción Tricrómico de Masson sobre cortes de parafina

La tinción Tricrómico de Masson, que tiñe en azul-verdoso las fibras de colágeno y en rojo los citoplasmas celulares, es específica para el estudio de los tejidos fibróticos. Esta tinción se realizó tanto para las muestras de piel como para las de pulmón.

Para llevar a cabo la tinción los cortes rehidratados se sumergieron en la solución fijadora Bouin (Panreac AppliChem), en la que permanecieron O/N (*overnight*) a TA. Tras esto, se lavaron tres veces con agua destilada y se sumergieron en una solución de Hematoxilina férrica de Weigert (50% Solución A (Panreac AppliChem) + 50% Solución B (Panreac AppliChem)) durante 10 minutos. A continuación, se realizaron lavados en agua del grifo y agua destilada y se tiñeron los cortes en una solución escarlata de Biebrich-fucsina ácida (80% de solución acuosa de Escarlata de Biebrich (Sigma-Aldrich) al 1% + 10% de solución acuosa de fucsina ácida (Panreac AppliChem) al 1% + 1% de ácido acético glacial (Carlo Erba)) durante 4 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados más con agua destilada y se trataron las muestras con una solución acuosa de ácido fosfotúngstico (Panreac AppliChem) al 5% y ácido fosfomolibdico (Panreac

AppliChem) al 5% durante 12 minutos. Para finalizar la tinción, los cortes se incubaron en una solución acuosa de verde luz (Labkem) al 2% por 7 minutos y se lavaron tres veces en H₂O destilada. Una vez teñidas, las muestras se deshidrataron, aclararon y montaron con Entellan (Millipore). Todo el proceso se realizó a TA.

A partir de las muestras teñidas se obtuvieron imágenes mediante el microscopio de luz *Axio Scope.A1* (Carl Zeiss) a un aumento de 50X (pulmones) y 100X (piel) y el programa *Zen 2011 Light Edition Software* (Carl Zeiss).

Para el análisis de las imágenes de piel se empleó el programa *ImageJ-Fiji* (National Institutes of Health, USA), mediante el cual se midió:

- El grosor de la dermis, desde la interfase epidermis-dermis hasta la interfase dermis-hipodermis. Se realizaron un total de 4 medidas por imagen y se determinó la media de las mismas (Figura 22). Este análisis fue realizado por tres observadores diferentes.
- El grosor de la epidermis, desde la interfase epidermis-dermis hasta el borde de la piel. Se llevaron a cabo un total de 3 medidas por imagen.
- La infiltración celular: se cuantificó el número de células inflamatorias infiltrantes en las capas profundas de la piel y se expresó como la media de células totales por campo. Por cada ratón se analizaron tres secciones, dentro de las cuales se cuantificaron 3 campos no superpuestos. En este análisis se emplearon imágenes tomadas a un aumento de 400X.

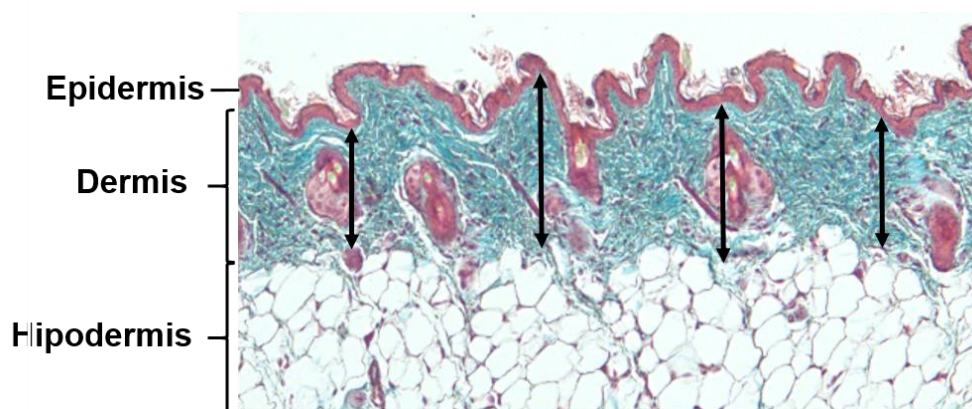


Figura 22. Tinción Tricrómico de Masson de un corte transversal de piel de ratón

Imagen tomada a un aumento 100X. Se indican las diferentes capas de la piel. Las flechas negras muestran las 4 medidas del grosor de la piel realizadas mediante el programa *ImageJ-Fiji*, de las que posteriormente se obtiene la media.

Para el estudio de las muestras de pulmón, se realizó un análisis semi-cuantitativo para determinar el grado de engrosamiento alveolar, la pérdida de la estructura pulmonar debidos a la proliferación e infiltración celular y la acumulación de colágeno en los tabiques alveolares. Para ello, los signos de fibrosis pulmonar se midieron según el siguiente sistema de puntuación clínica (Tabla 3, Figura 23):

Grado de lesión pulmonar	Porcentaje de área afectada	Figura 30
0	0%	A
1	1 al 25%	B
2	25 al 50%	C
3	50 al 75%	D
4	75 al 100%	E

Tabla 3. Grados de lesión pulmonar

Se indica el porcentaje de área afectada en cada caso. Además, se indica la imagen representativa para cada grado, perteneciente a la figura 23. El grado de daño alveolar fue evaluado por dos observadores distintos.

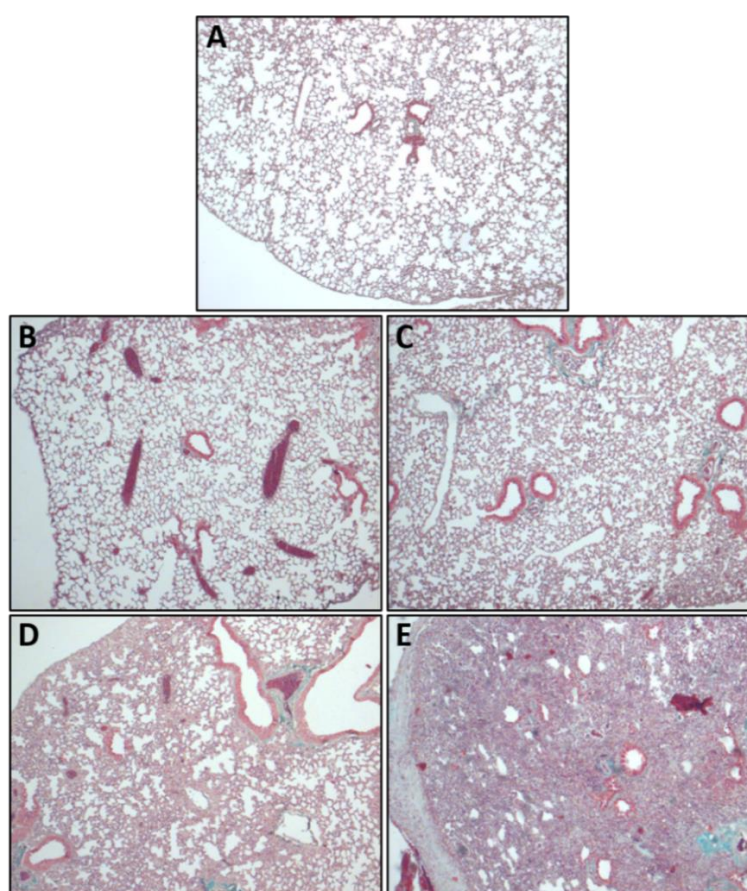


Figura 23. Imagen comparativa de los diferentes grados de lesión en cortes de pulmón de ratón con la tinción Tricrómico de Masson

Imagen tomada a un aumento 50X. A) Grado 0. B) Grado 1. C) Grado 2. D) Grado 3. E) Grado 4.

Tinción Rojo Sirio-Ácido Pírico sobre cortes de parafina

La tinción Rojo Sirio-Ácido Pírico tiñe en rojo las fibras de tejido conectivo por lo que resulta útil para estudiar el depósito de colágeno y la fibrosis de un tejido. En concreto, esta tinción se empleó sobre las muestras de piel obtenidas.

Para realizar esta tinción, los portaobjetos rehidratados se dejaron en alcohol al 70% durante 48 horas a TA. Posteriormente, las muestras se tiñeron con una solución de rojo sirio-ácido pícrico (Solución acuosa saturada de ácido pícrico (2-2,5%) (Panreac AppliChem) + Rojo sirio 1% (Sigma-Aldrich)) durante 35 minutos a TA. Tras esto, los cortes se deshidrataron y aclararon en una batería que incluía etanol al 70%, al 90%, absoluto y Xilol. Finalmente, los cortes se montaron con Entellan.

Una vez preparadas las muestras, se obtuvieron imágenes representativas mediante el microscopio de luz *Axio Scope.A* a un aumento de 100X y el programa *Zen 2011 Light Edition Software* (Figura 24).

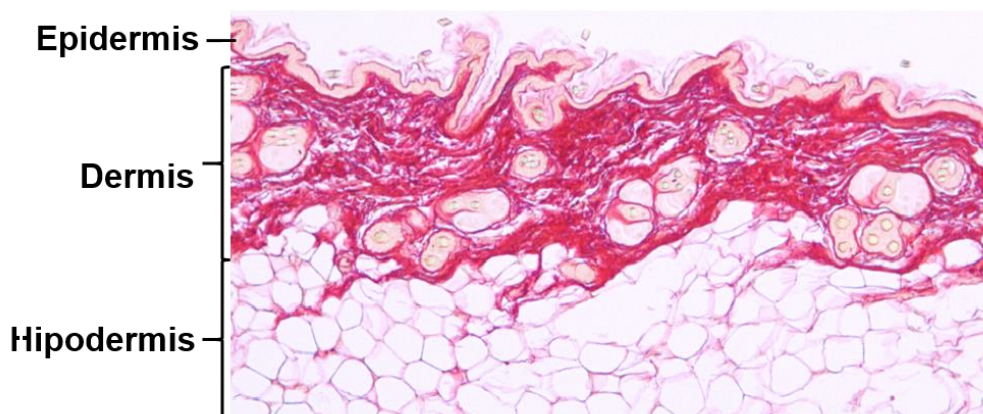


Figura 24. Tinción Rojo Sirio-Ácido Pícrico de un corte transversal de piel de ratón
Imagen tomada a un aumento 100X. Se indican las diferentes capas de la piel.

Inmunofluorescencia indirecta de α SMA sobre cortes de parafina

Como los miofibroblastos son células α SMA⁺, el estudio de la expresión y distribución de esta proteína en un tejido permite conocer si en el mismo se está produciendo la diferenciación de los fibroblastos y, por tanto, un proceso fibrótico. Con la finalidad de visualizar la presencia de α SMA en las distintas muestras obtenidas realizamos una inmunofluorescencia indirecta de α SMA.

Una vez rehidratados los cortes de interés se procedió a realizar el desenmascaramiento antigénico. Para ello, se incubaron las muestras en un *buffer* de citrato de sodio (*Sodium citrate* (Panreac AppliChem) 10 mM + 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich), pH 6.0) durante 20 minutos a 100°C. Tras este tiempo, los portaobjetos se enfriaron con agua durante 10 minutos. Una vez listas las muestras, se inició el protocolo de inmunofluorescencia *per sé*. En primer lugar, se sumergieron las muestras durante 5 minutos en una solución de PBS 1X + 0.025% Tritón X-100 (Sigma-Aldrich), dos veces. Tras esto, se delimitó la zona del tejido con un rotulador *Liquid Blocker* (Sigma-Aldrich). Los cortes se incubaron durante 15 minutos con una solución de PBS 1X y peróxido de hidrógeno (Labortechnik) al 0,3% en oscuridad y a TA. Posteriormente, se introdujeron los portaobjetos en la solución de PBS 1X con Tritón X-100 al 0.025% durante 5 minutos. Este paso se repitió dos veces. A continuación, las muestras se incubaron durante 2 horas a TA con una solución de bloqueo (PBS 1X + 10% Suero de Cabra (Sigma-Aldrich) + 1% BSA (Sigma-Aldrich)). Una vez bloqueadas las uniones inespecíficas, se eliminó la solución de bloqueo y se añadió el anticuerpo anti- α SMA (Anexo. Tabla 2) con una dilución 1:1000 en PBS 1X + 1%

BSA. Los cortes se incubaron con el anticuerpo a 4°C O/N. Tras esta incubación, se sumergieron las muestras 2 veces en la solución de PBS 1X con Tritón X-100 al 0.025% durante 5 minutos y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (Anexo. Tabla 2) durante 1 hora a TA y oscuridad. Para ello, el anticuerpo se diluyó (dilución 1:1000) en PBS 1X + 1% BSA. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS 1X. A continuación, se tiñeron los núcleos celulares con una solución con DAPI (Sigma-Aldrich) 1:1000 en PBS 1X durante 5 min, a TA y en oscuridad. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X y los cortes de montaron con moviol (Sigma-Aldrich). Una vez montados, se dejó polimerizar al moviol a TA y en oscuridad O/N y, tras esto, los portaobjetos se almacenaron a 4°C protegidos de la luz.

Además, en cada inmunofluorescencia se realizaron pruebas de autofluorescencia de los tejidos, siguiendo todos los pasos del protocolo descrito, pero sin añadir ningún anticuerpo a las muestras. Así mismo, se comprobó la especificidad de unión del anticuerpo secundario, incubando los tejidos sólo con este anticuerpo sin haberlo hecho previamente con el primario.

Finalmente se obtuvieron imágenes mediante el microscopio de fluorescencia *Olympus® iX81* (Olympus) a un aumento de 100X y el programa *CellSens Imaging software* (Olympus). Todas las imágenes se tomaron en las mismas condiciones y con los mismos parámetros.

Para poder determinar si la expresión de α SMA se veía aumentada o disminuida en unas condiciones con respecto a otras se midió la intensidad de señal mediante el programa *Fiji-ImageJ*. Para ello se fijó un umbral a partir del cual la señal de la imagen sería considerada positiva para α SMA.

Debido a la elevada autofluorescencia que presentaba la piel, no se pudieron obtener imágenes adecuadas para determinar la presencia o ausencia de α SMA. Por consiguiente, solo pudimos estudiar la expresión de este marcador mediante esta técnica en las muestras de pulmón.

3.1.8 Análisis de la expresión génica en tejido

Con el fin de analizar la expresión de Cortistatina, de sus receptores y de factores relacionados con los procesos de fibrosis, tales como CTGF o α SMA, se puso a punto el aislamiento del ARNm, tanto de piel como de pulmón, y la cuantificación de la expresión de los marcadores de interés mediante RT-qPCR. El protocolo que se siguió se describe a continuación y puede dividirse en tres grandes partes: 1) aislamiento del ARNm; 2) retrotranscripción; y 3) PCR cuantitativa (qPCR).

Todo el protocolo se realizó en las máximas condiciones de esterilidad para evitar la degradación del ARNm y la contaminación de las muestras. Todas las superficies sobre las que se trabajó, así como el material empleado se limpiaron con el reactivo *RNase AWAY* (Molecular BioProducts) y etanol al 70%.

1) Aislamiento del ARN mensajero (ARNm)

Para llevar a cabo el aislamiento del ARNm, las muestras recogidas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C fueron disgregadas a 13500 rpm con el homogeneizador Ultra-Turrax T-25

(IKA), durante 1 minuto en el caso de las muestras de piel y 40 segundos en el caso de las muestras de pulmón.

Debido a la elevada cantidad de ARNasas presentes en la piel, fue necesario realizar el proceso de purificación del ARNm mediante el uso del kit *E.Z.N.A.[®] HP total RNA Kit- Animal Tissue Protocol* (Omega), siguiendo las especificaciones del fabricante. Para ello, una vez disgregado el tejido (20 a 30 mg) en 700 µl de *GTC Lysis Buffer*, y transferido a tubos libres de ADNasas y ARNasas de 1,5 ml (VWR), este se centrifugó (centrífuga 5417R, eppendorf) a 20000 g durante 5 minutos a 4°C. Tras esto, se transfirieron 700 µl del sobrenadante transparente a una mini columna homogeneizadora de ARN proporcionada por el propio kit y se centrifugó a 13000 g durante 1 minuto a 4°C. Se transfirió el filtrado a un nuevo tubo libre de nucleasas que contenía 700 µl de etanol 70% y se mezcló por inversión. A continuación, se transfirieron 700 µl de esta mezcla a una mini columna de alta afinidad por el ARN, también del kit, y se centrifugó a 10000 g durante 1 minuto a 4°C. Se descartó el filtrado, y se repitió el proceso con los 700 µl restantes de la mezcla sobrenadante-etanol 70%. Una vez concentrado todo el ARN en la mini columna, se procedió a realizar los lavados de la misma. Para ello, primero se realizó un lavado con 500 µl de *RNA Wash Buffer I* y una centrifugación de 30 segundos a 10000 g a 4°C. Tras esto, se realizaron dos lavados con 500 µl de *RNA Wash Buffer II*, seguido cada uno de una centrifugación de 1 minuto a 10000 g a 4°C. Realizados los lavados, la columna se volvió a centrifugar a 20000 g durante 2 minutos a 4°C, con el fin de que quedara completamente seca. La columna se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml y se llevó a cabo la elución del ARN añadiendo 75 µl de agua libre de nucleasas. Tras esto, las muestras se calentaron durante 2 minutos a 65°C para favorecer la elución y se centrifugaron durante 2 minutos a 20000 g y 4°C. Finalmente, las muestras se calentaron durante 15 minutos a 65°C para solubilizar el ARN presente.

Por otro lado, para aislar el ARNm de las muestras de pulmón se aplicó el protocolo basado en el uso de TriPure (Roche). Para ello, una vez homogeneizadas las muestras en 1 ml de TriPure (de 50 a 100 mg de tejido) y transferidas a tubos libres de nucleasas, estas se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos a 4°C para favorecer la clarificación del homogenado. Posteriormente, se transfirieron los sobrenadantes a nuevos tubos y se incubaron durante 10 minutos a TA con el fin de mejorar la acción del TriPure. Tras esto, se añadió cloroformo (Sigma-Aldrich) (200 µl por cada mililitro de TriPure) a cada muestra, se mezcló bien por inversión y se incubó durante 5 minutos a TA, favoreciendo así la separación de las fases. Los tubos se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, tras lo cual se tomó la fase acuosa que contenía el ARN (en este paso se generan 3 fases: la fase acuosa con el ARN; la interfase que contiene ADN; y la fase orgánica de proteínas). Para asegurar la pureza del ARN extraído y eliminar la posible contaminación con fenol, las muestras se incubaron durante 10 minutos con un volumen igual de la mezcla cloroformo + alcohol isoamílico (Sigma-Aldrich) 24:1 (v/v) a TA y se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. Tras esto, se volvió a tomar la fase acuosa que contenía el ARN. Para precipitar el ARN, se añadió isopropanol (Sigma-Aldrich) (500 µl por cada mililitro de TriPure) y se dejó actuar O/N a -20°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante por decantación y se lavó el pellet añadiendo etanol 75%. Se centrifugaron los tubos a 7600 g durante 5 minutos a 4°C y se volvió a eliminar el sobrenadante por decantación. Se dejó secar el pellet y se resuspendió en 80 µl de agua de libre de nucleasas (BioRad). Finalmente, se calentaron las muestras durante 15 minutos a 65°C con el fin de desnaturalizar las proteínas ARNasas presentes.

Una vez aislado el ARN se midió la concentración total de cada muestra usando el espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo Fisher) y se almacenó a -80°C hasta su uso.

2) Retrotranscripción o transcripción inversa

La retrotranscripción o transcripción inversa consiste en la obtención de ADNc empleando una enzima denominada transcriptasa inversa que emplea como molde la cadena de ARNm. Para poder obtener el ADNc a partir de 1 µg del ARN total cuantificado se empleó el kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher) siguiendo las indicaciones del fabricante. Así, en primer lugar, se transfirió 1 µg de ARN total de cada muestra a un tubo libre de ADNasas y ARNasas de 0,2 ml (VWR) y añadió agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 8 µl. Para eliminar el ADN genómico presente en las muestras, se añadió la enzima Desoxirribonucleasa I (*DNasa I*, Sigma-Aldrich. Concentración del stock 1 U/µl) a una concentración de 1 U/reacción junto con *Reaction Buffer 10X* (Sigma-Aldrich) a una concentración final 1X. Tras una incubación de 15 minutos a TA, se paró la reacción de la DNasa añadiendo *Stop Solution 50 mM* (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,05 M y dejando incubar 5 minutos a 65°C. A continuación, para realizar el proceso de retrotranscripción por el cual se obtendría el ADNc a partir del ARNm, se añadieron los siguientes elementos del kit a cada muestra: *Random Hexamer Primer* 100 µM a una concentración de 5 µM, *Reaction Buffer 5X* a una concentración 1X, *dNTP mix* 10 mM a una concentración de 1 mM, 200 U/reacción de *RevertAid RT* (stock a 200 U/µl) y 200 U/reacción de *RiboLock RNase Inhibitor* (stock a 200 U/µl). Tras mezclar bien cada muestra con todos los componentes (volumen final 20 µl) se realizó la retrotranscripción usando el termociclador *Mastercycler EPGradient 5345* (eppendorf). El programa utilizado fue el siguiente: incubación inicial de 5 minutos a 25°C, seguida de una incubación de 60 minutos a 42°C (temperatura óptima a la que la enzima transcriptasa del kit lleva a cabo la síntesis del ADNc) y, finalmente, una incubación a 70°C durante 5 minutos.

Las muestras de ADNc obtenidas se diluyeron con agua libre de nucleasas, para obtener una concentración final de ARN 15 ng/µl. Por convención se indica la concentración en función del ARN.

3) PCR cuantitativa (qPCR)

A partir del ADNc obtenido se llevó a cabo el estudio de expresión de marcadores relacionados con el proceso de fibrosis, así como la expresión de Cortistatina y sus receptores, por medio de una PCR cuantitativa (qPCR). La qPCR se trata de una técnica que permite realizar la amplificación enzimática *in vitro* de una secuencia de ADN específica y cuantificar el producto de dicha amplificación. Para ello, se emplea un molde de ADN, un par de *primers* específicos, un tampón de reacción adecuado, una enzima polimerasa termoestable y una sonda que permita medir la tasa de generación del producto. Entre las diferentes modalidades de esta técnica se encuentra aquella basada en el uso de SYBR Green, una molécula que interacciona con el surco menor de la doble hélice de ADN, favoreciendo una transferencia de energía y un aumento de la emisión de fluorescencia. De manera que conforme va aumentando la cantidad de ADN, se incrementa de forma proporcional la señal de fluorescencia de SYBR Green (absorción 497 nm; emisión 520 nm) que es recogida por el sistema detector en cada ciclo de la PCR.

Para llevar a cabo las qPCRs se empleó el kit *SensiFAST SYBR^R No-ROX* (Bioline) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello se añadieron *SensiFAST SYBR No-ROX Mix* (Bioline) a concentración 1X, 30 ng de ARN total, 125 nM de los *primers forward* y *reverse* específicos (Anexo. Tabla 3) y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 20 µl en placas de 96 pocillos de BioRad. Finalmente, la qPCR se realizó en un termociclador *CFX 96* de BioRad. Las condiciones de PCR en todos los casos fueron las siguientes: una etapa inicial de 5 minutos a 94°C de activación de la polimerasa, seguida de una etapa de amplificación de 40 ciclos constituida por: 1) fase de desnaturalización (30 segundos a 94°C); 2) fase de alineamiento de los *primers* con la región de interés del ADN (30 segundos a 60°C); y 3) fase de extensión por parte de la polimerasa (30 segundos a 72°C).

El ciclo de PCR en el que el sistema empieza a detectar la señal de fluorescencia se denomina ciclo umbral o *cycle threshold value* (Ct) y es inversamente proporcional a la cantidad de ADN inicial que hay en la muestra. De manera que comparando los Ct de las diferentes muestras, se puede concluir el nivel de expresión del gen de interés en cada una respecto a un control. Para analizar los datos se empleó el programa *BioRad CFX ManagerTM Software* (BioRad). El gen RPLPO se empleó como normalizador.

Previamente se calculó la eficiencia de amplificación de los *primers* empleados en las qPCR. Para ello, se prepararon diluciones seriadas 1/10 de los distintos *primers*, de manera que se obtuvieron concentraciones que variaban desde 100 ng hasta 0,01 ng. A continuación, se realizaron las qPCR de las distintas diluciones, empleando una muestra de ADN control y el protocolo descrito anteriormente. De esta forma, se pudo observar cómo se producía la reacción de polimerización con diferentes concentraciones de cada *primer*. A partir de la pendiente de la gráfica obtenida al representar el Ct frente al logaritmo de la concentración de los *primers* se pudo obtener la eficiencia para cada *primer*, de modo que:

$$E = 10^{(-1/m)} \quad \text{y} \quad \%E = (E - 1) \times 100$$

Donde:

E es la eficiencia a calcular.

m es la pendiente de la recta.

%E es el porcentaje de la eficiencia.

Para que un *primer* sea válido y lleve a cabo una amplificación adecuada, el valor de la eficiencia debe encontrarse entre -3,3 y -3,8, de forma que el porcentaje de eficiencia varíe entre 100% y 83%.

3.1.9 Determinación de la cantidad de colágeno en tejido

Para poder determinar si Cortistatina afectaba de alguna manera a la síntesis de colágeno, decidimos medir la cantidad de esta proteína en la piel y los pulmones obtenidos a partir de los ratones de estudio. Para ello, empleamos una técnica indirecta de cuantificación del colágeno, basada en la cuantificación de la hidroxiprolina. La hidroxiprolina es un aminoácido presente en el 13,5% de la estructura de las moléculas de colágeno maduras por lo que, sabiendo su cantidad, podemos extrapolar la cantidad total de colágeno presente.

La determinación de la cantidad de hidroxiprolina de una muestra se basa en un método colorimétrico en el que los aminoácidos de hidroxiprolina obtenidos tras la hidrólisis del colágeno, son oxidados por medio de la Cloramina T a una molécula de pirrol. Esta molécula reacciona con el compuesto DMAB (también conocido como solución de Erlich) dando lugar a un cromóforo cuyo pico de absorción se encuentra entre 540 y 570 nm (Figura 25) (184).

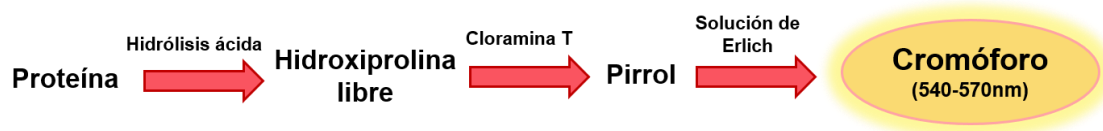


Figura 25. Principio del ensayo de la hidroxiprolina

Así, a partir de los tejidos obtenidos de los ratones determinamos la cantidad de hidroxiprolina presente en los mismos. Para ello, en primer lugar, se pesaron las muestras y cada una se introdujo en 1 ml de HCl (VWR) 6 N (los pesos debían encontrarse en torno a 100 mg de tejido). Se llevó a cabo la homogeneización a 13500 rpm, durante 30 segundos en el caso de la piel y 10 segundos en el caso de los pulmones (el tiempo podía variar en función de la facilidad que tuviera el tejido en cuestión para disgregarse). El homogenado se transfirió a tubos resistentes al ácido y a las altas temperaturas (Sarstedt). Tras agitar las muestras con un vortex, estas se incubaron a 95°C durante 20 horas, protegidas de la luz y en agitación (650 rpm para la piel y 400 rpm para los pulmones), con el fin de favorecer la hidrólisis de las moléculas de colágeno. Una vez hidrolizado, las muestras se centrifugaron a 13000 g durante 15 minutos a TA. Se transfirió el sobrenadante a tubos normales y se diluyó con agua MilliQ de manera que las muestras quedaran a una concentración 4 N de HCl. A continuación, se añadieron 35 µl de cada muestra por duplicado en una placa de 96 pocillos (Thermo Fisher). Con el objetivo de oxidar los aminoácidos de hidroxiprolina a moléculas de pirrol-2-carboxilato se agregaron 125 µl del *Buffer Assay* (20% reactivo de cloramina T + 80% *buffer* acetato-citrato, tabla 5). Las muestras se dejaron incubar durante 25 minutos a TA en un agitador orbital a 300 rpm, protegidas de la luz. Inmediatamente, tras los 25 minutos, se añadieron 125 µl de la solución de Erlich (15% DMAB (Sigma-Aldrich) en una solución de 1-propanol y ácido perclórico (Sigma-Aldrich) 2:1 (v:v)) a cada pocillo. La placa se incubó a 60°C durante 1 hora protegida de la luz. Finalmente, la colorimetría de la placa se leyó a una longitud de onda de 550 nm mediante el lector *VersaMax Microplate Reader* y el programa *SoftMax Pro*.

Reactivo de Cloramina T (20%)	<i>Buffer</i> acetato-citrato (80%) pH 6,5
6% Cloramina T en 1-propanol al 50%	Acetato de sodio anhidro 910 mM
	Ácido cítrico 240 mM
	Ácido acético 1,2%
	Hidróxido de sodio 850 mM

Tabla 5. Composición del *buffer* acetato-citrato.
Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Además de las muestras, en cada placa de estudio se preparó una curva estándar de hidroxiprolina (Sigma-Aldrich) en HCl 4 N, cuya concentración variaba desde 50 µg/ml hasta 0

$\mu\text{g}/\text{ml}$ mediante diluciones seriadas $\frac{1}{2}$. Las muestras de la curva se sometieron a los mismos procesos que las muestras de estudio.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se extrapó la cantidad de hidroxiprolina de las muestras a partir de la curva estándar. Conocida la cantidad de hidroxiprolina (13,5% de la composición del colágeno), así como el peso de cada muestra, se obtuvo la concentración final de colágeno en μg de colágeno/mg de tejido.

3.2 Objetivo 2. Estudio de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el potencial efecto antifibrótico de Cortistatina

Con el fin de estudiar los mecanismos celulares y moleculares relacionados con la respuesta anti-fibrótica de Cortistatina, evitando todo el ambiente inflamatorio, celular y molecular presentes en el animal, se puso a punto la técnica de aislamiento y cultivo de fibroblastos procedentes de la piel y los pulmones de los ratones CST^{+/+}, CST^{+/-} y CST^{-/-}. Además, se pusieron a punto los distintos experimentos llevados a cabo sobre estas células, los cuales se describirán a continuación.

3.2.1 Aislamiento de fibroblastos primarios

Para aislar los fibroblastos, las muestras de piel y pulmón fueron extraídas de ratones CST^{+/+}, CST^{+/-} y CST^{-/-} de una semana y tres meses, respectivamente. Cada muestra se lavó en PBS 1X sin calcio/magnesio estéril y se colocó en una placa de cultivo (Falcon) donde se procedió a su disgregación mecánica mediante el uso de escalpelos. Los fragmentos resultantes se transfirieron a un vaso de precipitado con una mosca estéril. Cada placa de cultivo se lavó con 10 ml de medio DMEM/F12 (Gibco) + 1% antibiótico/antimicótico penicilina/estreptomicina (Gibco) + 1% glutamina (Gibco) + 0,14 U/ml enzima Liberasa (Roche), y se añadió al vaso de precipitado con el tejido. La liberasa fue específica para cada tejido, siendo TL (*Thermolysin Low*) para pulmón y DH (*Dispase High*) para piel. Posteriormente, los vasos de precipitado cubiertos se incubaron en agitación y condiciones de esterilidad, durante un tiempo de 90 minutos en el caso de los fibroblastos de piel y 60 en el caso de las células de pulmón, a 37°C. Tras este tiempo, se pipeteó la solución de cada vaso para romper los aglomerados. Las soluciones se transfirieron a tubos de 50 ml (Falcon). Los vasos de precipitado de cada muestra se lavaron tres veces con 10 ml de medio DMEM/F12 completo (DMEM/F12, 15% de SFB (suero fetal bovino) (Gibco), 1% glutamina y 1% antibiótico/antimicótico), que se añadieron posteriormente a cada tubo correspondiente. Los tubos se centrifugaron a 524 g durante 5 minutos a TA, tras lo cual se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de medio DMEM/F12 completo. Se añadieron 30 ml más de medio DMEM/F12 completo y, tras mezclar bien, se centrifugó de nuevo a 524 g durante 5 minutos a TA. Se repitió el proceso anterior y se centrifugó por tercera vez con las mismas condiciones. Finalmente, se resuspendió el pellet en 12 ml de medio DMEM/F12 completo, se transfirió la solución a un frasco de cultivo de 75cm² NuncTM (Thermo Fisher) y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ y 3% de O₂ durante 3-7 días (el tiempo puede variar en función de la confluencia de las células). Tras el tiempo de incubación se cambió el medio de cultivo de cada frasco a medio MEM α 1X completo (*Minimum essential medium α 1X (c/n L-glutamina)*) (Gibco), 15% de SFB y 1% antibiótico/antimicótico) para permitir el crecimiento de las células ya extraídas y adheridas.

3.2.2 Cultivo de fibroblastos primarios

Una vez que los fibroblastos hubieron alcanzado una confluencia del 80% se procedió a levantar las células para cuantificarlas, amplificar, congelar los cultivos y/o preparar los experimentos pertinentes. En todo momento, los cultivos se manipularon en condiciones de máxima esterilidad.

Para poder separar las células, una vez retirado el medio, se lavó cada frasco con 10 ml de PBS sin calcio/magnesio y se incubó con 2 ml de *Trypsin-EDTA solution* 1X (Sigma-Aldrich) a 37°C, durante un tiempo máximo de 15 minutos. Se paró la reacción de la tripsina añadiendo 12 ml de medio MEM α 1X completo. Se transfirió el medio con las células a un esterilín de 30 ml (Deltalab) y este se centrifugó a 524 g durante 5 minutos a TA. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de medio MEM α 1X completo.

Para contar la cantidad de células vivas presentes, se preparó una dilución 1:2 de la suspensión celular con *Erythrosin B staining solution* y se transfirieron 10 μ l de la misma a una cámara Neubauer. De la misma forma a la descrita en el punto 3.1.3, se realizó el conteo de las células que conservaban su estructura birrefringente, excluyendo aquellas que adquirían un color rosáceo. Una vez contados los fibroblastos presentes en los cuatro cuadrantes de la cámara se calculó la cantidad total de células presentes en el esterilín. Para ello, se empleó la fórmula descrita en el apartado 3.1.3.

Una vez conocida la cantidad total de células en cada esterilín se repartieron las células en frascos de cultivo de 175 cm² NuncTM (Thermo Fisher) a razón de 500.000 células/frasco y se le añadió el medio MEM α 1X completo necesario para su mantenimiento. Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y 3% de O₂.

3.2.3 Congelación y descongelación de fibroblastos primarios

Por otro lado, con la finalidad de conservar una reserva de fibroblastos primarios, se procedió a congelar una fracción de los cultivos aislados. Para ello, las células una vez tripsinizadas y centrifugadas se resuspendieron en medio de congelación (95% SFB + 5% Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich)) y se alicuoteó en criotubos estériles (Sarstedt) que se almacenaron inmediatamente a -80°C.

Para descongelar las células, las alícuotas se resuspendieron en 10 ml de medio MEM α 1X completo en un esterilín. Para eliminar el DMSO presente, se centrifugó la mezcla a 524 g durante 5 minutos a TA. El pellet se resuspendió en el medio MEM α 1X completo y se transfirió a un frasco de cultivo para permitir el crecimiento de las células (condiciones de incubación iguales a las descritas anteriormente).

3.2.4 Preparación de cultivos de fibroblastos para los experimentos

Para llevar a cabo los diferentes experimentos sobre los fibroblastos, las células crecidas en los frascos se tripsinizaron con el fin de separarlas y se centrifugaron a 524 g durante 5 minutos a TA, tal y como se ha descrito en el punto 3.2.2. Posteriormente se resuspendieron en el medio MEM α 1X completo y se contabilizaron las células vivas como ya se ha descrito. Finalmente, las células se plaquearon en frascos de 75 cm² o en placas NuncTM (Thermo Fisher) de 6, 24 o 96 pocillos con una densidad celular específica, según las necesidades de cada experimento. En todos los ensayos, una vez que las células estuvieron preparadas para el experimento específico se efectuó la sincronización de los cultivos, con la finalidad de que todas las células se encontraran en la misma fase del ciclo celular (G0) y este aspecto no alterara los resultados obtenidos. Para ello, el medio MEM α 1X completo se les reemplazó por medio MEM α 1X con 1% antibiótico/antimicótico, pero sin SFB y se mantuvieron en esas condiciones O/N.

Tras esto, se volvió a cambiar el medio a MEM α 1X completo y se pasó a realizar el experimento pertinente.

3.2.5 Análisis de la expresión génica en cultivos fibroblastos

Para poder estudiar tanto la expresión de Cortistatina y sus receptores como si la falta del neuropéptido tenía algún efecto en la expresión génica de factores relacionados con los procesos de fibrosis, se puso a punto el cultivo de fibroblastos, el aislamiento de su ARN y la cuantificación de la expresión de los marcadores de interés mediante RT-qPCR.

Los fibroblastos procedentes de animales CST^{+/+}, CST^{+/-} y CST^{-/-} se cultivaron en placas de 6 pocillos, con una densidad de 40000 células totales por pocillo. Una vez que las células alcanzaron una confluencia del 80%, se sincronizaron O/N. Tras este proceso, el medio sin suero se reemplazó por medio MEM α 1X completo. Entre las condiciones de estudio se encontraban: células con medio completo; y células con medio completo a los que se añadió (TGF β 1) (Peprotech) a una concentración de 10 ng/ ml.

Tras 24 horas, se procedió al aislamiento del ARN siguiendo el protocolo basado en el uso de TriPure similar al detallado en el punto 3.1.8. Para ello, se aspiró el sobrenadante celular y los pocillos se lavaron 2 veces con PBS sin calcio/magnesio. A continuación, se añadieron 500 μ l de TriPure por pocillo. Se incubó durante 10 minutos sobre hielo, permitiendo así que el TriPure rompiera las membranas celulares. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se transfirió el contenido de cada pocillo a un tubo libre de ADNasas y ARNasas. A continuación, se añadieron 100 μ l de cloroformo a cada muestra, se mezcló bien por inversión y se incubó durante 5 minutos a 4°C, para favorecer la separación de las fases. Los tubos se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, tras lo cual se tomó la fase acuosa que contenía el ARN. Para asegurar la pureza del ARN, las muestras se incubaron durante 10 minutos con un volumen igual de la mezcla cloroformo + alcohol isoamílico (24:1 (v/v)) a TA y se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. Para precipitar el ARN, se añadieron 250 μ l de isopropanol y se dejó actuar O/N a -20°C. Tras esto, se llevó a cabo una centrifugación a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante por decantación, se añadieron 300 μ l de etanol 75% y se centrifugó a 7600 g durante 5 minutos a 4°C. De nuevo, se eliminó el sobrenadante por decantación y se dejó secar el pellet: una vez seco, el pellet se resuspendió en 40 μ l de agua de libre de nucleasas. Finalmente, para desnaturalizar las proteínas ARNasas presentes, se calentaron las muestras durante 15 minutos a 65°C. La cantidad de ARN aislado el ARN se midió mediante el espectrofotómetro *Nanodrop 1000*.

Tanto la obtención de ADNc, como el estudio de expresión de los marcadores de interés mediante qPCR y su posterior análisis, se realizaron empleando los mismos protocolos a los anteriormente especificados. Los *primers* empleados se indican en la tabla 3 del anexo. Las condiciones de PCR fueron: 5 minutos a 94°C para activar la polimerasa y una fase de amplificación de 40 ciclos: 94°C-30"/60°C-30"/72°C-30".

3.2.6 Análisis de la expresión proteica en cultivos de fibroblastos

Para poder determinar si la falta de Cortistatina alteraba de alguna forma la expresión de marcadores relacionados con la fibrosis, así como la activación de vías de señalización

profibróticas, decidimos estudiar la expresión proteica de los fibroblastos procedentes de animales CST^{+/+}, CST^{+/-} y CST^{-/-} mediante *Western Blot*.

Para poder llevar a cabo este estudio, los fibroblastos se plaquearon y prepararon de la forma ya descrita para el análisis de expresión génica. Las proteínas celulares se aislaron en tres puntos temporales, en función de los marcadores a estudiar:

1º) Para poder estudiar las diferencias en la activación de las quinasas relacionadas con las rutas de señalización profibróticas se extrajeron las proteínas tras 1 hora de incubación de los cultivos con el medio MEM α 1X completo \pm TGF β 1, a una concentración de 10 ng/ml.

2º) Para poder determinar la expresión diferencial de marcadores relacionados con las fibrosis, como CTGF o α SMA, se aislaron las proteínas tras 24 horas de incubación.

3º) Además, para poder estudiar si las diferencias en la expresión proteica de dichos marcadores se producían y/o mantenían una vez bien establecida la fibrosis también se procedió a extraer y estudiar la expresión de las proteínas de interés tras 6 días de incubación de los cultivos con el medio MEM α 1X completo \pm TGF β 1.

En todos los casos, el proceso de extracción y cuantificación proteica fue el que se describe a continuación. En primer lugar, se tomó el sobrenadante de los pocillos (este se almacenó a -80°C para poder usarlo en otros ensayos). Los pocillos vacíos se lavaron 2 veces con PBS sin calcio ni magnesio a TA. Tras esto, las placas se pusieron sobre hielo y se les añadió un *buffer* de lisis (*Rippa Buffer*: 50 mM Tris HCl pH 7,4 + 150 mM NaCl + 1 mM EDTA + 1% Tritón X-100 + 1% ácido desoxicólico de sodio (Sigma-Aldrich) + 0,1% SDS) capaz de romper tanto la membrana plasmática como la membrana nuclear de las células. Para evitar la degradación de las proteínas celulares y la desfosforilación de las quinasas se añadió al *buffer* de lisis un inhibidor de proteasas (*Protease inhibitor cocktail*, Sigma-Aldrich) en concentración 1/500 y un inhibidor de fosfatasas (*PhosSTOP*, Roche) 1X. Las placas se incubaron con el *buffer* de lisis y los inhibidores durante 1 hora a 4°C y en agitación. Tras este tiempo se favoreció la separación de las células y su lisis mediante el uso de un *scraper*. Se volvieron a incubar las placas durante otra hora a 4°C y en agitación. Finalmente, se recogió el sobrenadante de cada pocillo y se centrifugó a 20814 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante proteico se transfirió a un nuevo tubo y se almacenó a -80°C hasta el momento de su cuantificación.

La cuantificación de las proteínas totales presentes en cada muestra se llevó a cabo mediante el kit *DC Protein Assay* (BioRad), el lector *VersaMax Microplate Reader* y el programa *SoftMax Pro*. Una vez cuantificadas, se añadió a las muestras el *buffer* de carga (*Laemmly Sample Buffer* 4X (BioRad) + β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) 1/10) a una concentración 1X y se almacenaron a -20°C hasta la ejecución de los *Western Blots*.

Los experimentos de *Western Blot* se realizaron siguiendo el protocolo que se describe a continuación, y que puede dividirse en 3 fases: 1) fase de separación de proteínas mediante electroforesis; 2) fase de transferencia de proteínas a la membrana de *Western Blot*; y 3) fase de detección de proteínas específicas mediante el uso de anticuerpos.

1) Separación de proteínas mediante electroforesis

Para poder separar las proteínas en función de su tamaño se realizó una electroforesis vertical en condiciones reductoras y desnaturizantes. Para ello, se cargaron 10 µg de proteína total en geles de poliacrilamida situadas en cubetas verticales de BioRad llenas con *buffer* de corrida (5 mM Tris + 192 mM glicina (Sigma-Aldrich) + 0.1% SDS).

Los geles de poliacrilamida, generados en el laboratorio, presentaban dos regiones. La región superior en la que se cargaban las proteínas, “Porción concentradora”, que permitía que todas las proteínas presentes en una muestra se agrupasen en un mismo punto antes de comenzar a separarse; y la región inferior del gel, “Porción separadora”, con un porcentaje mayor de poliacrilamida, por el que las proteínas iban migrando y se iban separando según su tamaño. Además, en función del tamaño de la proteína a estudiar los geles de poliacrilamida fueron de dos tipos, según el porcentaje de acrilamida/bisacrilamida 30% (29:1) (BioRad) que contenían: geles con la porción separadora al 12% y la porción concentradora al 6%; y geles con la porción separadora al 8% y la porción concentradora al 4% (Tabla 4).

	Gel para proteínas con un tamaño 10-70 KDa	
	Porción separadora - 12 %	Porción concentradora - 6%
Agua MilliQ	2,7 ml	1,8 ml
Acrilamida/bisacrilamida 30%	3,2 ml (12%)	0,7 ml (6%)
Buffer 100X	Separador - 2 ml (25X)	Concentrador - 0,8 ml (25X)
TEMED	8 µl (0,1X)	3,3 µl (0,1X)
APS 10%	80 µl (1X)	33 µl (1X)
	Gel para proteínas con un tamaño 25-200 KDa	
	Porción separadora - 8 %	Porción concentradora - 4%
Agua MilliQ	3,7 ml	2 ml
Acrilamida/bisacrilamida 30%	2,2 ml (8%)	0,4 ml (4%)
Buffer 100X	Separador - 2 ml (25X)	Concentrador - 0,8 ml (25X)
TEMED 100X	8 µl (0,1X)	3,3 µl (0,1X)
APS 10%	80 µl (1X)	33 µl (1X)

Tabla 4. Composición de geles de poliacrilamida

Se indican los componentes necesarios para la generación de 1 gel. La composición del *Buffer* Separador es 1,5M Tris-HCl pH 8,8 + 10 ml SDS 20%; y la composición del *Buffer* Concentrador es 0,5M Tris-HCl pH 6,8 + 10 ml SDS 20%. El TEMED y el APS fueron obtenidos de la casa comercial BioRad.

Una vez cargadas las muestras en los geles correspondientes se comenzó la electroforesis con un voltaje inicial de 60 V durante los primeros 20 minutos, para permitir que todas las proteínas de cada muestra se agruparan en el gel concentrador. Transcurrido ese tiempo, se aumentó el voltaje a 140 V y se dejó migrar a las proteínas hasta que el frente de corrida salió por completo del gel.

Además de las muestras de interés, se cargó en un pocillo un marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Standards All Blue*, BioRad) que permitiría conocer en pasos posteriores el tamaño las proteínas de interés.

2) Transferencia de proteínas a la membrana de Western Blot

Una vez resueltos los geles se procedió a la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a las membranas donde tendría lugar la detección mediante anticuerpos. La transferencia se hizo mediante un sistema semi-seco, usando las membranas *Mobilon-FL PVDF* (Millipore) y un *buffer* de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3 + Glicina 192 mM + Metanol (VWR) 20%). Previamente a la transferencia, las membranas tuvieron que ser activadas sumergiéndolas durante un minuto en metanol y lavadas en TBS 1X (*Tris buffered saline*, donde TBS 10X: Tris 100 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,5). Además, todos los componentes de la transferencia tales como los geles de poliacrilamida, las membranas y el papel de filtro *Extra Thick Blot Paper* (BioRad) que cerraría el “sándwich” fueron sumergidos en el *buffer* de transferencia durante unos minutos. Una vez preparados todos los componentes, se inició el proceso de transferencia con un voltaje de 25V durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, las membranas se lavaron con agua MilliQ y se tiñeron con *Ponceau S solution* (Sigma-Aldrich) durante 3 minutos. Este colorante de cargas negativas interacciona con las cargas positivas de los aminoácidos de las proteínas, quedando unido a ellas mediante interacciones electrostáticas. Esto permite conocer si la transferencia se ha producido de forma exitosa. Una vez comprobado que las proteínas han migrado desde el gel de poliacrilamida hacia la membrana, estas se lavaron con agua MilliQ hasta eliminar todo el *Ponceau*, dando paso a la fase de detección con anticuerpos.

3) Detección de proteínas específicas mediante el uso de anticuerpos

Con el fin de evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo, las membranas se sumergieron en solución de bloqueo (TBS-T (TBS 1X + 0,1% Tween 20) + 5% BSA) durante 1 hora a TA y en agitación. Posteriormente, se hicieron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T. Una vez preparadas las membranas, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario correspondiente (Anexo. Tabla 4) O/N a 4°C y en agitación. Los anticuerpos fueron diluidos en una solución de TBS-T con 2% de BSA. Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron 3 con TBS-T. A continuación, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 hora a TA en agitación y protegido de la luz. Los anticuerpos secundarios (Anexo. Tabla 5), se diluyeron (1:20000) en una solución de TBS-T con 2% BSA + 0,02% SDS. Transcurrido el tiempo de incubación, con el fin de eliminar los anticuerpos secundarios no unidos, se realizaron 3 lavados con TBS-T y uno con TBS 1X, todos de 10 minutos. Durante todos los lavados las membranas permanecieron protegidas de la luz.

Finalmente, las bandas proteicas se visualizaron empleando el sistema de imágenes *Odyssey® CLx* (LI-COR Biosciences) y el software *Image Studio™* (LI-COR Biosciences). Una vez obtenidas las imágenes estas se analizaron mediante el programa *ImageJ-Fiji*. La expresión de las proteínas de interés se representa como la intensidad de la señal de cada banda proteica relativa la señal de su proteína normalizadora.

Las bandas proteicas se visualizaron empleando el sistema de imágenes *Odyssey® CLx* y el software *Image Studio™*. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el programa *ImageJ-*

Fiji. La expresión de las proteínas de interés se representa como la intensidad de la señal de cada banda proteica relativa la señal de su proteína normalizadora, α Tubulina.

3.2.7 Inmunofluorescencia indirecta sobre cultivos de fibroblastos

Con el fin de estudiar la expresión y localización celular de determinadas proteínas relacionadas con el proceso de fibrosis, tales como SMAD 2/3, AKT, CTGF o α SMA, se puso a punto la técnica de inmunofluorescencia indirecta sobre cultivos primarios de fibroblastos.

Para realizar esta técnica se prepararon placas de 24 pocillos con cubreobjetos de cristal estériles de 12 mm de diámetro (Thermo Fisher). A continuación, se plaquearon las células con una densidad celular de 1000 y 1500 células totales. Se dejaron crecer en condiciones de 37°C con 5% de CO₂ y 3% de O₂ hasta obtener una confluencia adecuada, momento en el cual las células se sincronizaron con su medio sin suero. Tras esto, se cambió el medio a uno completo, en el que permanecieron 1 hora, 24 horas, o 6 días según los requerimientos del experimento. En función de las condiciones de cada experimento, se les añadió a los cultivos sólo medio completo o medio completo con TGF β 1 a 10 ng/ml.

Una vez transcurridos los tiempos específicos de cada experimento, se aspiró el sobrenadante celular y se fijaron las células con paraformaldehído al 4% con glucosa al 2% (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos a TA. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X sin calcio ni magnesio y tras esto, se realizó una incubación con glicina 30 mM durante 5 minutos. Tras otros dos lavados con PBS, se permeabilizaron las células con Tritón TX-100 al 0,1% durante 15 minutos a TA. A continuación, se hicieron 3 lavados más con PBS y se incubó con solución de bloqueo (5% SFB + 0,3% Tritón TX-100 en PBS 1X sin calcio ni magnesio) durante una hora a TA. Tras aspirar el bloqueo, se añadió el anticuerpo primario (Anexo. Tabla 6) con dilución 1:200 en una solución de PBS 1X sin Ca⁺² ni Mg⁺² con BSA al 1% y Tritón TX-100 al 0,3%. Se dejó O/N a 4°C y en oscuridad. Una vez incubado el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados con PBS y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (Anexo. Tabla 6). Para ello, el anticuerpo secundario se preparó con una dilución 1:1000 en una solución similar a la usada para el anticuerpo primario (PBS 1X sin Ca⁺² ni Mg⁺²) con BSA al 1% y Tritón TX-100 al 0,3%. Se dejó durante una hora a TA y protegido de la luz. A continuación, se hicieron 3 lavados con PBS y las células se incubaron durante 5 minutos con solución de DAPI (Sigma-Aldrich) 1:500 en PBS 1X sin Ca⁺² ni Mg⁺². Finalmente, se hicieron 3 lavados más con PBS y llevó a cabo el montaje de los cristales con Moviol. Tras dejar secar el Moviol y se almacenaron los cortes a 4°C y en oscuridad.

Además, en cada inmunofluorescencia se realizaron pruebas de autofluorescencia, siguiendo todos los pasos del protocolo descrito, pero sin añadir ningún anticuerpo a los pocillos. Así mismo, se comprobó la especificidad de unión del anticuerpo secundario, incubando las células sólo con este anticuerpo sin haberlo hecho previamente con el primario.

Finalmente se obtuvieron imágenes mediante el microscopio *Olympus*® a un aumento de 400X y el programa *CellSens Imaging software*. Para poder determinar la translocación de las quinasas fosforiladas y activadas en los distintos cultivos se midió la intensidad de señal (*integrated density*) en los núcleos celulares mediante el programa *Fiji-ImageJ*. Para los análisis, todas las imágenes a comparar se tomaron en las mismas condiciones y con los mismos parámetros, y fueron analizadas con el mismo tamaño de ROI (*Region Of Interest*).

3.2.8 Estudio de la tasa de crecimiento celular de cultivos de fibroblastos

Para poder determinar si la velocidad de crecimiento de los fibroblastos se veía alterada en función de la expresión de Cortistatina se procedió a realizar una curva de proliferación de los diferentes cultivos. Para ello, las células CST^{+/+}, CST^{+/-} y CST^{-/-} se plaquearon en frascos de 75 cm² con una densidad de 51400 células totales. Tras 24 horas, se sincronizaron los cultivos con medio sin suero y se incubaron O/N en las condiciones óptimas de crecimiento (de 37°C con 5% de CO₂ y 3% de O₂). Una vez sincronizadas, se les añadió medio completo y se comenzó el estudio. Para ello, se contó cada 48 horas el número de células totales presentes en cada frasco durante un período total de dos semanas. De cada cultivo se prepararon dos réplicas por día.

3.2.9 Estudio de la viabilidad de cultivos de fibroblastos

Para estudiar si la falta de Cortistatina afectaba a la viabilidad de los fibroblastos, a partir de células procedentes de animales CST^{+/+}, CST^{+/-} y CST^{-/-} se realizaron dos técnicas: el ensayo de Alamar-Blue y el ensayo de determinación de ATP. Para llevarlas a cabo, se plaquearon las células en placas estériles de 96 pocillos, transparentes para la técnica de Alamar Blue y opacas para la técnica de ATP. Para ello, se pusieron 1500 células por pocillo teniendo, al menos, cuatro réplicas por cultivo. Las placas se mantuvieron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂ y 3% de O₂, tiempo tras el cual, el medio MEM α 1X completo se les cambió por medio sin suero, con el fin de sincronizar los cultivos. Se mantuvieron así O/N. Posteriormente, se les volvió a administrar medio completo, dando inicio a los experimentos *per sé*. Así, se mantuvo a las células en condiciones de 37°C con 5% de CO₂ y 3% de O₂ durante 48, 72, 96 y hasta 144 horas, puntos temporales en los cuales se llevaron a cabo las técnicas de determinación de la viabilidad. Una hora antes a la realización de las técnicas, se añadió Tritón TX-100 al 1% en uno de los pocillos de cada cultivo, que serviría como control de muerte celular. Además, pocillos con medio completo, pero con ausencia de células, sirvieron como blanco de la placa de estudio.

Técnica de Alamar-Blue

La técnica de *Alamar-Blue* permite conocer de forma indirecta la viabilidad celular por medio del estudio de la actividad de las enzimas *succinato deshidrogenasas* mitocondriales y citoplasmáticas. Esta técnica se basa en la reducción de la Resazurina, de color azul y no fluorescente al que las células son permeables, a Resofurina de color rosa fluorescente (Figura 26) (185). Así, la cantidad de fluorescencia medida es directamente proporcional a la cantidad de células vivas en el cultivo.

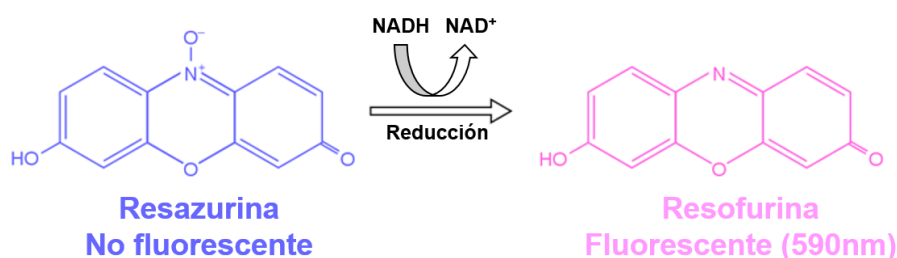


Figura 26. Reducción de Resazurina a Resofurina
Principio en el que se basa la técnica de *Alamar Blue* (tomada de (185))

En los puntos temporales ya descritos se añadió a los cultivos 20 µl/pocillo de Resazurina 1X (Resazurin sodium Salt, Sigma-Aldrich). Se incubaron las células a 37°C con 5% de CO₂ y 3% de O₂ protegidas de la luz. Transcurridas cuatro horas se midió la fluorescencia de los cultivos mediante el empleo del lector de microplacas *i-control*TM *microplate reader* (Tecan Trading AG) (onda de excitación de 550 nm; onda de emisión 590 nm) y el software *i-control microplate reader software* (Tecan Trading AG).

Técnica de determinación de ATP

El ensayo de determinación de ATP es otra técnica que permite conocer de forma indirecta la viabilidad celular. Cuando las células pierden la integridad de su membrana disminuyen su capacidad de sintetizar ATP y las ATPasas agotan rápidamente el ATP del citoplasma celular. Por lo tanto, la disminución en la cantidad de ATP es un indicador de la disminución de la viabilidad celular. El ensayo de la determinación ATP se basa en la capacidad de la enzima *luciferasa* en catalizar la monooxigenación de la luciferina en presencia de Mg⁺², oxígeno molecular y el ATP presente en el cultivo celular, reacción que produce luz (Figura 27). De manera que la luminiscencia generada es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente en el cultivo, siendo así un indicador indirecto la viabilidad del cultivo de estudio (185).



Figura 27. Oxidación de la Luciferina por medio de la enzima Luciferasa
Principio en el que se basa la técnica de ATP (tomada de (183)).

Para realizar la técnica de determinación de ATP se empleó el kit *CellTiter-Glo*[®] *Luminescent Cell Viability Assay* (Promega) y siguió el protocolo descrito por la casa comercial. Para ello, se añadieron 50µl del reactivo CellTiter-Glo Reagent, que contenía la enzima *luciferasa*, detergentes para lisar las células e inhibidores de ATPasas, a cada pocillo. Las placas, protegidas de la luz, se mantuvieron en agitación a 900rpm en agitadores orbitales durante 2 minutos y, posteriormente, se incubaron durante 10 minutos a TA para estabilizar la señal de la luminiscencia. Finalmente, se midió la luminiscencia mediante el lector de microplacas *i-control*TM *microplate reader* y el software *i-control microplate reader software*.

3.2.10 Estudio de cierre de la herida: *Scratch Assay*

Debido a que, durante el proceso de cicatrización de una herida se produce la migración de las células con el objetivo de cerrarla, decidimos estudiar si la falta de Cortistatina, ya fuera parcial o total, afectaba a esta capacidad de los fibroblastos. Para llevar a cabo el estudio de migración celular, los fibroblastos se plaquearon en placas Ibidi de insertos de dos pocillos (*30 Culture-Insert 2 well in u-Dish 35 mM, high*), con una densidad de 1000 células por pocillo, y dos réplicas por condición de estudio. Una vez los cultivos estuvieron confluentes se sincronizaron añadiéndoles medio sin suero. Tras esto, se cambió el medio a uno completo y se retiraron los insertos, dando así inicio al experimento de “cierre de la herida”.

Una vez retirados los insertos se tomaron fotos a tiempo cero y transcurridas 12 horas se fueron realizando de forma secuencial cada 4 horas hasta el cierre completo de la herida. En cada punto temporal, se tomaron 4 fotos de cada cultivo, para poder cubrir toda la zona de interés. Las imágenes se obtuvieron con el microscopio *Olympus®* a un aumento de 100X y el programa *CellSens Imaging software*, en condiciones de contraste de fases. Una vez tomadas todas las imágenes, estas se analizaron con el programa *ImageJ-Fiji* empleando el macro *MRI Wound Healing Tool* de Volker Bäcker (sitio web: http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Wound_Healing_Tool). Este macro medía el área de la herida no cubierta por los fibroblastos. De manera que se pudo obtener la medida del área de la herida para cada punto temporal y para cada cultivo (Figura 28).

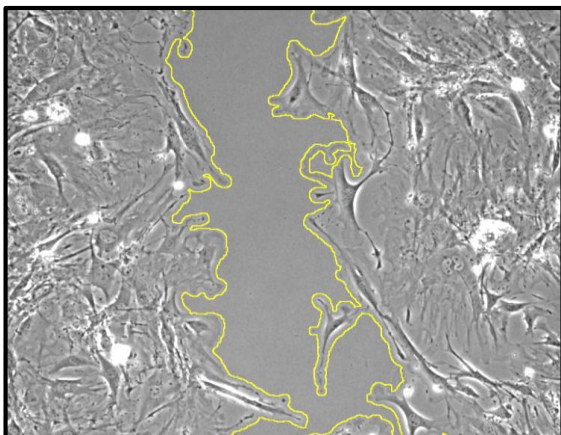


Figura 28. Aplicación del macro *MRI Wound Healing Tool* a una imagen de la herida de un cultivo celular

La zona delimitada en amarillo representa la parte de la herida no cubierta aún por los fibroblastos. El macro permite delimitar la zona de forma automática y calcular el área de la misma

3.2.11 Estudio del transcriptoma de fibroblastos

La qPCR se trata de una técnica altamente sensible y específica que permite cuantificar la expresión de un gen y los cambios que se producen en dicha expresión en diferentes condiciones. Sin embargo, sólo permite analizar un conjunto de genes concretos, seleccionados previamente para su estudio. Esto hace necesario que se apliquen otras técnicas que permitan estudiar, no unos pocos genes, si no la expresión de todos los genes posibles de una muestra biológica.

A nivel celular, la información genética almacenada en el ADN se expresa a través de los mecanismos de transcripción y traducción, por medio de los cuales se obtienen moléculas de ARNm y proteínas respectivamente. De forma general, la cantidad de moléculas producidas de un determinado ARNm depende de la función que este tenga en un proceso celular concreto. De manera que ante una condición determinada que requiera que tenga lugar ese proceso, se incrementará la cantidad de ese ARNm o, dicho de otra forma, de ese transcrito. Por lo tanto, el estudio y análisis del transcriptoma es esencial para poder entender la función de los genes. Gracias a los avances en las técnicas de secuenciación de ADN, es posible el análisis global del estudio del transcriptoma no sólo a partir de ADNc, sino también por medio de la secuenciación del ARN, por medio de una técnica conocida como ARNseq. Por medio de esta técnica el ARN total o el ARNm se fragmenta de manera aleatoria, generándose una librería de ADNc. A este ADNc se ligan unos adaptadores en los extremos 5' y 3', de secuencia conocida, que permiten la secuenciación de los fragmentos (186).

Para realizar el estudio del transcriptoma de los fibroblastos, se emplearon células procedentes de los pulmones de animales CST^{+/+} y CST^{-/-}. Para obtener los cultivos sobre los que

se haría el análisis del transcriptoma se siguió el siguiente modelo experimental: a partir del tejido (pulmón) de un animal se aislaron tres sub-cultivos diferentes de fibroblastos. Una vez crecidos los tres sub-cultivos, en el primer pase, se mezclaron a partes iguales en frascos de 75 cm², con una densidad de 71500 células de cada uno (cantidad total de células por frasco 214500), dando lugar al cultivo final de fibroblastos sobre el que se haría el estudio. Para cada genotipo este modelo se repitió tres veces, obteniéndose así tres réplicas biológicas de cada uno (Figura 29). Para poder hacer el estudio del transcriptoma es necesario alcanzar una concentración mínima de ARN de 500 ng totales. Por esta razón, se prepararon 2 réplicas de cada cultivo que se unirían posteriormente. Además, se preparó una tercera réplica para extraer las proteínas, y poder estudiar la expresión proteica de los mismos.

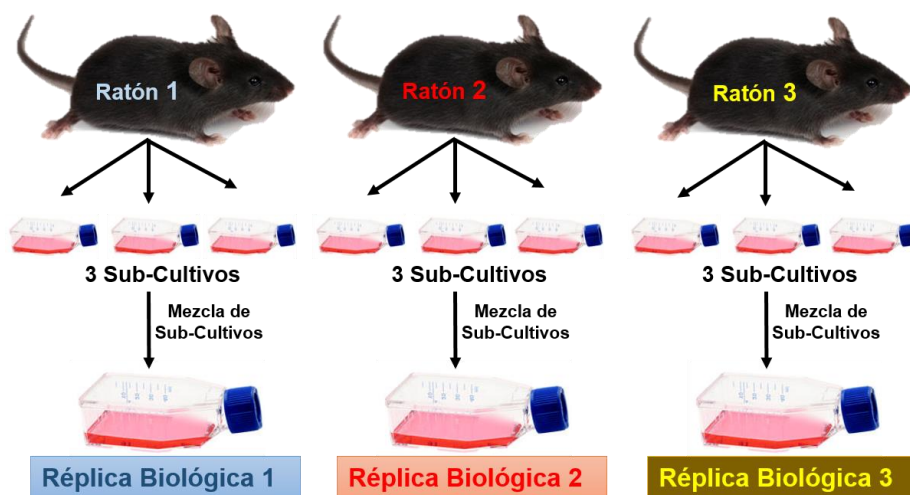


Figura 29. Modelo experimental del transcriptoma de fibroblastos de pulmón

Para el análisis del transcriptoma se emplearon 3 ratones CST^{+/+} y 3 CST^{-/-}, obteniéndose así 6 muestras para el transcriptoma: 3 réplicas biológicas de fibroblastos CST^{+/+} y 3 réplicas biológicas de fibroblastos CST^{-/-}.

Una vez que las células alcanzaron una confluencia del 80%, se sincronizaron O/N, tras lo cual el medio de sincronización se reemplazó por medio completo. Transcurridas 24 horas en presencia del medio completo, se procedió al aislamiento del ARN.

Un paso fundamental en el estudio del transcriptoma es la obtención de un ARN de grado biología molecular, para lo cual empleamos el protocolo basado en el uso de TriPure. Para llevarlo a cabo se aspiró el sobrenadante celular y los frascos se lavaron 2 veces con PBS sin calcio/magnesio. Una vez bien aspirado el segundo lavado, se añadieron 500 µl de TriPure por frasco. Este se incubó durante 10 minutos sobre hielo, permitiendo así que el TriPure disgregara las membranas celulares. Además, mediante el uso de un scrapper se favoreció la acción del reactivo. Tras la incubación se transfirió el contenido de cada frasco a un tubo libre de ADNAsas y ARNAsas (las réplicas se juntaron en un mismo tubo). Las muestras se congelaron a -80°C hasta el momento del aislamiento del ARN.

Para aislar el ARN se emplearon 500 µl de la suspensión de células en TriPure, dejando así otros 500 µl congelados a -80°C por si fuera necesario repetir la extracción. El proceso de extracción del ARN fue similar al descrito en el apartado 3.13, añadiendo el paso adicional de la incubación con cloroformo + alcohol isoamílico 24:1 (v/v), con el fin de asegurar la pureza y calidad del material genético.

Una vez aislado ARN, este se cuantificó mediante un *Nanodrop 1000* y se envió a la unidad de genómica del IPBLN-CSIC, donde verificaron la calidad del ARN mediante una electroforesis en un nanochip *Bioanalyzer RNA 6000* (Agilent Technologies) el cual proporcionó un número de integridad del ARN (RIN) $\geq 9,3$ (del inglés *RNA integrity number*, RIN). Finalmente, se generaron 6 bibliotecas utilizando el kit de preparación de muestras de ARN trenzado TruSeq™ (Illumina), siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, se validó la calidad y distribución del tamaño de las bibliotecas enriquecidas por PCR por medio del ensayo de ADN de alta sensibilidad Bioanalyzer (Agilent Technologies). También se midió la concentración mediante el fluorímetro Qubit® (ThermoFisher). Posteriormente, estas bibliotecas se combinaron de manera equimolecular y se diluyeron y desnaturalizaron según lo recomendado por la guía de preparación de bibliotecas *Illumina NextSeq 500* de alto rendimiento, produciendo 28,6 Gbp de lecturas de extremo emparejado (*paired-ended*) de 75 pb (19,968,076 lecturas por muestra en promedio). De forma general, el mecanismo que emplea esta tecnología puede dividirse en las siguientes fases:

1) Generación de una librería de ADN o ADNc: a partir de una molécula de ADN o ADNc se generan de forma aleatoria fragmentos más pequeños. A esos fragmentos se les añaden unos oligonucleótidos en los extremos 5' y 3', que servirán como adaptadores en los pasos posteriores.

2) Generación de *clusters* de ADN: se añaden los fragmentos de ADN unidos a los adaptadores a una celda de flujo, la cual presenta anclada a su superficie unos oligonucleótidos complementarios a esos adaptadores. De manera que se produce la hibridación de los adaptadores con esos oligonucleótidos anclados. Una polimerasa se une a la secuencia hibridada y, empleando la secuencia del oligonucleótido fijado como un *primer*, lleva a cabo la síntesis de la cadena complementaria del ADN. A continuación, la doble cadena generada se desnaturaliza, liberándose la cadena original (Figura 30a). Por su parte, la nueva cadena generada a partir del oligonucleótido fijado a la superficie se dobla e hibrida por el adaptador de su extremo 3' con otro oligonucleótido fijado a la celda, formando un puente (Figura 30b). A continuación, una polimerasa se une y, usando ese segundo oligonucleótido fijado a la superficie como *primer* lleva a cabo la síntesis de la cadena complementaria, en lo que se denomina amplificación de puente (Figura 30c). De nuevo la doble cadena se desnaturaliza, obteniendo dos cadenas simples complementarias (una *forward* y otra *reverse*) ancladas a la superficie (Figura 30d). Este proceso se produce de forma secuencial, de manera que se genera un *cluster* de ese fragmento de ADN (Figura 30e) (187).

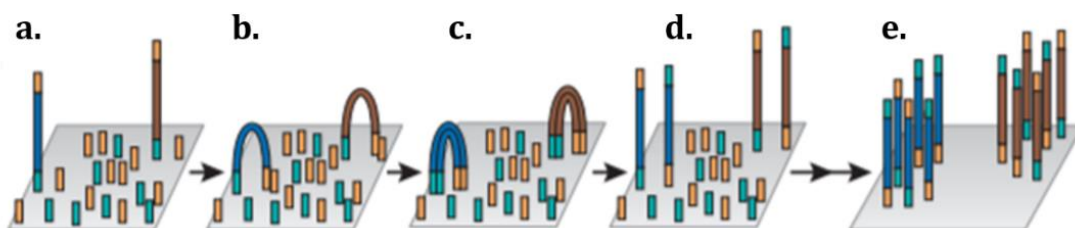


Figura 30. Fase de generación de *clusters* de ADN mediante la tecnología *Solexa/Illumina* (tomada de (187))

3) Secuenciación por síntesis: se basa en la secuenciación de Sanger, a partir de una secuencia de ADN molde y oligonucleótidos marcados con un fluoróforo específico. La diferencia con la secuenciación de Sanger es que en este caso se añaden terminadores reversibles. De forma que en cada ciclo la polimerasa une un nucleótido marcado con un fluoróforo específico, por complementariedad de bases (Figura 31a). A continuación, se realiza un lavado para eliminar los

nucleótidos no unidos y, con un láser, se excita el fluoróforo del nucleótido incorporado, cuya emisión es recogida por un sistema detector (Figura 31b). Se realiza otro lavado para eliminar el fluoróforo y los terminadores reversibles (Figura 31c). Tras esto, vuelven a añadirse los nucleótidos y se continúa la síntesis de la misma manera, repitiendo los ciclos de forma secuencial (Figura 31d a 31f). A la emisión recogida por el sistema detector, se le asigna un nucleótido específico, creando así la secuencia (188).

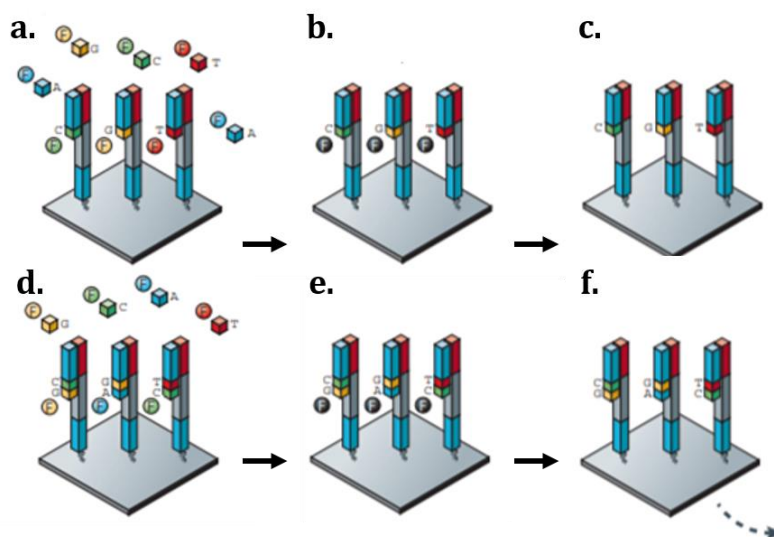


Figura 31. Fase de secuenciación por síntesis mediante la tecnología Solexa/Illumina
(tomada de (188))

Una vez realizada la secuenciación por el servicio de genómica usando la tecnología explicada, los datos obtenidos se enviaron al servicio de bioinformática del IPBLN-CSIC, donde se encargaron del análisis de los mismos. Para ello, las muestras transcriptómicas se analizaron utilizando el *pipeline* miARma-Seq (189). Inicialmente, los datos de secuencia sin procesar se sometieron a evaluación mediante el *software* FastQC, que proporciona un informe en profundidad de la calidad de las lecturas (190). Posteriormente, se homogeneizó el número de lecturas por muestra utilizando el *software* Seqtk (191), tras lo cual se realizó el filtrado y recorte de la muestra, obteniendo un promedio de 18437877 fragmentos por muestra con una media del 51% en contenido de GC. A continuación, miARma-Seq alineó todas las secuencias procesadas y filtradas por calidad utilizando HISAT2 (192), dando como resultado un 97,49% de lecturas alineadas correctamente. Para ello, utilizamos el Gencode de *Mus musculus* versión M22 (GRCm38.p6). Con el fin de obtener sus valores de expresión, se utilizó el *software* featureCounts para asignar lecturas de secuencia a los genes (193). La anotación del gen de referencia también se obtuvo del Gencode del mismo ensamblaje y construcción del genoma.

A continuación, se realizó un análisis de expresión diferencial empleando el paquete edgeR (194). Se eliminaron los genes de baja expresión y los genes restantes se normalizaron mediante el método de la media recortada de los valores M (195). Para verificar la consistencia de las réplicas se emplearon recuentos por millón (del inglés *Counts per million*, CPM) y el logaritmo en base dos de CPM (\log_2 CPM) (194). Además, se calcularon las lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas (del inglés *Reads per kilobase Million*, RPKM) para cada gen en cada muestra. A continuación, se utilizó el análisis de componentes principales (del inglés *Principal component analysis*, PCA) y la agrupación jerárquica de muestras normalizadas para explorar los datos y obtener una descripción general de la similitud de las muestras de secuenciación de ARN

(196,197). Finalmente, se calcularon los genes diferencialmente expresados (del inglés *Differentially expressed genes*, DEG) entre las muestras CST^{+/+} y CST^{-/-} empleando un FDR (del inglés *False Discovery rate*) inferior a 0,05 (FDR<0,05). A partir de los DEGs, se seleccionaron 8 genes con el objetivo de validar el resultado obtenido en el transcriptoma mediante análisis por RT-qPCR. Los *primers* empleados en la validación del transcriptoma se muestran en la tabla 7 del anexo.

Por último, empleando el paquete clusterProfiler (Bioconductor), se compararon los DEGs con todos los genes expresados en el transcriptoma, con el fin de realizar un estudio de enriquecimiento funcional (198). Los términos de la ontología genética para cada gen se obtuvieron de la base de datos de Bioconductor de *Mus musculus* y se asociaron a los identificadores de genes de Entrez Gene mediante el objeto de R *orgDB* a través del paquete AnnotationForge que se empleó con clusterProfiler. Así, se obtuvo el análisis de enriquecimiento de Ontología Genética para términos de Proceso Biológico (PB), Función Molecular (FM) y Compartimento Celular (CC). A partir de los nombres de los genes de *Mus musculus* adquiridos previamente de Gencode también se calculó el enriquecimiento KEGG (del inglés *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

3.3 Objetivo 3. Estudio del posible efecto terapéutico de la administración de Cortistatina en enfermedades crónicas asociadas a procesos de fibrosis

3.3.1 Animales de experimentación

Para realizar el estudio del efecto terapéutico de la administración de Cortistatina, se emplearon ratones C57BL/6J adultos de 3 meses con una dotación génica normal o parcial para Cortistatina (animales CST^{+/+} o CST^{+/-}). También se emplearon ratones *Naive* como control. Todos los animales recibieron los mismos cuidados y tratos a los descritos en el apartado 3.1.1.

3.3.2 Modelos de fibrosis y tratamiento con Cortistatina

Modelo de esclerodermia inducido por Bleomicina y tratamiento con Cortistatina

La inducción del modelo de esclerodermia mediante el uso de Bleomicina se realizó de la misma forma a la ya descrita en el apartado 3.2.1. Además, con el fin de evitar el proceso inflamatorio previo al proceso fibrótico y poder estudiar el efecto de la administración de Cortistatina, los ratones que fueron tratados con Cortistatina recibieron una dosis s.c de 3540 ng del péptido Cortistatina-29 (Tabla 6) o del vehículo cada dos días, a partir del cuarto día del inicio del modelo y hasta el final del mismo (Figura 32). Para realizar tanto las administraciones de Bleomicina como las del tratamiento todos los animales fueron anestesiados con Isoflurano.

Péptido	Casa comercial	Secuencia	Peso molecular
<i>Cortistatin-29 (rat) trifluoroacetate salt</i>	Bachem	Pyr- E-R-P-P-L-Q-Q-P-P-H-R-D-K-K-P-C-K-N-F-F-W-K-T-F-S-S-C-K-OH trifluoroacetate salt	3540,09 Da

Tabla 6. Datos del péptido Cortistatina-29 empleado para tratar a los animales de estudio

Se indica el nombre, la casa comercial, la secuencia y el peso molecular. Pyr: *Pyroglutamyl*. El péptido fue disuelto en agua (BioRad) a una concentración de 10^{-4} M y almacenado a -80°C .

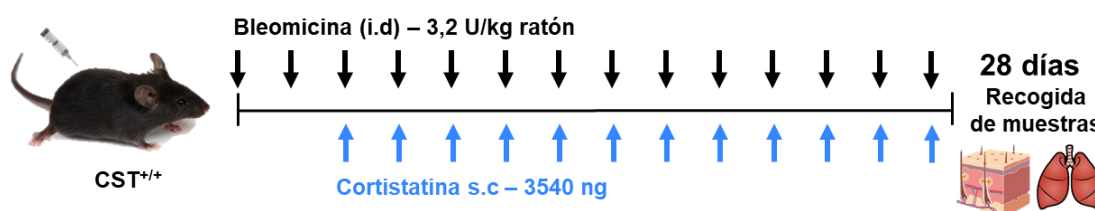


Figura 32. Modelo de esclerodermia inducido por Bleomicina y tratamiento con Cortistatina

Las muestras de piel y pulmones obtenidas de este modelo se sometieron a los mismos protocolos de extracción, almacenamiento y análisis a los descritos para las muestras del objetivo uno.

Modelo de fibrosis pulmonar y tratamiento con Cortistatina

Para inducir fibrosis pulmonar a los ratones, se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.1.2. Sin embargo, para el desarrollo del presente objetivo, debido a que sólo se utilizaron ratones $CST^{+/+}$, menos susceptibles al antibiótico que los animales $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$, se administraron 3,2 U/kg de ratón de Sulfato de Bleomicina. El tratamiento con Cortistatina-29 se realizó siguiendo dos regímenes: un régimen protector, en el que la administración se realizó desde el primer día del modelo mediante inyecciones i.p de 3540 ng cada dos días hasta el final del modelo; y un régimen terapéutico en el que las administraciones se realizaron desde el quinto día del inicio del experimento de forma i.p (3540 ng) o i.n (170 ng), una vez superado todo el proceso inflamatorio previo. Además, se indujo el modelo de fibrosis (Bleomicina 1,8 U/ kg) y se trató de forma terapéutica a ratones $CST^{+/-}$ con el objetivo fue estudiar si la administración de Cortistatina exógena permitía a estos animales adquirir un fenotipo similar al de los ratones $CST^{+/+}$ (recuperación fenotípica) (Figura 33).

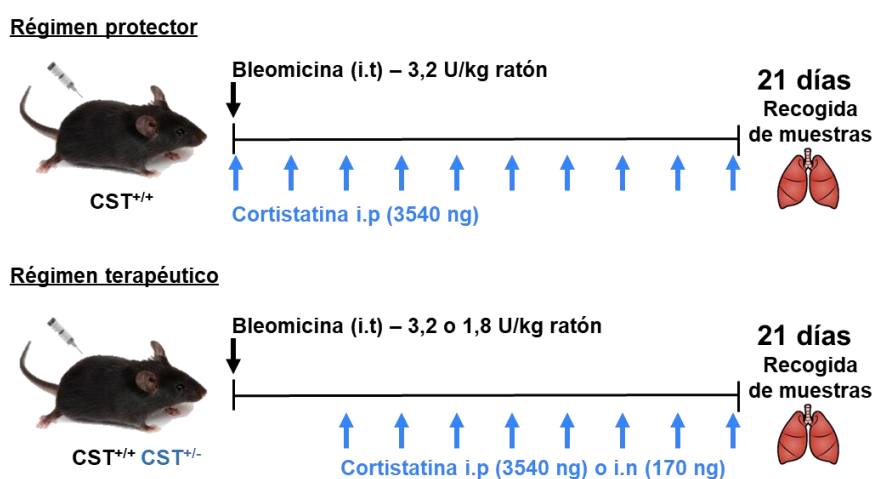


Figura 33. Modelo de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina y tratamientos con Cortistatina

Las muestras de pulmones y BAL obtenidas se sometieron a los mismos protocolos de extracción, almacenamiento y análisis a los descritos en el objetivo uno. Así mismo, se supervisó la supervivencia y el peso de los diferentes grupos de animales durante el desarrollo del modelo.

Estudio del papel de los receptores de Somatostatina y Grelina en el efecto antifibrótico de Cortistatina

Con el fin de determinar si Cortistatina ejercía su efecto antifibrótico por medio de los receptores de Somatostatina y Grelina se emplearon antagonistas de los mismos: Ciclosomatostatina (CycloSOM), como antagonista de SSTR1-SSTR5 (Sigma-Aldrich); y GHRP-6 como antagonista de GHSR (*[D-Lys3]-Growth Hormone Releasing Peptide 6*, Sigma-Aldrich). Los antagonistas se administraron a animales $CST^{+/-}$ con fibrosis pulmonar (Bleomicina 1,8 U/ kg) 30 minutos antes del tratamiento terapéutico con Cortistatina (3540 ng i.p), de forma i.n a razón de 10 μ g/ratón (aproximadamente 500 μ g/kg de ratón). Los animales a los que no se administraron los antagonistas recibieron el vehículo. Tras 10 días del inicio del modelo, se extrajeron los pulmones de los animales y se analizó el grado de lesión pulmonar y el depósito de colágeno.

3.4 Objetivo 4. Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en el uso de Cortistatina capaces de incrementar su eficacia en términos de biodisponibilidad

Como ya se ha descrito, un defecto de las terapias basadas en el uso de citoquinas y neuropéptidos se halla en la corta vida media que presentan. Como consecuencia de ello, sufren una rápida degradación disminuyendo así su efectividad y siendo necesarias grandes dosis de administración de forma frecuente, con los posibles efectos adversos que ello conlleva. Por tanto, resulta de interés desarrollar estrategias basadas en ingeniería molecular capaces de solucionar estos inconvenientes. Con el objetivo de obtener una molécula de Cortistatina con una vida media más alta y una mayor especificidad de acción, empleamos herramientas de biología molecular basándonos en el trabajo de Adams G. y colaboradores (178). Para ello, la estrategia seguida consistió en generar una construcción recombinante de Cortistatina en la cual el neuropéptido se encontraría unido a la proteína de latencia de TGF β , LAP (Figura 34a). Con el fin de que la estructura tuviera la flexibilidad adecuada para poder plegarse de forma correcta, además de LAP, se añadirían dos secuencias ricas en guanina y adenina que actuarían como *linkers* (L1 y L2, Figura 34b) o espaciadores entre LAP y nuestro neuropéptido. Finalmente, para que la molécula de Cortistatina pudiera ser liberada de la estructura latente, se añadiría una secuencia de corte de enzimas MMPs entre los dos *linkers* (Figura 34c). Así, en un sitio rico en estas enzimas, como es el ambiente inflamatorio y fibrótico, nuestro neuropéptido se liberaría y podría ejercer su acción terapéutica.

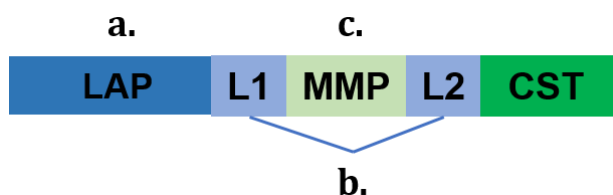


Figura 34. Esquema representativo de la molécula de Cortistatina latente

Una vez obtenida la estructura latente de Cortistatina con todos sus componentes y diferentes controles, el siguiente paso sería comprobar su funcionalidad y eficacia *in vivo*. A continuación, se detallan los protocolos seguidos para obtener la molécula de Cortistatina latente y ensayar su funcionalidad.

3.4.1 Clonaje y simulación *in silico*

Para realizar la clonación, primero se realizó la simulación del clonaje *in silico* y para ello se empleó el software libre *Serial Cloner* (sitio *web* http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html). El proceso de clonaje puede dividirse en 4 fases: 1) amplificación del fragmento SPLAP del plásmido pCMV6-XL4; 2) clonaje del fragmento SPLAP en el plásmido pGEM-T; 3) clonaje del fragmento SPLAP en el plásmido pcDNA3.1+; y 4) clonajes a partir del plásmido parental pcDNA3.1+SPLAP. Las diferentes fases se detallan a continuación.

1) Amplificación del fragmento SPLAP del plásmido pCMV6-XL4

El plásmido pCMV6-XL4 (OriGene) contiene la secuencia codificante del prepro péptido TGF β 1 (Figura 35). La región “prepro” de dicha secuencia se encuentra constituida por dos elementos: el péptido señal (del inglés *Signal Peptide*, SP), región que determina la excreción de la proteína al medio extracelular; y el péptido de latencia (del inglés *Latency Associated Protein*, LAP) que, como su nombre indica, determina su latencia.

Por medio de la base de datos *GenBank* pudo obtenerse la secuencia codificante del prepro péptido TGF β 1 en formato FASTA (NM_000660.7). Esto permitió comparar esta secuencia con la contenida en el plásmido pCMV6-XL4 mediante a la base de datos *Clustal Omega* (ExpASy; sitio *web* <https://www.expasy.org/>). Una vez comprobado que ambas secuencias coincidían, se diseñaron *primers* específicos que contenían los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI (Anexo. Tabla 8) y se llevó a cabo por PCR la amplificación del fragmento SPLAP.

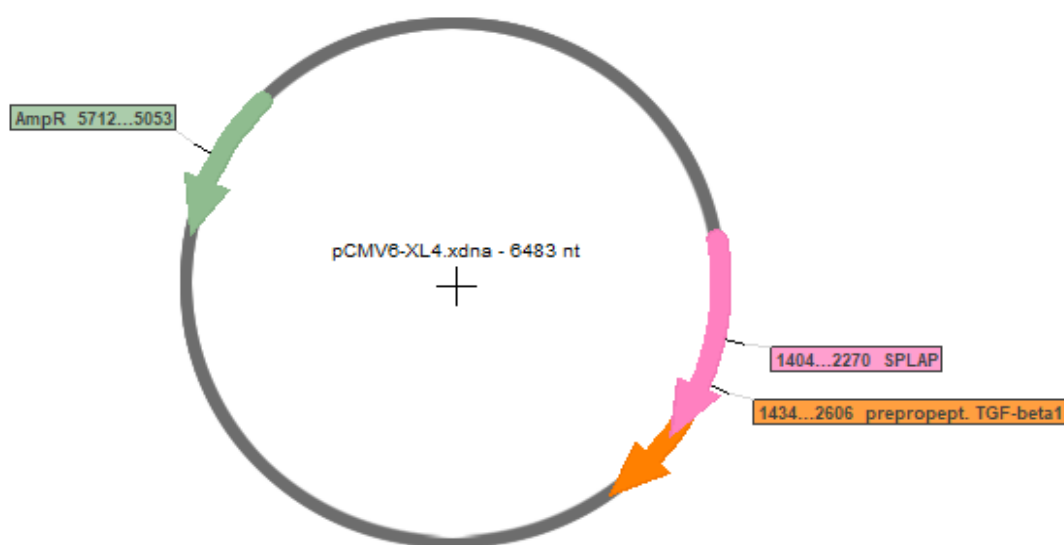


Figura 35. Representación esquemática del plásmido pCMV6-XL4 (6486 pb)

En color naranja se indica la región codificante del prepro péptido TGF β 1; en color rosa se indica la región codificante de SPLAP; finalmente, en color verde se muestra el gen de resistencia a ampicilina (AmpR).

Para llevar a cabo la PCR se empleó el kit *KAPA LongRange* (Sigma-Aldrich). Para ello, se añadieron los siguientes componentes del kit: *KAPA LongRange Buffer 5X* a una concentración 1X, MgCl₂ 25 mM a una concentración de 1,75 mM, dNTPs 10 mM a una concentración de 0,3 mM y la enzima *KAPA LongRange DNA Polymerase* (5 U/ μ L) a una concentración de 1,25 U/reacción. A esto se adicionaron los *primers* a una concentración de 500 nM y 100 ng del plásmido pCMV6-XL4. Por último, se añadió agua MilliQ hasta completar un volumen final de 50 μ l.

Para conocer a que temperatura era más específica la unión de los *primers*, se realizó un gradiente de temperaturas durante la PCR, de manera que las condiciones de la misma fueron: una etapa inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de una etapa de amplificación de 35 ciclos constituida por: 1) 2 minutos a 94°C; 2) 30 segundos a un gradiente de 55-65°C; y 3) 80 segundos

a 72°C. Para terminar, se efectuó un ciclo a 72°C durante 5 minutos. La reacción de amplificación finalizó a 4°C.

Para visualizar el producto de PCR se preparó un gel de agarosa al 1% en el *buffer* TAE 1X (10,8 g/l Tris base, 5,5 g/l ácido bórico (Sigma-Aldrich) y 4 ml/l EDTA 0,5 M pH 8) con 5 µl/100 ml del intercalante *GelRed*[®] *Nucleic Acid Stain* (Biotium) (Figura 36).

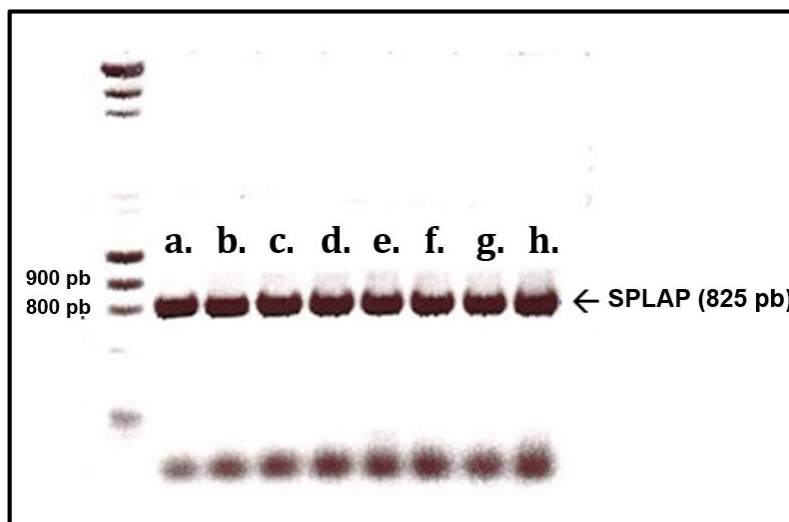


Figura 36. Digestión del plásmido pCMV6-XL4 y obtención del fragmento SPLAP clonado

Tras clonar el fragmento SPLAP (825 pb) en el plásmido pCMV6-XL4, se realizó una digestión control con *EcoRI* y *HindIII* con el fin de comprobar si la clonación había sido correcta y para poder obtener el fragmento. En la imagen se muestran los distintos fragmentos SPLAP amplificados por PCR con el gradiente de temperaturas (**a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f**, **g** y **h**) y como va variando la especificidad de los *primers*. Las bandas que aparecen al final del gel corresponden con dímeros de *primers*. El marcador de peso molecular empleado fue λ *DNA/EcoRI+HindIII Marker* 0,5 µg/µL (Promega) en un gel de agarosa al 1%.

Una vez corrido el producto de la PCR, las bandas correspondientes al fragmento SPLAP (825 pb) se seleccionaron y se purificaron mediante el kit *E.Z.N.A.*[®] *Gel Extraction Kit* (Omega), siguiendo las indicaciones del fabricante: la región del gel que contenía las bandas de interés se cortó y se pesó. En función del peso obtenido se añadió un volumen de *Binding Buffer XP2* y se incubó a 60°C hasta la fundición completa de la agarosa. A continuación, las muestras se incorporaron a columnas cromatográficas de afinidad por el ADN aportadas por el kit. De manera que, tras centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto a 4 °C, el ADN presente en la muestra quedó unido a la columna. Tras esto, la columna se lavó con la solución con 700 µl de *SPW Wash Buffer* y una centrifugación a 20000 g durante 1 minuto a TA. Este lavado se repitió una vez más, para asegurar la eliminación de todas las sales de la muestra. Se centrifugó la columna seca una vez más para asegurar el secado total de la misma, durante dos minutos a máxima velocidad y 4°C. Finalmente, se transfirió la columna a un nuevo tubo de 1,5 ml y se realizó la elución del ADN con agua 30 µl de MilliQ autoclavada. La columna se incubó durante 5 minutos a 65°C y se centrifugó durante 1 minuto a máxima velocidad. El ADN extraído se cuantificó en el *Nanodrop 1000* y se almacenó a -20°C.

2) Clonaje del fragmento SPLAP en el plásmido pGEM-T

A partir del fragmento SPLAP amplificado y purificado se clonó el plásmido pGEM-T (Promega). Para ello, en primer lugar, se seleccionó la cantidad molar de inserto y de vector a usar por medio de la ecuación:

$$ng \text{ de inserto} = \frac{ng \text{ de vector} \cdot Kb \text{ de inserto}}{Kb \text{ de vector}} \cdot \text{ratio molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}}$$

Para una cantidad de 50 ng de vector de 3 Kb, y una ratio molar de 3:1, se pudo calcular la cantidad de inserto de 0,825 Kb necesaria para llevar a cabo la reacción de clonaje. Para llevar a cabo la reacción de clonaje se empleó el kit *pGEM®-T Vector Systems* (Promega). Para realizarla se añadieron: *Rapid Ligation Buffer 2X* a una concentración 1X, 50 ng de pGEM-T, 42 ng del inserto y 3 U de DNA ligasa T₄. Por último, se añadió agua MilliQ hasta completar un volumen final de 10 µL. La reacción tuvo lugar O/N a 4°C, dando lugar, finalmente, al plásmido pGEM-T con el fragmento SPLAP incorporado (Figura 37).

Con el fin de aumentar la cantidad del plásmido obtenido, se transformaron bacterias *E. coli Top 10* competentes. Para hacer competentes a las bacterias estas se sembraron en 5 ml de medio *Luria-Bertani* (LB, 10 g/l de peptona trípica de caseína (Conda) + 5 g/l de extracto de levadura (Conda) + 10 g/l de NaCl) con 5 µg/ml de antibiótico Cloranfenicol (Sigma-Aldrich), y se mantuvieron en agitación O/N a 250 rpm y 37°C. Tras esto, se preparó una dilución 1/200 del inóculo anterior en 200 ml de medio LB sin antibiótico. Esta dilución se mantuvo en agitación entre 1 y 3 horas a 37°C, hasta que la densidad óptica a 590 nm estuvo en torno a 0,375. A continuación, las células se trasvasaron a tubos de polipropileno de 250 ml y se dejaron enfriar durante 15 minutos en hielo. Tras esto, se realizó una centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1/5 del volumen inicial (200 ml) de MgCl₂ frío estéril (40 ml). La resuspensión permaneció en hielo durante 15-20 minutos. Se volvió a centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1/50 del volumen inicial de CaCl₂ frío estéril (4 ml) y se mantuvieron en hielo durante 1 hora. Para almacenar las células, se añadió glicerol estéril hasta tener una concentración final del 15%, se mezcló bien y se alícuoteó en alícuotas de 100 µl que se guardaron a -80°C. Una vez que las bacterias fueron competentes, se mezclaron 2 µL de ADN plasmídico con 50 µL de las células. Para que tuviera lugar la entrada del plásmido a las bacterias, se incubó la mezcla 30 minutos a 4°C. Esto permitió que el ADN interaccionara con el Ca⁺² y los lípidos de la membrana, pudiendo así incorporarse a las células. Para parar la reacción, se dio un *shock* térmico a la muestra, calentándola 42°C durante 15 segundos. Finalmente, para permitir la reparación de las membranas celulares, la mezcla se puso en hielo y se le añadieron 500 µL de medio LB.

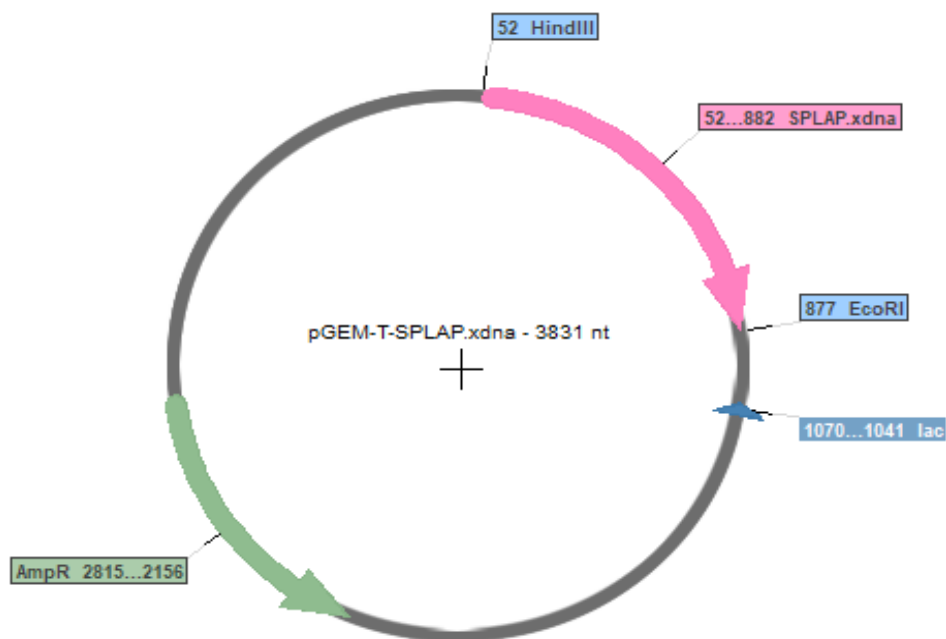


Figura 37. Representación esquemática del plásmido pGEM-T (3831 pb) con el fragmento SPLAP incorporado

En color rosa se indica la región codificante de SPLAP precedido y sucedido por los sitios de restricción de las enzimas *HindIII* y *EcoRI*; en azul se indica el operón *lac*; finalmente, en color verde se muestra el gen de resistencia a (AmpR).

Las células transformadas se colocaron en agitación a 37°C durante 1 hora para obtener, al menos, tres generaciones de colonias bacterianas. Las colonias se plaquearon en placas de Petri (Thermo Fisher) con medio LB con 100 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich), 0,8 mM IPTG (Sigma-Aldrich) y 0,04 mg/ml X-Gal (Sigma-Aldrich) y se incubaron O/N a 37°C. Estos tres compuestos adicionados al medio LB permitieron identificar las colonias bacterianas que había incorporado el plásmido con el fragmento SPLAP clonado: la ampicilina permitió seleccionar las bacterias que habían incorporado el plásmido pGEM-T, debido a que este contenía gen de resistencia para el antibiótico, AmpR; IPTG y X-Gal permitieron diferenciar aquellas colonias que habían incorporado el plásmido con el fragmento SPLAP clonado (clones recombinantes) de las que no lo habían hecho (clones transformantes). Esta diferenciación se basa en el cambio de coloración que ocurre en las colonias que no incorporan el plásmido clonado, que pasan de ser blancas a azul. Este cambio de produce debido a que en estas células tiene lugar la actividad de la enzima β -galactosidasa, codificada en el gen *lacZ* del operón *lac*. Gracias a la inducción de IPTG, la β -galactosidasa metaboliza la molécula X-gal generando 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo, un pigmento azul insoluble (Figura 38). En el caso de las colonias con el plásmido clonado, se mantiene el color blanco, debido a que la secuencia del operón *lac* se encuentra interrumpida por el fragmento SPLAP y no puede producirse β -galactosidasa, por lo que no tiene lugar la reacción.

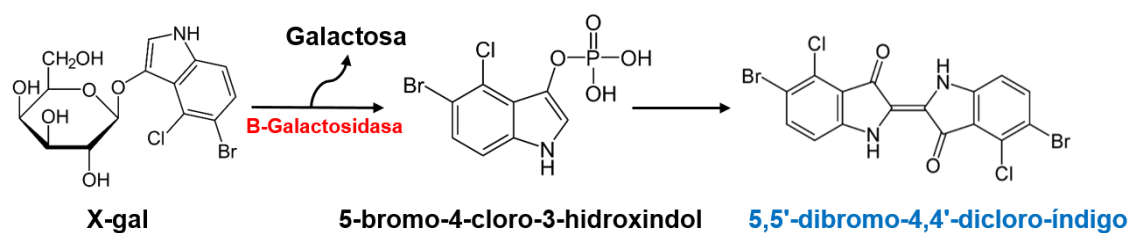


Figura 38. Reacción por la que la β -galactosidasa metaboliza la molécula X-gal generando 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo

La β -galactosidasa hidroliza a X-gal, generando galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol. Este último es oxidado dando lugar al pigmento azul 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo.

A partir de las colonias de clones recombinantes, se crearon placas master de cada clon en placas nuevas de LB con ampicilina.

Para amplificar la cantidad de plásmido, los distintos clones de las placas máster se inocularon en tubos (Falcon) con 15 ml de medio LB con ampicilina y se incubaron O/N a 37°C con una agitación orbital de 250 rpm. Tras esto, se llevó a cabo la extracción y purificación plasmídica con la ayuda del kit *E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I* (Omega), siguiendo las indicaciones del fabricante. En primer lugar, para separar las bacterias del medio, se centrifugaron los cultivos líquidos a 10000 g durante 1 minuto a TA, y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 250 μ l de la Solución I/RNAasa. Tras esto, se transfirió la suspensión a un nuevo tubo de 1,5 ml y se añadieron 250 μ l de la Solución II, solución de lisis celular con detergente para romper las membranas bacterianas y una sal básica para desnaturalizar el DNA. Tras dejar incubar durante 2-3 minutos, se adicionaron 350 μ l de la Solución III para neutralizar la solución anterior y detener la reacción. La mezcla se centrifugó a 20000g durante 10 minutos a TA y se descartó el pellet, que contenía restos celulares. El sobrenadante se transfirió a columnas cromatográficas con afinidad por el ADN proporcionadas por el kit de manera que, tras una centrifugación a 20000 g de 1 minuto, el ADN plasmídico quedaría en la columna. Tras esto, la columna se lavó con la solución *DNA Wash Buffer* y una centrifugación a 20000 g durante 1 minuto a TA. Este lavado se repitió una vez más, para asegurar la eliminación de todas las sales de la muestra. Se centrifugó la columna seca una vez más para asegurar el secado total de la misma. Finalmente, se transfirió la columna a un nuevo tubo de 1,5 ml y se realizó la elución del ADN con agua MilliQ autoclavada. La columna se incubó durante 5 minutos a 65°C y se centrifugó durante 1 minuto a máxima velocidad. El ADN extraído se cuantificó en el *Nanodrop 1000*.

Una vez aislado el ADN plasmídico se realizaron digestiones control para comprobar que el producto obtenido era el correcto. Para ello, se emplearon las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* (Thermo Fisher). Se digirió entre 1 a 5 μ g de DNA plasmídico con 10 U de *EcoRI* y 20 U de *HindIII* en el *Buffer* Tango 10X (Thermo Fisher) en concentración final 2X y se añadió agua MilliQ hasta completar un volumen de 30 μ l. Las digestiones tuvieron lugar a 37°C durante 1 hora a 300 rpm. Una vez finalizadas, los productos obtenidos se cargaron en un gel de agarosa al 1%. Además de las digestiones control, también se realizó la secuenciación de los plásmidos con los primers T7 y SP6 (Anexo. Tabla 9) para comprobar la ausencia de mutaciones.

Una vez comprobado que el ADN plasmídico aislado era correcto, el resto de plásmidos obtenidos se digirieron con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* y el producto se corrió en un gel de agarosa al 1%, empleando las condiciones descritas previamente (Figura 39). De igual

forma a la ya descrita anteriormente, se purificaron las bandas correspondientes al fragmento SPLAP mediante el kit *E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit*. Finalmente, se cuantificó la concentración del fragmento SPLAP con el *Nanodrop 1000*, y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

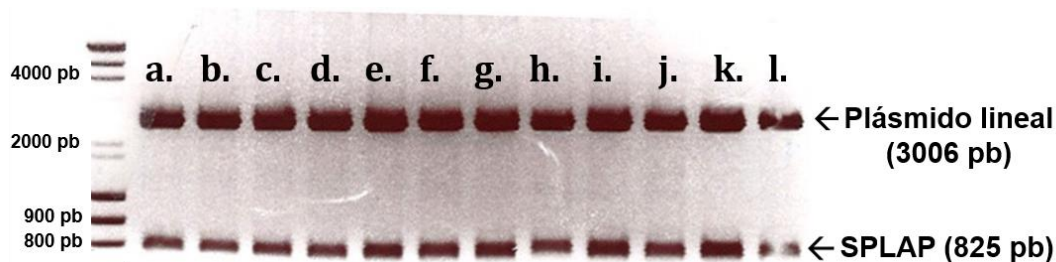


Figura 39. Digestión del plásmido pGEM-T-SPLAP y obtención del fragmento SPLAP

Imagen de los fragmentos obtenidos tras la digestión del plásmido pGEM-T-SPLAP con *HindIII* y *EcoRI*. De cada uno de los clones digeridos (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k y l), se obtuvieron los fragmentos correspondientes al plásmido lineal (3006 pb) y a SPLAP (825 pb). El marcador de peso molecular empleado fue λ *DNA/EcoRI+HindIII Marker* 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en un gel de agarosa al 1%.

3) Clonaje del fragmento SPLAP en el plásmido pcDNA3.1+

A partir del fragmento SPLAP amplificado, se llevó a cabo su clonaje en el plásmido pcDNA3.1+ (Thermo Fisher), con el fin de obtener un plásmido parental que se emplearía como base para la generación del resto de plásmidos.

Para realizar el clonaje de SPLAP en el plásmido pcDNA3.1+ (Figura 40), se ligaron 100 ng del plásmido con 45,9 ng del fragmento SPLAP en proporción 3:1, mediante la enzima *T₄ DNA ligasa* (5 U/ μL) (Invitrogen) a una concentración de 5 U/reacción. Para llevar a cabo la ligación, se empleó el *buffer* de reacción de la ligasa 5X (Invitrogen) a una concentración 1X. Finalmente se adicionó agua MilliQ hasta completar un volumen de 20 μL y se incubó O/N a TA.

Con el fin de aumentar la cantidad del plásmido parental generado, se transformaron bacterias *E. coli Top 10*, de la forma descrita anteriormente. De la misma forma, el producto se corrió en un gel de agarosa y se realizó la secuenciación de los plásmidos para comprobar la ausencia de mutaciones.

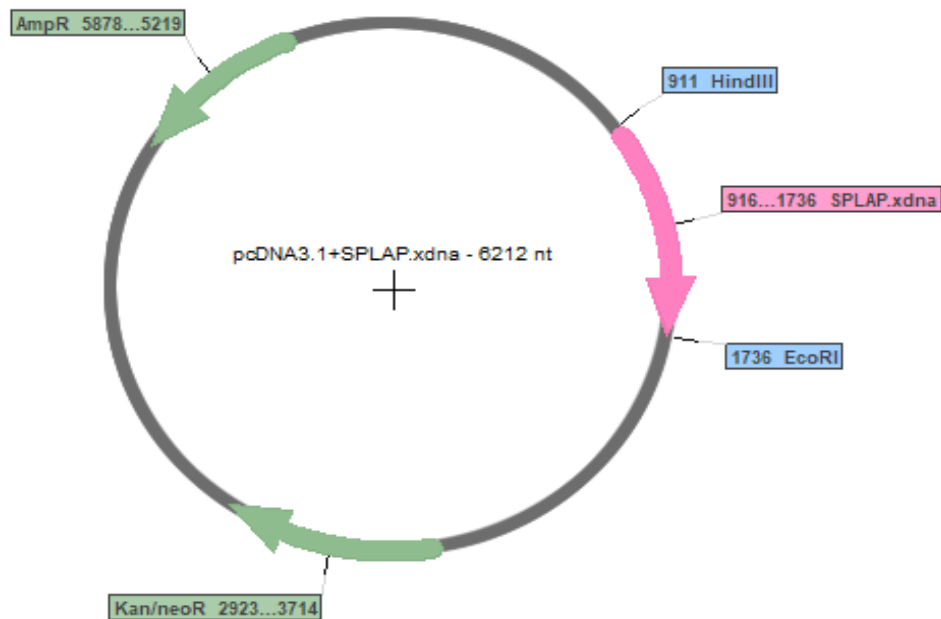


Figura 40. Representación esquemática del plásmido pcDNA3.1+ (6212 pb) con el fragmento SPLAP incorporado

La ligación del plásmido y SPLAP genera un plásmido parental que servirá para obtener el resto de construcciones. En color rosa se indica la región codificante de SPLAP precedido y sucedido por los sitios de restricción de las enzimas *HindIII* y *EcoRI*; en color verde se muestran el gen de resistencia a ampicilina (AmpR) y el gen de resistencia a kanamicina/neomicina (Kan/neoR).

4) Clonajes a partir del plásmido parental pcDNA3.1+SPLAP

A partir del plásmido parental, se obtuvieron el resto de plásmidos necesarios: pcDNA3.1+SPLAPCST29r, pcDNA3.1+SPLAPL1L2CST29r y pcDNA3.1+SPLAPL1MMP L2CST29r.

Para llevar a cabo la síntesis de los plásmidos a partir de plásmido parental, se empleó la técnica *In-fusion Cloning*, mediante la cual se desarrollaban moléculas de ADN de doble cadena (del inglés *double-stranded DNA*, dsDNA). Estos ADN de doble cadena incluirían: la secuencia a insertar (CST29r, L1L2CST29r o L1MMPL2CST29r); 15 pb que precedían y sucedían a dicha secuencia y que eran homólogas a la región del plásmido parental en la cual se quería insertar el fragmento de interés; y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *EcoRI* (Anexo. Tabla 10). Los distintos dsDNA se mandaron sintetizar a la casa comercial Metabion. En todos los casos, se ajustó el marco de lectura de dichos *primers* para que se mantuviera en fase y para mantener el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *EcoRI*. Para generar los distintos plásmidos, se incluyeron 200 ng de dsDNA y 100 ng del plásmido parental pcDNA3.1+SPLAP linealizado con *EcoRI*. A esto se añadió la enzima recombinasa *In-Fusion HD 5X* (Takara Bio) a una concentración 1X y agua MilliQ hasta completar un volumen de 10 μ L. La reacción tuvo lugar a 50°C durante 15 minutos en un termociclador, tras la cual se obtuvieron los tres plásmidos de interés (Figura 41).

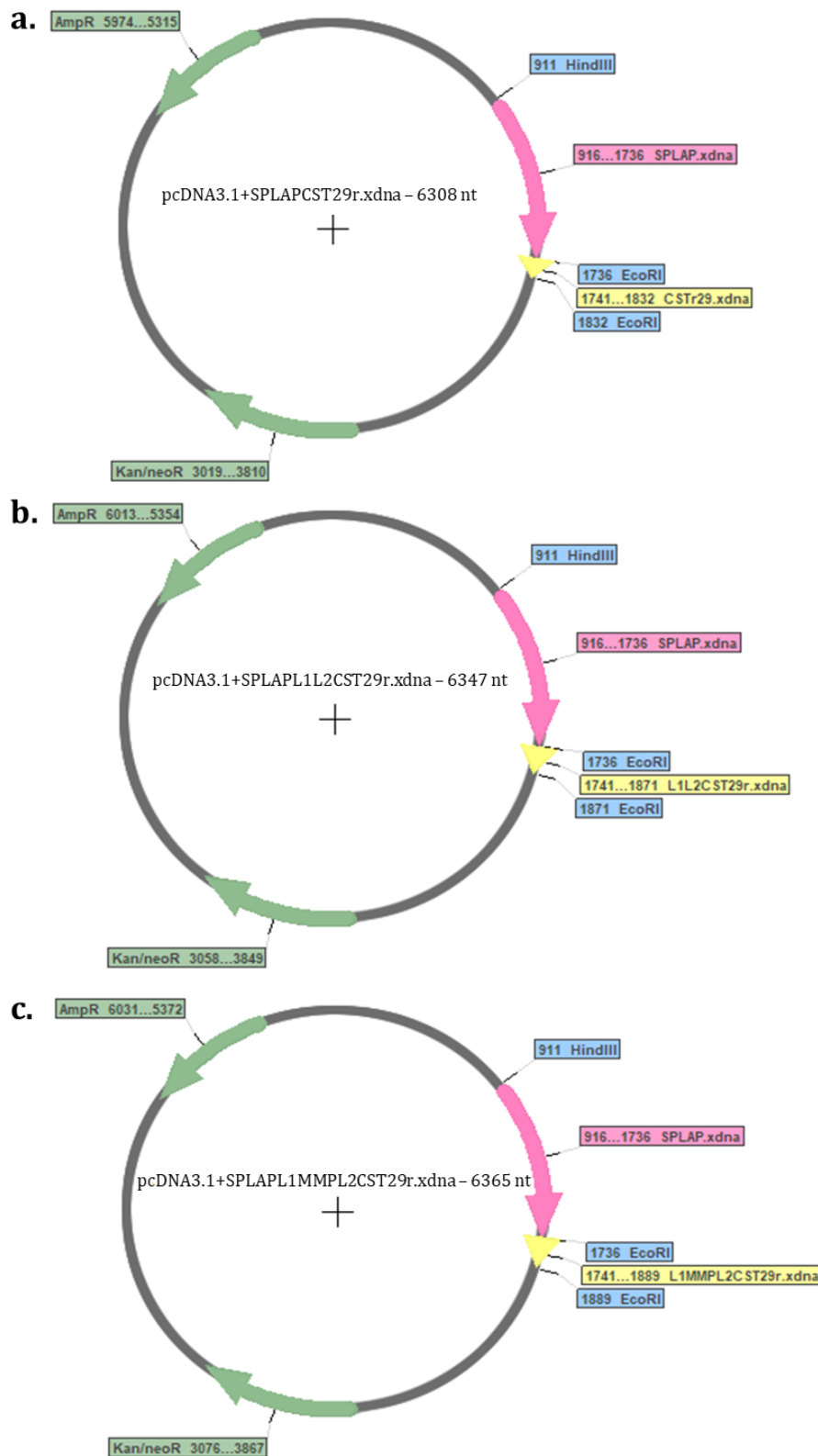


Figura 41. Representación esquemática de los plásmidos pcDNA3.1+SPLAPCST29r (6308 pb), pcDNA3.1+SPLAPL1L2CST29r (6347 pb) y pcDNA3.1+SPLAPL1MMPL2CST29r (6308 pb)
 En color rosa se indica la región SPLAP precedido y sucedido por los sitios de restricción de las enzimas *HindIII* y *EcoRI*; en color verde se muestran el gen de resistencia a ampicilina (AmpR) y el gen de resistencia a kanamicina/neomicina (Kan/NeoR); y en color amarillo se resaltan las regiones con el fragmento CST29r (a), L1L2CST29r (b) y L1MMPL2CST29r (c).

Para aumentar su cantidad, los plásmidos obtenidos se clonaron en bacterias *E. coli* Top 10, seleccionándose los clones positivos que habían adquirido el plásmido, y se purificación siguiendo los protocolos especificados anteriormente. Los plásmidos extraídos se cuantificaron con el *Nanodrop 1000*, se digirieron con *HindIII* y *EcoRI* y se secuenciaron para confirmar que eran correctos. El resultado esperado de las digestiones se muestra en la figura 50. Los resultados se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (Figura 42). Finalmente, se almacenaron a -20°C.

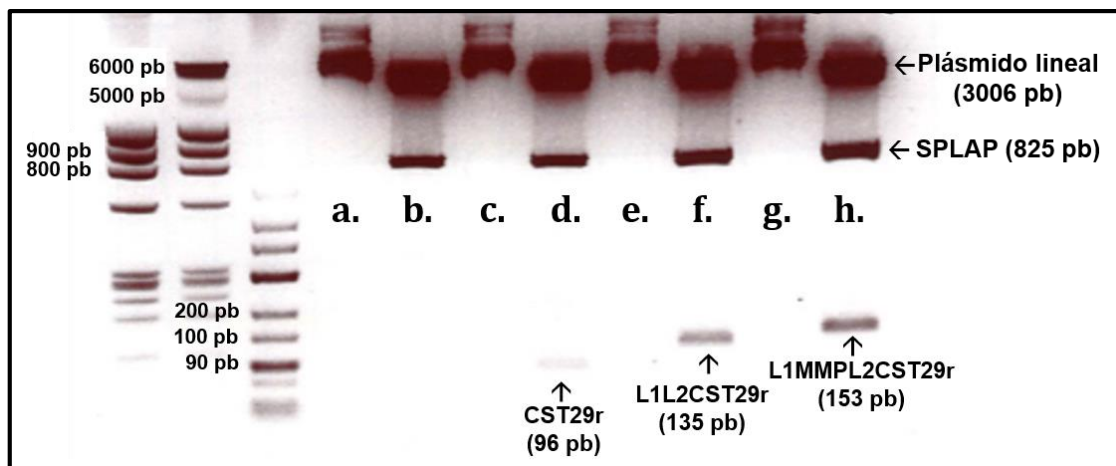


Figura 42. Digestión de los plásmidos pcDNA3.1+SPLAP, pcDNA3.1+SPLAPCST29r, pcDNA3.1+SPLAPL1L2CST29r y pcDNA3.1+SPLAPL1MMPL2CST29r

Una vez obtenidos los distintos plásmidos, estos se digirieron con *HindIII* y *EcoRI* con el fin de confirmar la presencia de los fragmentos SPLAP, CST29r, L1L2CST29r y L1MMPL2CST29r. Se muestra el gel de digestión con: **a)** Plásmido pcDNA3.1+SPLAP sin digerir (6212 pb); **b)** Plásmido pcDNA3.1+SPLAP digerido, originando fragmentos correspondientes al plásmido lineal (5387 pb) y a SPLAP (825 pb); **c)** Plásmido pcDNA3.1+SPLAPCST29r sin digerir (6308 pb); **d)** Plásmido pcDNA3.1+SPLAPCST29r digerido, originando los fragmentos correspondientes al plásmido lineal (5387 pb), SPLAP (825 pb) y CST29r (96 pb); **e)** Plásmido pcDNA3.1+SPLAPL1L2CST29r sin digerir (6347 pb); **f)** Plásmido pcDNA3.1+SPLAPL1L2CST29r digerido, originando fragmentos correspondientes al plásmido lineal (5387 pb), SPLAP (825 pb) y L1L2CST29r (135 pb); **g)** Plásmido pcDNA3.1+SPLAPL1MMPL2CST29r sin digerir (6365 pb); **h)** Plásmido pcDNA3.1+SPLAPL1MPL2CST29r digerido, originando fragmentos correspondientes al plásmido lineal (5387 pb), SPLAP (825 pb) y L1MMPL2CST29r (153 pb). Los marcadores de peso molecular empleados fueron, de izquierda a derecha: i) Φ X174 DNA/*HaeIII* Marker 1 μ g/ μ l (Promega); ii) una mezcla de λ DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker 0,5 μ g/ μ L (Promega) y Φ X174 DNA/*HaeIII* Marker 1 μ g/ μ l; y iii) *GeneRuler Low Range DNA Ladder* 0,5 μ g/ μ L (Thermo Scientific) en un gel de agarosa al 2%.

3.4.2 Transfección en células HEK293

Una vez que todos los plásmidos fueron obtenidos y amplificados y se comprobó que eran correctos, pasamos a obtener las distintas proteínas recombinantes correspondientes a cada uno. Para lograr este objetivo, los plásmidos fueron transfectados en células HEK293 (ATCC), una línea inmortalizada de células epiteliales adherentes de riñón humano. Una vez transfectadas estas células se encargarían de producir y liberar al medio las proteínas recombinantes. De manera que, en total obtendríamos 4 proteínas recombinantes (Tabla 7). La estructura predictiva de estas proteínas se muestra en la figura 43.

Plásmido	Proteína recombinante	Tamaño (KDa)
pcDNA3.1+SPLAP	LAP	28,492
pcDNA3.1+SPLAPCST29	LAPCST	32,033
pcDNA3.1+SPLAPL1L2CST29	LAPL1L2CST	32,877
pcDNA3.1+SPLAPL1 MMPL2CST29	LAPL1MMPL2CST	33,515

Tabla 7. Proteínas recombinantes obtenidas a partir de los distintos plásmidos.
Se indica el plásmido y la proteína, con su peso molecular, correspondiente.

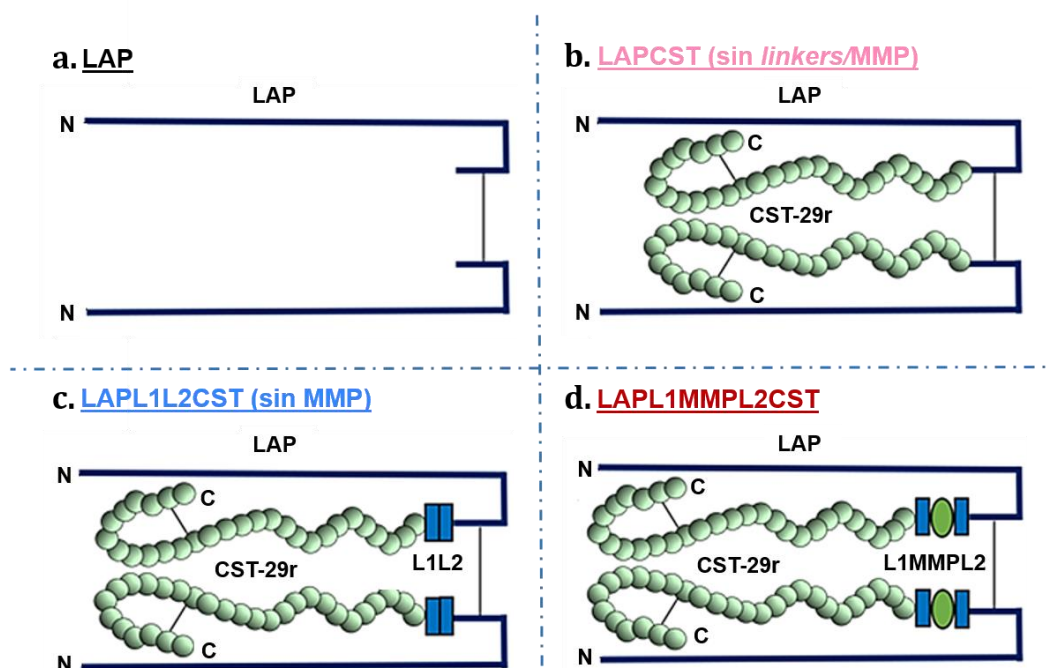


Figura 43. Representación de la estructura supuesta para las distintas proteínas recombinantes

Se muestra la estructura teórica que adoptarían las distintas proteínas. En todos los casos se muestran dos moléculas de LAP unidas por un puente disulfuro, por lo que se muestran estructuras dimericas: **a)** LAP (sin ningún otro elemento); **b)** LAPCST (sin *linkers* ni sitio de corte de MMPs); **c)** LAPL1L2CST (sin sitio de corte de MMPs); y **d)** LAPL1MMPL2CST (molécula completa). La región LAP y los puentes disulfuro entre dos LAP permitirían mantener la latencia del compuesto. Los *linkers* (L1 y L2) flanquean el sitio de reconocimiento de metaloproteinasas (MMPs), el cual permite la escisión del péptido en el foco inflamatorio, proporcionando especificidad de acción a la molécula.

Para poder llevar a cabo las distintas transfecciones fue necesaria la esterilización previa del ADN plasmídico. Para ello, el ADN se incubó con 2,5V de etanol 100% (Sigma-Aldrich) y 0,1V de acetato de sodio 3M pH 6,25 a 4°C O/N, con el fin de que precipitara. Tras esto, el ADN se centrifugó a 13000 rpm durante 40 minutos a 4°C y el pellet se dejó secar. Una vez seco, se resuspendió en agua MilliQ estéril.

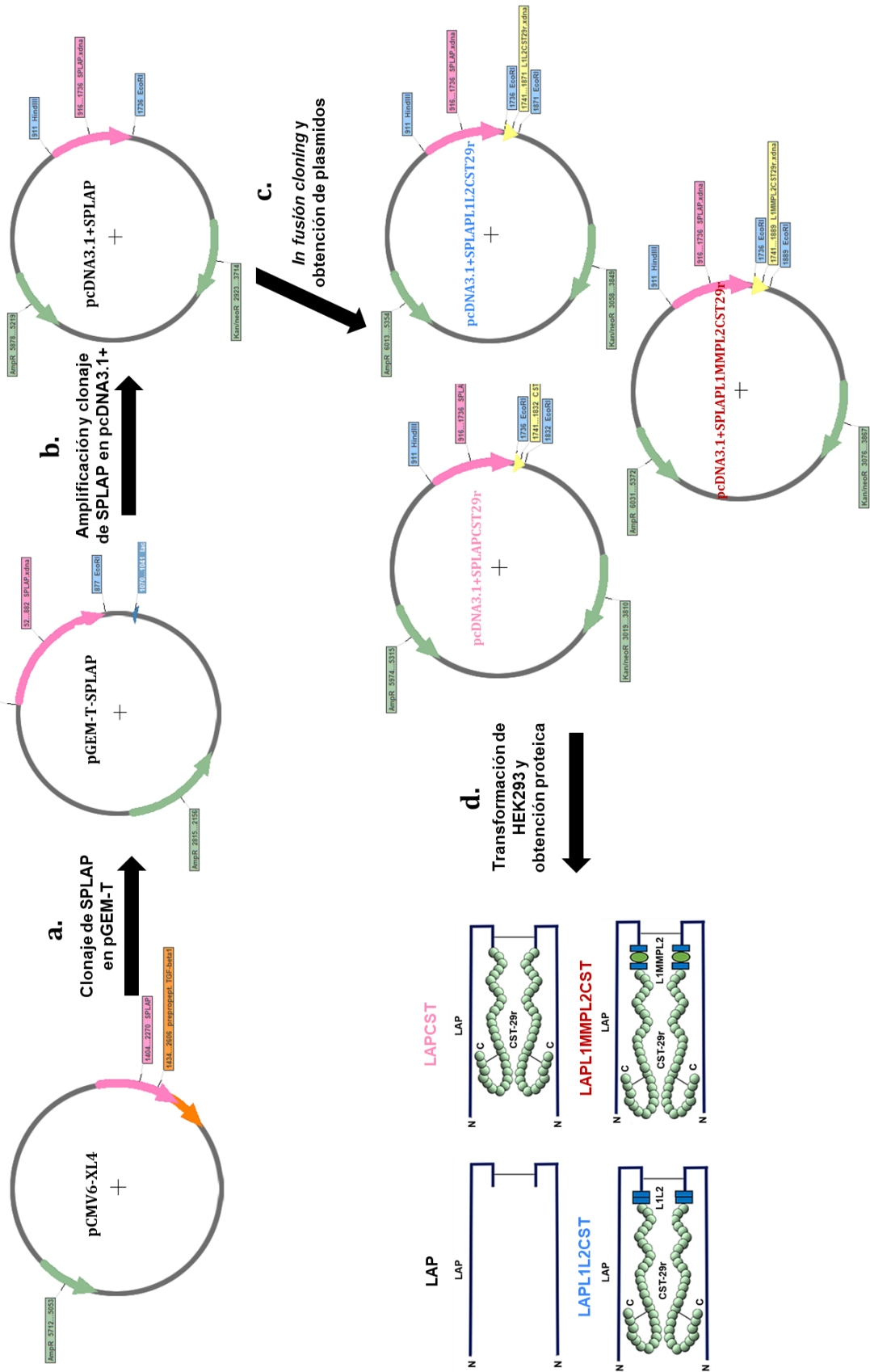
Una vez esterilizado el ADN plasmídico se realizaron las transfecciones correspondientes, siguiendo el protocolo *LipoD293 DNA In Vitro Transfection Reagent* (SignaGen Laboratories). Las células se plaquearon en frascos de 75 cm² en medio DMEM 1X (c/n L-glutamina y alto en glucosa: 4.5 g/ml) (Gibco) completo: DMEM 1X + 10% SFB + 1% antibiótico/antimicótico. Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y 3% de O₂. Una vez que los cultivos alcanzaron una confluencia del 80% se les renovó el medio de cultivo, medio con el que permanecieron un tiempo

de 30-60 minutos. Durante intervalo, se preparó la mezcla de transfección: 18 µg de ADN plasmídico + 54 µl del reactivo LipoD293 (proporción 1:3 de ambos componentes) en el medio DMEM 1X sin suero. Esta mezcla se dejó incubar 10 minutos para permitir la formación de liposomas. Una vez transcurridos los 30-60 minutos de incubación de las células con el medio nuevo, los liposomas se adicionaron a los frascos celulares. Tras 18 horas, se cambió el medio a los cultivos. Finalmente, los sobrenadantes celulares se recogieron a distintos tiempos (24, 48 y 72 horas) para determinar en qué momento era mejor la producción de los péptidos recombinantes. Una vez recogidos en tubos de 1,5 ml, se congelaron a -80°C, hasta el momento de la cuantificación de las proteínas presentes en los mismos.

En la siguiente página, en la figura 46, se muestra un esquema que resume todo el proceso seguido para llevar a cabo la obtención de la molécula de Cortistatina latente completa (LAPL1MMPL2CST29r), así como los diferentes controles (LAP, LAPCST29r y LAPL1L2CST29r)

Figura 44. Esquema del proceso de obtención de las diferentes moléculas de Cortistatina latente.

Con la finalidad de aumentar la vida media de Cortistatina y, por tanto, su eficacia a nivel terapéutico, llevamos a cabo la síntesis de una molécula recombinante basándonos en los trabajos de Adams G. y colaboradores. Para ello, creamos una molécula con una serie de elementos: la proteína de latencia de TGFβ, LAP, con el objetivo de proporcionar latencia al neuropéptido; unos espaciadores o *linkers*, con el objetivo de permitir su correcto plegamiento; y un sitio de corte de enzimas metaloproteinasas, que permitiría la escisión de la molécula de Cortistatina en un ambiente rico en enzimas MMPs. Además, creamos diferentes moléculas recombinantes a las que les faltaran algunos de estos elementos con el fin de analizar la necesidad de cada uno de ellos. Para llevar a cabo la síntesis, los pasos a seguir fueron los siguientes: **a)** En primer lugar se amplificó la secuencia SPLAP del plásmido pCMV6-XL4. Una vez obtenida la secuencia de interés, esta se clonó en el plásmido pGEM-T, generando el plásmido pGEM-T-SPLAP. **b)** Con el fin de aumentar la cantidad de plásmido se transformaron bacterias *E. coli Top10* que se encargaron de producirlo en cantidad suficiente. Tras esto, los plásmidos obtenidos se corrieron en un gel de agarosa con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI*, las cuales permitieron la escisión del fragmento SPLAP. Este fragmento, obtenido en cantidad adecuada se purificó y se clonó en el plásmido pcDNA3.1+, generando pcDNA3.1+SPLAP. **c)** Por medio de la técnica *In fusión clonig* y, a partir del plásmido parental pcDNA3.1+SPLAP, se generaron el resto de plásmidos de interés: pcDNA3.1+SPLAPCST29r, pcDNA3.1+SPLAPL1L2CST29r y pcDNA3.1+SPLAPL1MMPL2CST29r. **d)** Finalmente, los distintos plásmidos se emplearon para transformar células HEK293, las cuales se encargaron de sintetizar las proteínas correspondientes.



3.4.3 Detección y cuantificación de Cortistatina latente

A partir los sobrenadantes obtenidos de las distintas transfecciones, se procedió a la detección y cuantificación de Cortistatina. Para ello, se realizó un ensayo de ELISA competitivo.

El ELISA competitivo se basa, como su nombre indica, en la competición de unión al anticuerpo entre el péptido cuya concentración se quiere conocer y otro péptido de referencia de concentración conocida. De forma general, el principio de este ensayo es el siguiente: en primer lugar, se prepara una placa con un anticuerpo secundario unido. Este anticuerpo secundario reconocerá la fracción constante del anticuerpo primario específico para nuestro péptido de estudio, de manera que se unirá a él fijándolo a la placa. A continuación, se añade a la placa una muestra que contenga el péptido cuya concentración se quiere conocer y una concentración conocida de un péptido de referencia. Ese péptido de referencia se encontrará biotinilado y también será reconocido por el anticuerpo primario. De manera que al añadir los dos péptidos se producirá una competición por la unión al anticuerpo primario, de forma que aquel que presente mayor concentración, se unirá más. Tras un tiempo de incubación, se realiza un lavado para eliminar todas aquellas moléculas no unidas al anticuerpo. Finalmente, se añade a la placa el complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano (del inglés *streptavidin-horseradish peroxidase*, SA-HRP) y el sustrato de la enzima peroxidasa. De manera que la reacción enzimática se producirá en el caso de que sea el antígeno de referencia biotinilado lo que ha quedado unido al anticuerpo. En caso de que haya reacción, se producirá un cambio de color en la placa. La colorimetría se mide a 450 nm y la densidad óptica obtenida será directamente proporcional a la cantidad de antígeno biotinilado presente en la placa e inversamente proporcional a la cantidad del antígeno de estudio (199). Además, se prepara una curva estándar por medio de la cual poder extrapolar la cantidad del antígeno de estudio.

Para realizar el ELISA competitivo se empleó el kit de la casa comercial Phoenix Pharmaceuticals, INC, siguiendo las especificaciones del fabricante. Así, se preparó en primer lugar, una curva patrón con distintas concentraciones (desde 1000 ng/ml hasta 0,01 ng/ml) del péptido estándar en el *buffer* de ensayo 1X. Por otro lado, se rehidrataron tanto el anticuerpo primario (*rabbit anti-CST29r*) como el péptido biotinilado con 5 ml del *buffer* de ensayo 1X, y de incubaron durante 5 minutos en hielo para permitir que se disolvieran completamente. También se rehidrató el control positivo con 200 µl del *buffer* 1X. A continuación, se añadieron 25 µl del anticuerpo primario y del péptido biotinilado rehidratados a cada pocillo de la placa, exceptuando el pocillo que serviría como blanco, se cubrió la placa con un sellador de placas de acetato (del inglés *Acetate Plate Sealer*, APS), y se incubó durante dos horas a TA en un agitador orbital a 300-400 rpm. Por otro lado, la solución con SA-HRP se centrifugó y se mezcló con el *buffer* de ensayo 1X, a concentración 1:1000. Así, tras la incubación de la placa, se descartó el líquido, se realizaron 4 lavados el *buffer* de ensayo 1X y se añadieron 100 µl de la solución con SA-HRP en cada pocillo. La placa cubierta con APS se incubó durante una hora a TA en agitación, tras lo cual, se descartó el líquido de la placa y se volvieron a realizar los 4 lavados. Posteriormente, se añadió la solución con el sustrato TMB en cada pocillo, y la placa cubierta con APS se incubó durante una hora a TA en agitación y protegida de la luz. Tras esto, con el fin de para la reacción, se retiró el APS de la placa y se incubó durante 20 minutos con HCl 2 N. Finalmente, se midió la absorbancia de la placa a 450 nm con el lector *VersaMax Microplate Reader* y el programa *SoftMax Pro*.

La gráfica obtenida de la curva patrón y que permitió calcular la cantidad de Cortistatina presente en las muestras se denomina “4 *parameter logistic*” y se analizó y representó gracias al *software GraphPad Prism*.

3.4.4 Estudio de la eficacia en términos de biodisponibilidad de Cortistatina latente en modelos experimentales de fibrosis

Para determinar si la molécula de Cortistatina latente era eficaz para el tratamiento de las patologías asociadas a los procesos de fibrosis, decidimos probarla en los modelos experimentales de esclerodermia y fibrosis pulmonar inducidos por Bleomicina ya descritos. Para ellos, se emplearon animales CST^{+/+}.

Para analizar la funcionalidad de la estructura latente, el tratamiento de los ratones en el modelo de esclerodermia inducido por Bleomicina (3,2 U/kg), se realizó mediante inyecciones s.c. de 1,1 ng de Cortistatina latente (LAPL1MMPL2CST), una vez por semana, a partir del cuarto día de la inducción del modelo (Figura 45). Los ratones que no fueron tratados con Cortistatina latente, recibieron LAP (mismo volumen del sobrenadante del cultivo que en el caso de Cortistatina latente).

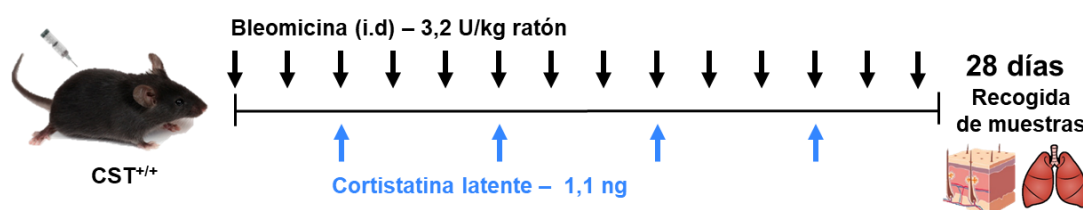


Figura 45. Modelo de esclerodermia inducido por Bleomicina y tratamiento con Cortistatina latente
Se trató a ratones CST^{+/+} con esclerodermia inducida por Bleomicina (3,2 U/kg i.d) con Cortistatina latente, LAPL1MMPL2CST, s.c a concentración 1,1 ng. Como control se empleó LAP.

Por otro lado, para estudiar si el sitio de corte de las MMPs y los *linkers* eran necesarios para la funcionalidad del péptido latente, el tratamiento de los animales en el modelo de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina (3,2 U/kg) se realizó mediante administraciones i.n de 0,11 ng de cada una de las construcciones (LAPCST, LAPL1L2CST y LAPL1MMPL2CST) una vez por semana, a partir del quinto día de la inducción del modelo. Como control se empleó LAP (Figura 46).

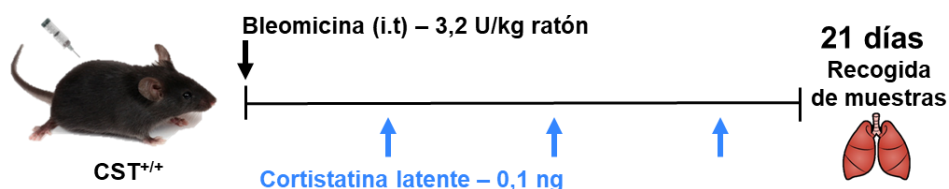


Figura 46. Modelo de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina y tratamiento con Cortistatina latente

Los ratones con fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina (3,2 U/kg i.t) fueron tratados con uno de las construcciones latentes basadas en Cortistatina: LAPCST, LAPL1L2CST y LAPL1MMPL2CST. LAP fue usada como control.

Las muestras recogidas de ambos modelos se analizaron siguiendo los protocolos previamente descritos.

3.5 Análisis estadísticos

Para analizar los datos se aplicó en primer lugar un test de normalidad (*Kolmogorov-Smirnov*) con el fin de conocer si los datos seguían una distribución normal. Con el objetivo de comparar grupos de datos dos a dos (CST^{+/-} o CST^{-/-} Vs CST^{+/+}; vehículo Vs tratamiento, etc) aquellos con datos paramétricos con distribución normal fueron analizados mediante *t-test* de *Student* no pareados mientras que los paramétricos que no presentaron normalidad o los datos no paramétricos fueron analizados mediante el test *Mann-Whitney*.

Los datos de mortalidad se representaron mediante una curva de *Kaplan-Meier* y se compararon mediante *Kaplan-Meier log-rank test*.

Todos los datos se analizaron mediante el *software GraphPad Prism 6.0* y se expresaron como media \pm error estándar. El nivel de significación tomado fue de $p < 0,05$ (* o #), $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***)

4. RESULTADOS

4.1 Objetivo 1. Estudio del papel de Cortistatina en la regulación endógena de los procesos de fibrosis asociados a enfermedades crónicas relevantes

Debido a las evidencias que sugieren que Cortistatina puede tener un papel relevante en la regulación de los procesos fibróticos, el objetivo principal del presente trabajo fue estudiar la implicación de este neuropéptido en la fibrosis. Para ello, en ratones C57BL/6J con distinta dotación génica de Cortistatina (CST^{+/+}, CST^{+/-} y CST^{-/-}) indujimos dos modelos diferentes de fibrosis crónica -esclerodermia y fibrosis pulmonar, ambos inducidos por Bleomicina- con el fin de analizar el desarrollo de las distintas patologías en las diferentes cepas de animales. A continuación, se detallan los resultados obtenidos del análisis de los distintos modelos y el efecto que causa la diferencia de expresión de Cortistatina en el desarrollo de los procesos de fibrosis.

4.1.1 La expresión de Cortistatina y sus receptores disminuye en tejidos con fibrosis

Con el fin de conocer si la piel y los pulmones provenientes de ratones CST^{+/+} producían Cortistatina y/o si eran sensibles a su acción, inicialmente confirmamos la expresión génica del neuropéptido y de sus receptores en estos órganos. Los análisis de expresión mostraron que, efectivamente, ambos órganos expresaban Cortistatina (Figura 47a). Además, fue detectada la expresión de los receptores SSTR2A, SSTR2B, SSTR3 y SSTR4, pero no de SSTR1, SSTR5 y GHSR (Figura 47b y 47c). Por otro lado, la inducción de fibrosis tanto a nivel dérmico como pulmonar redujo, de forma notable en piel y moderada en pulmón, la expresión de Cortistatina (Figura 47a). En cuanto a la detección de los receptores, esta apenas se vio alterada en situación de fibrosis con respecto a la situación basal, a excepción de SSTR4, cuya expresión se vio significativamente disminuida tras la inducción de fibrosis, especialmente a nivel pulmonar. Además, SSTR2B mostró un incremento significativo de su expresión en la piel fibrótica (Figura 47b y 47c). Por tanto, la situación de fibrosis indujo a una menor expresión de Cortistatina, así como del receptor SSTR4, poniendo de manifiesto una relación entre el proceso fibrótico y la acción del neuropéptido.

Por otro lado, los análisis realizados en los fibroblastos dérmicos y pulmonares mostraron expresión del neuropéptido, la cual se redujo de forma significativamente al incubar las células con un inductor profibrótico (TGFβ1), llegando a ser casi indetectable en el caso de los fibroblastos pulmonares (Figura 47c). En cuanto a los receptores, los fibroblastos de piel presentaron una baja expresión de SSTR3 y SSTR4, mientras que los de pulmón expresaron SSTR2B, SSTR3 Y SSTR4. El resto de receptores no fueron detectados en ninguna de las poblaciones celulares (Figura 47d).

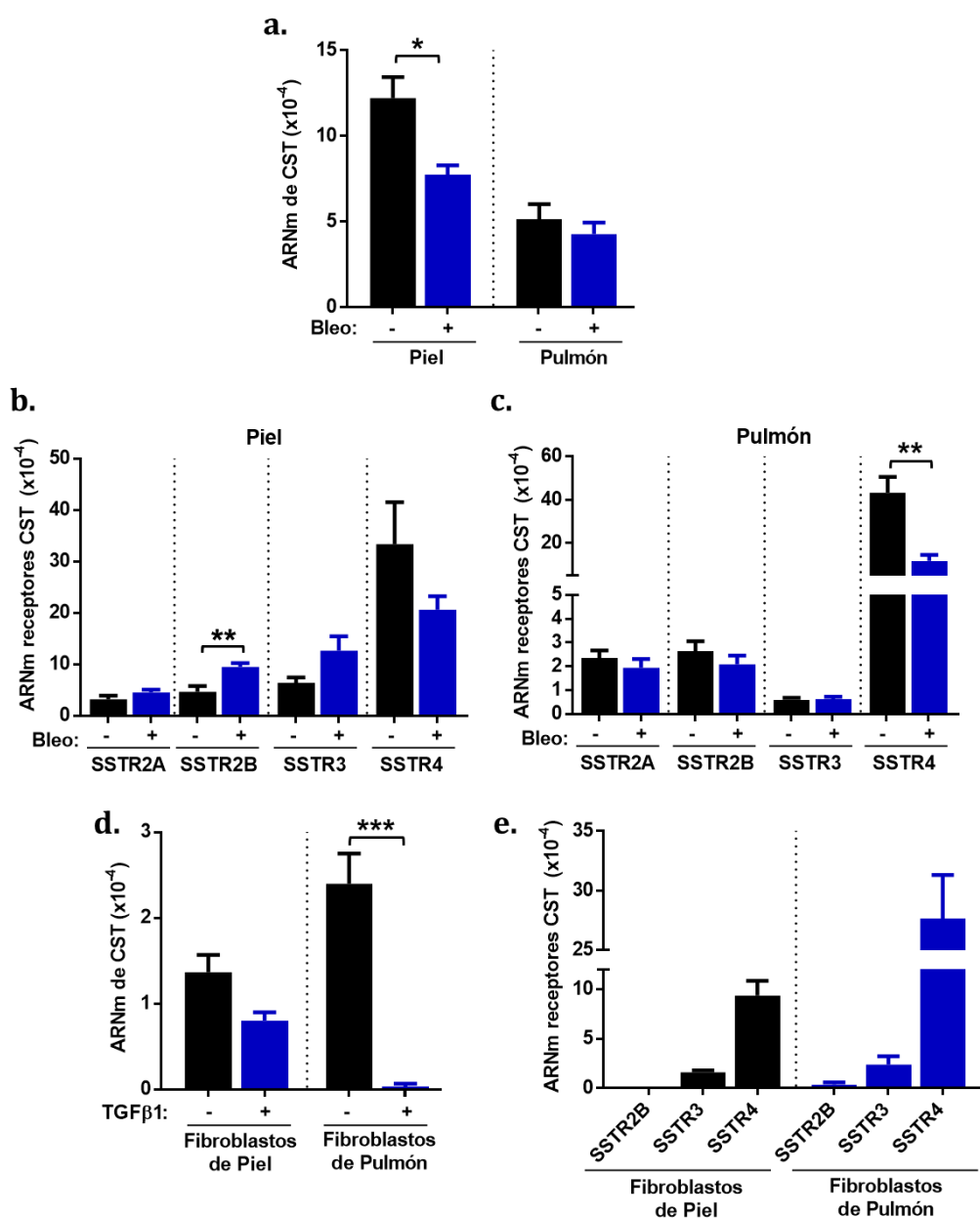


Figura 47. En situaciones de fibrosis la expresión de Cortistatina y sus receptores se ve alterada

Se indujo en ratones $CST^{+/+}$ el modelo de esclerodermia y de fibrosis pulmonar (3,8 U/kg de Bleomicina (Bleo)) siguiendo los protocolos descritos previamente. Transcurridos 28 y 21 días respectivamente, se aisló la piel y los pulmones de los animales y se analizó mediante RT-qPCR la expresión relativa del ARNm de: **a)** Cortistatina (CST); y **b) y c)** sus receptores (SSTR1, SSTR2A, SSTR2B, SSTR3, SSTR4, SSTR5 Y GHSR) ($n=4-6$ ratones/grupo). Además, se midió la expresión en ratones sin inducción de fibrosis. Por otro lado, se aislaron los fibroblastos dérmicos y pulmonares de ratones $CST^{+/+}$ y se estudió, siguiendo la misma técnica, la expresión relativa del ARNm de Cortistatina (**d**) y de sus receptores (**e**) (2 experimentos con $n=3$ réplicas/experimento). La expresión de Cortistatina se midió en células incubadas durante 24 horas en presencia o ausencia de TGFβ1 (10 ng/ml). La expresión de los receptores se midió en cultivos de fibroblastos sin TGFβ1 (Test *Mann-Whitney* y *Student t-test* no pareado de dos colas $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**), ($p<0,001$ (***)).

4.1.2 La falta de Cortistatina exacerba los signos asociados a fibrosis pulmonar

Para estudiar el papel de Cortistatina endógena en la regulación de los procesos de fibrosis pusimos a punto un modelo de fibrosis pulmonar basado en la administración i.t de Sulfato de Bleomicina en ratones $CST^{+/+}$, $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$. Observamos que los ratones con falta de Cortistatina presentaban una mortalidad muy elevada cuando se les administraba Bleomicina, en comparación con los animales $CST^{+/+}$ (Figura 48). De hecho, esa mortalidad fue especialmente elevada para concentraciones de Bleomicina entre 1,8 y 1,2 U/kg, llegando a aumentar por encima del 50%, mientras que dichas concentraciones no afectaron a los ratones $CST^{+/+}$.

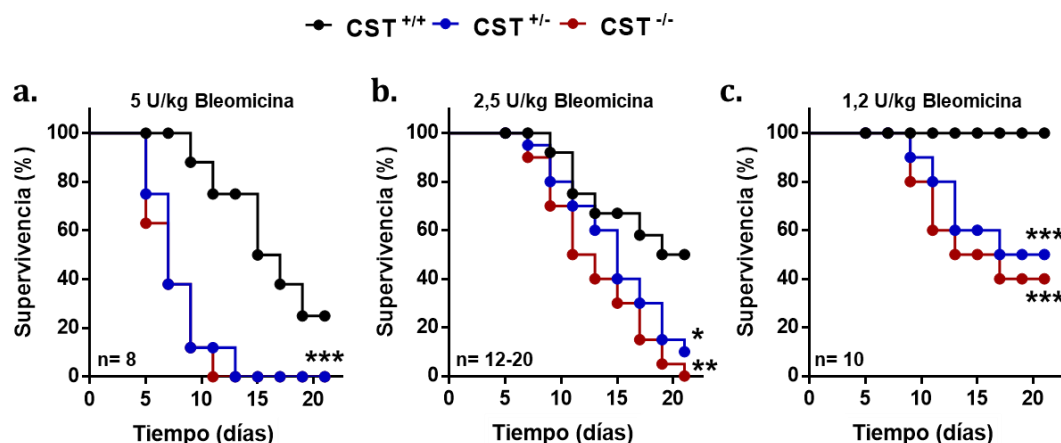


Figura 48. La deficiencia en Cortistatina aumenta la susceptibilidad frente a Bleomicina

Se indujo el modelo de fibrosis pulmonar mediante la inyección i.t de 5 U/kg (a), 2,5 U/kg (b) y 1,2 U/kg (c) de Sulfato de Bleomicina en ratones con una dotación génica normal ($CST^{+/+}$), parcial ($CST^{+/-}$) y nula ($CST^{-/-}$) de Cortistatina y se monitorizó la supervivencia de los mismos. Se indica el número de ratones empleados en cada caso (*Kaplan–Meier log-rank test*, $p < 0,5$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) Vs ratones $CST^{+/+}$).

Con el fin de poder reducir la mortalidad y así poder analizar los marcadores moleculares y clínicos asociados al desarrollo de fibrosis entre los diferentes grupos de ratones empleamos una concentración de 1,8 U/kg de Bleomicina (Figura 49a). La exposición al antibiótico supuso una pérdida de peso de hasta el 15-20% en ratones deficientes en Cortistatina (Figura 49b). Además, se produjo una disminución destacable de la viabilidad en estos animales, alcanzando una bajada de hasta un 80% en el caso de los ratones $CST^{+/-}$ y de un 70% en el caso de los $CST^{-/-}$ (Figura 49c). Por el contrario, ni el peso ni la supervivencia de los animales $CST^{+/+}$ se vio afectada por la exposición al antibiótico.

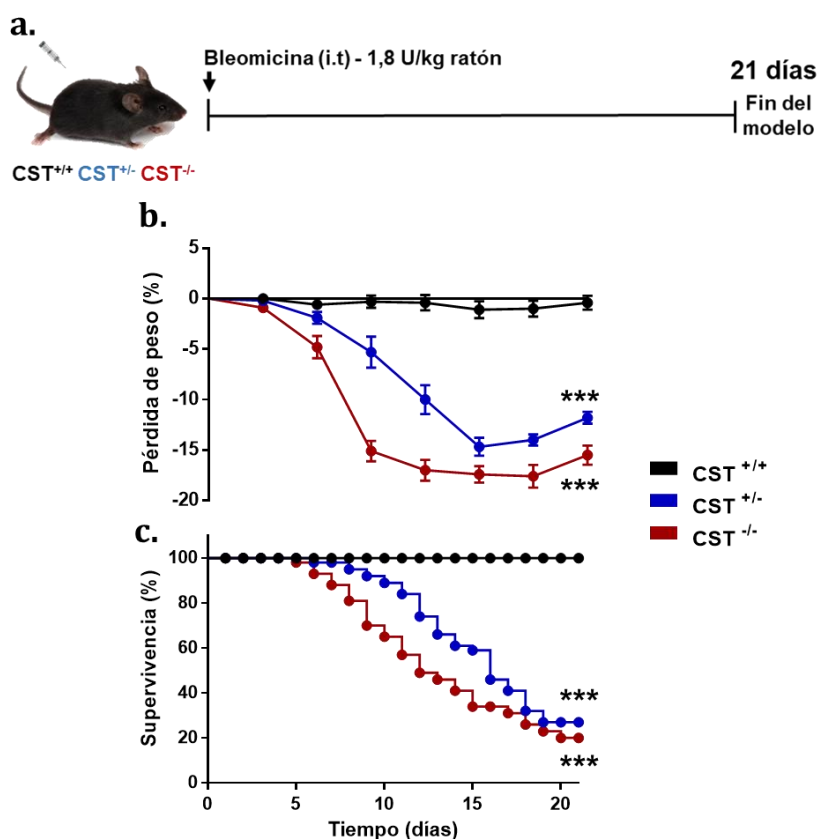


Figura 49. La deficiencia en Cortistatina incrementa la pérdida de peso y la mortalidad en ratones con fibrosis pulmonar

a) Se indujo fibrosis pulmonar mediante administración de Bleomicina en ratones $CST^{+/+}$, $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ como se describe en el esquema. Durante el transcurso del modelo se monitorizó: **b)** las variaciones en la pérdida de peso de los animales ($n=10$ ratones/grupo); y **c)** la mortalidad ($n= 28$ $CST^{+/+}$; $n= 42$ $CST^{+/-}$ y $n= 40$ $CST^{-/-}$) (Test *Mann-Whitney* y *Kaplan–Meier log-rank test*, $p<0,001$ (***) Vs ratones $CST^{+/+}$).

El análisis de la respuesta inflamatoria previa al proceso fibrótico mostró el desarrollo de un edema pulmonar incrementado en los ratones $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$, reflejado en una mayor concentración de proteínas en el BAL y una mayor extravasación de Evans Blue (Figura 50a). Esto se acompañó de una infiltración leucocitaria significativamente mayor en los animales $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$, que aumentó entre los días 7 y 14 de la inducción del modelo (Figura 50b). La mayor presencia de estas células en animales $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ favoreció un incremento en la actividad mieloperoxidasa (MPO) de neutrófilos, así como en la producción de citoquinas proinflamatorias tales como MIP2, IL1 β y IL6, y profibróticas como TGF β (Figura 50c).

En cuanto a la respuesta profibrótica, el análisis histopatológico de los pulmones mostró un incremento en el grado de lesión pulmonar, significativamente mayor en los animales $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ (con un porcentaje de área afectada superior al 60%) con respecto a los $CST^{+/+}$ (con un porcentaje de área afectada en torno al 25-45%), desde el día 7 del experimento y hasta el final del mismo (Figura 51a). El análisis del depósito de colágeno reveló un incremento significativo en los ratones $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ frente al grupo $CST^{+/+}$ (Figura 51b), junto con una expresión génica de CTGF significativamente aumentada, especialmente en los animales $CST^{-/-}$ (Figura 51c). Finalmente, el estudio de la expresión proteica de α SMA mediante inmunofluorescencia indirecta transcurridos 21 días desde el inicio del modelo mostró una mayor presencia de miofibroblastos α SMA⁺ en las áreas afectadas por la fibrosis en los ratones deficientes en Cortistatina (Figura 51d).

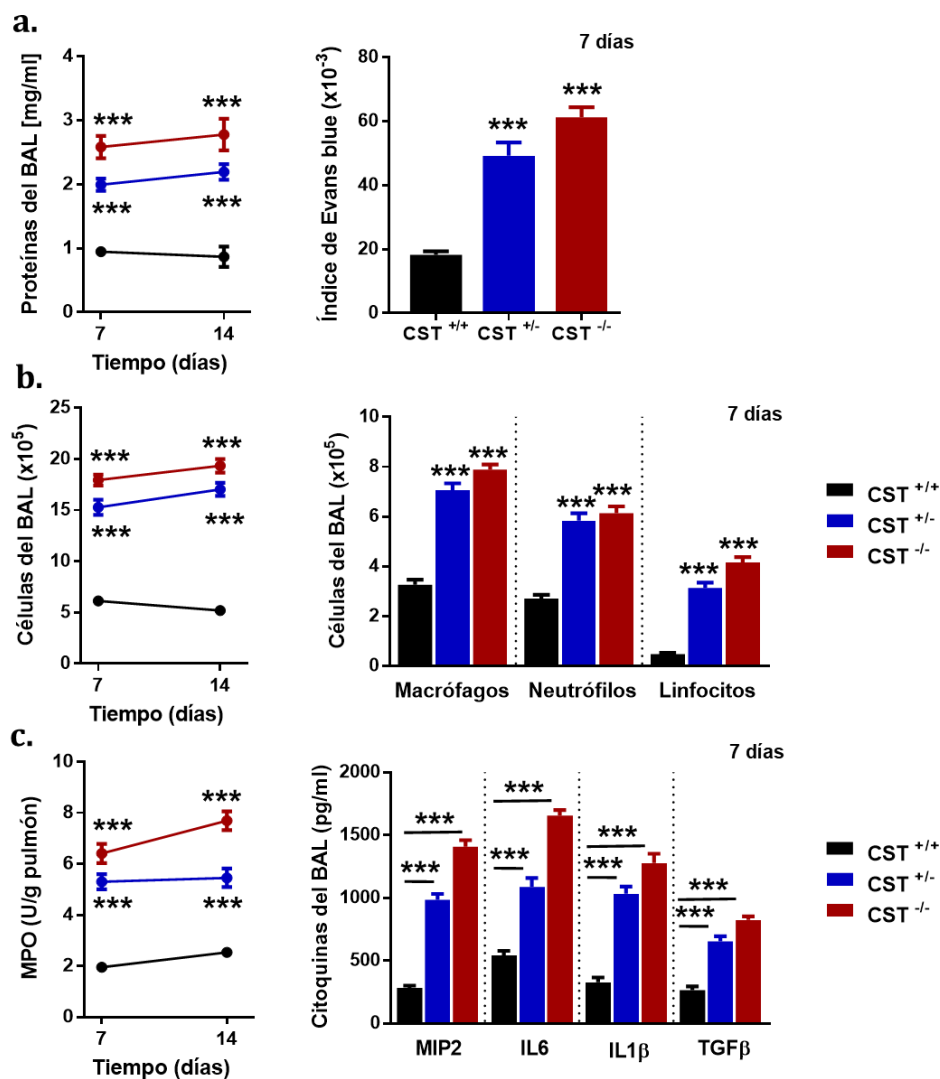


Figura 50. La deficiencia en Cortistatina exacerba la respuesta inflamatoria en animales con fibrosis pulmonar

Transcurridos 7 y 14 días de la inducción del modelo de fibrosis pulmonar representado en la figura 49a se analizó en el BAL: **a)** la cantidad de proteínas totales (n=6-8 ratones/grupo) y el índice de extravasación de Evans Blue (n=5 ratones/grupo); **b)** la cantidad de células totales, macrófagos, neutrófilos y linfocitos (n=6-8 ratones/grupo); y **c)** la actividad inflamatoria pulmonar (MPO) (n=6 ratones/grupo) y la producción de citoquinas proinflamatorias (n=6 ratones/grupo). Se muestran las diferencias significativas (Test *Mann-Whitney*, p<0,001 (***) Vs ratones CST^{+/+}).

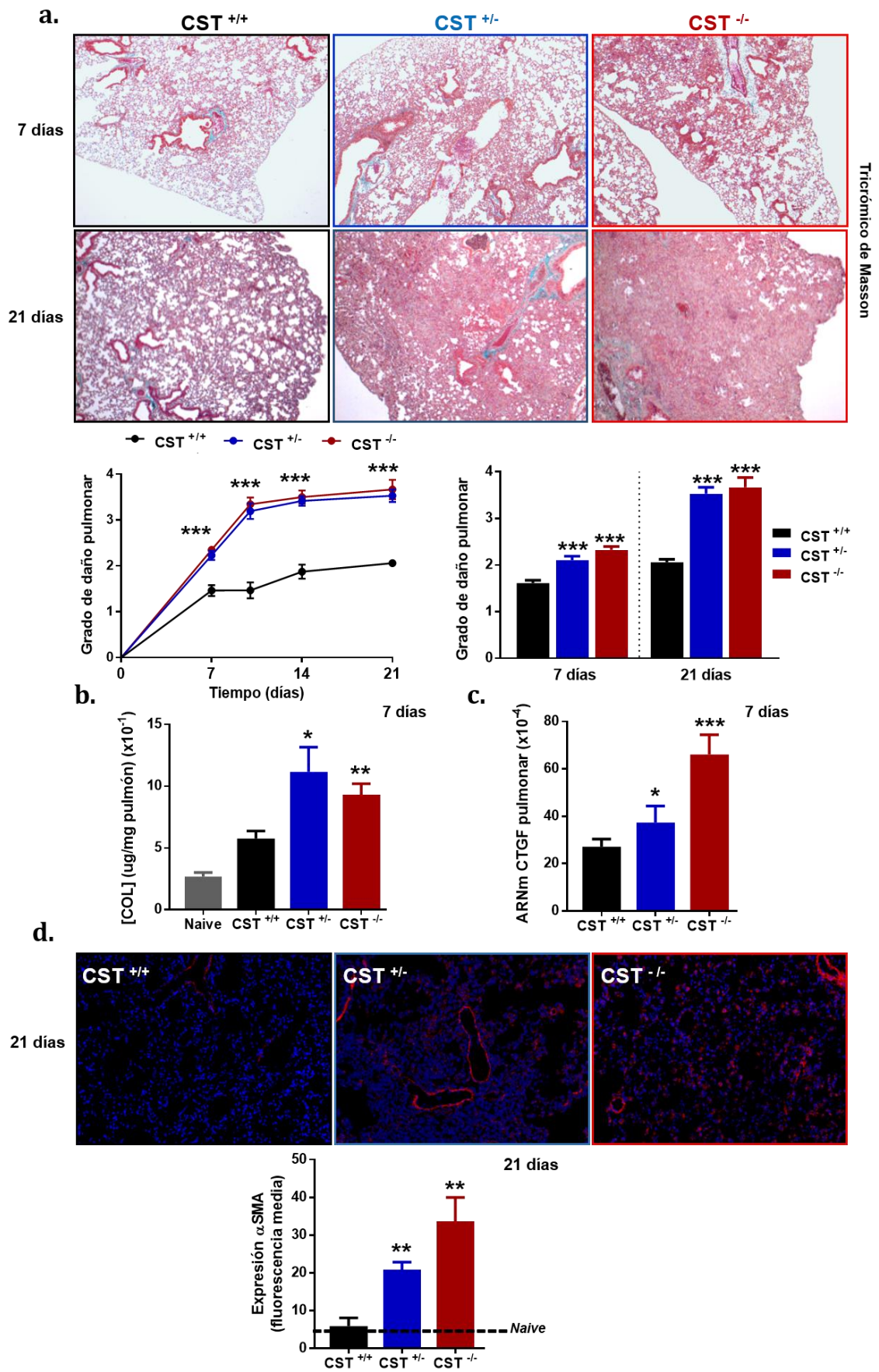


Figura 51. Los ratones deficientes en Cortistatina muestran un proceso fibrótico exacerbado en el pulmón

A partir de los pulmones obtenidos tras 7 y 21 días de la inducción del modelo de fibrosis pulmonar en ratones $CST^{+/+}$, $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$, se analizó: **a)** el grado de lesión pulmonar (imágenes tomadas a un aumento de 50X de secciones teñidas mediante tricrómico de Masson) (n=6-9 ratones/grupo); **b)** los niveles de colágeno (representativo de 2 experimentos, n=6 ratones/grupo); **c)** la expresión del ARNm de CTGF (n=12-14 ratones/grupo); y **f)** la expresión y localización de la proteína de α SMA (inmunofluorescencia de imágenes tomadas a un aumento de 200X). En rojo se muestra la señal de α SMA y en azul los núcleos celulares (n=5-6 ratones/grupo). La línea negra discontinua indica los niveles de expresión proteica de α SMA de los ratones *naive* (n=6) (Test *Mann-Whitney* $p < 0,5$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) Vs ratones $CST^{+/+}$).

4.1.3 La falta de Cortistatina exagera los signos asociados a esclerodermia

Para analizar el papel de Cortistatina en la regulación del proceso de esclerodermia, se desarrolló un modelo de fibrosis cutánea por medio de inyecciones i.d de 3,2 U/kg de Sulfato de Bleomicina en un punto localizado de la espalda una vez cada dos días durante 28 días (Figura 52a).

Las administraciones de Bleomicina causaron desde el inicio del modelo, un engrosamiento y endurecimiento significativos en la piel de los animales $CST^{+/+}$, $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ en comparación a la piel de los ratones *naive*. Conforme el experimento fue avanzando, la lesión y el engrosamiento dérmicos de los animales $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ se hicieron marcadamente más pronunciados que en los $CST^{+/+}$, llegando incluso a dificultar la administración de Bleomicina como consecuencia del endurecimiento de la piel. El análisis histopatológico mostró un grosor dérmico significativamente mayor en los animales $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ con respecto a los $CST^{+/+}$ (Figura 52b y c). Además, la falta de Cortistatina favoreció un mayor engrosamiento y descamación epidérmicos (Figura 52c y d), así como una mayor infiltración celular en las capas inferiores de la piel (Figura 52b y d). Por otro lado, los animales $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ presentaron una mayor tendencia a acumular colágeno en comparación con los ratones $CST^{+/+}$, explicando las diferencias obtenidas en el grosor dérmico (Figura 52e). Finalmente, la expresión génica de CTGF fue significativamente mayor en los ratones $CST^{-/-}$, mientras que no se apreciaron diferencias entre animales $CST^{+/+}$ y $CST^{+/-}$ (Figura 52f).

Resultados

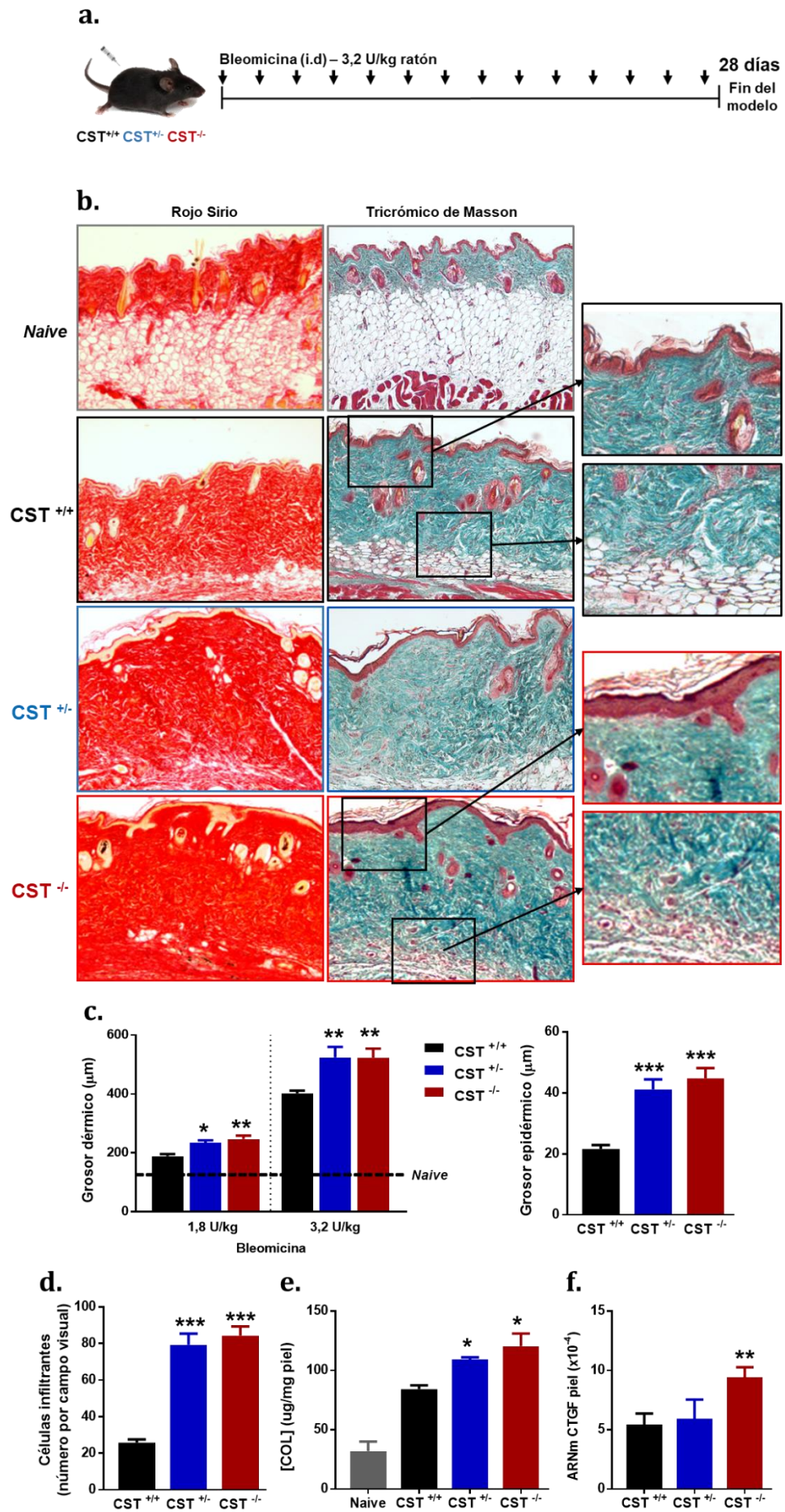


Figura 52. La falta de Cortistatina predispone a los animales con esclerodermia a sufrir un proceso fibrótico exacerbado

a) Se indujo fibrosis cutánea por inyección s.c. de Bleomicina en ratones $CST^{+/+}$, $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ como se indica en el esquema. En este experimento se incluyeron ratones *naive*, que recibieron salino en vez de Bleomicina. Transcurridos 28 días desde el inicio del modelo se aisló la piel y se analizó: **b y c)** el grosor de la dermis y la epidermis (imágenes tomadas a un aumento de 100X de secciones teñidas con rojo Sirio y tricrómico de Masson). La línea negra discontinua indica los niveles de expresión de los ratones *naive* (n=7-10 ratones/grupo). Los insertos muestran imágenes aumentadas de grosor de epidermis y de infiltrados inflamatorios subdérmicos; **d)** la cantidad de células infiltrantes (n=8 ratones/grupo); **e)** la cuantificación de la cantidad de colágeno (representativo de 2 experimentos, n=3-6 ratones/grupo); y **f)** la expresión del ARNm de CTGF (n=5-10 ratones/grupo) (Test *Mann-Whitney*, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) Vs ratones $CST^{+/+}$).

Durante el desarrollo del modelo, la viabilidad de los animales $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ se redujo a un 40% y un 20%, respectivamente. Un aspecto destacable de la esclerodermia es que la fibrosis puede extenderse hacia los pulmones generando un proceso de fibrosis pulmonar. Con el fin de analizar si este hecho había tenido lugar en los ratones y era el responsable de la mortalidad observada, se analizaron los pulmones. El estudio histopatológico de los mismos mostró que la fibrosis inducida a nivel dérmico se había extendido, provocando lesiones y alteraciones en el parénquima alveolar. Estas lesiones fueron significativamente mayores en los ratones $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ en comparación con los $CST^{+/+}$ (Figura 53a y b). Las complicaciones pulmonares se relacionaron con un mayor grado de infiltración celular, engrosamiento de las paredes alveolares y depósito de colágeno, el cual fue significativamente mayor en los ratones $CST^{+/-}$ frente a los $CST^{+/+}$. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre animales $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ (Figura 53c). Finalmente, el análisis de la expresión y distribución de α SMA mostró una mayor expresión proteica en los ratones con falta de Cortistatina, siendo especialmente significativa en ratones $CST^{-/-}$. En estos animales se observó una expresión incrementada de α SMA en la periferia de los vasos sanguíneos, lo que podría ser un posible indicativo de la proliferación de miofibroblastos α SMA⁺ en torno a esa zona (Figura 53d).

En conjunto, todos estos resultados parecen indicar que la falta de Cortistatina, ya sea parcial o total, predispone a los animales a desarrollar un proceso fibrótico más exacerbado. Por tanto, Cortistatina puede ser un regulador clave de los procesos de fibrosis asociados a patologías crónicas, ejerciendo su acción tanto sobre la respuesta inflamatoria previa, como sobre el propio proceso fibrótico posterior.

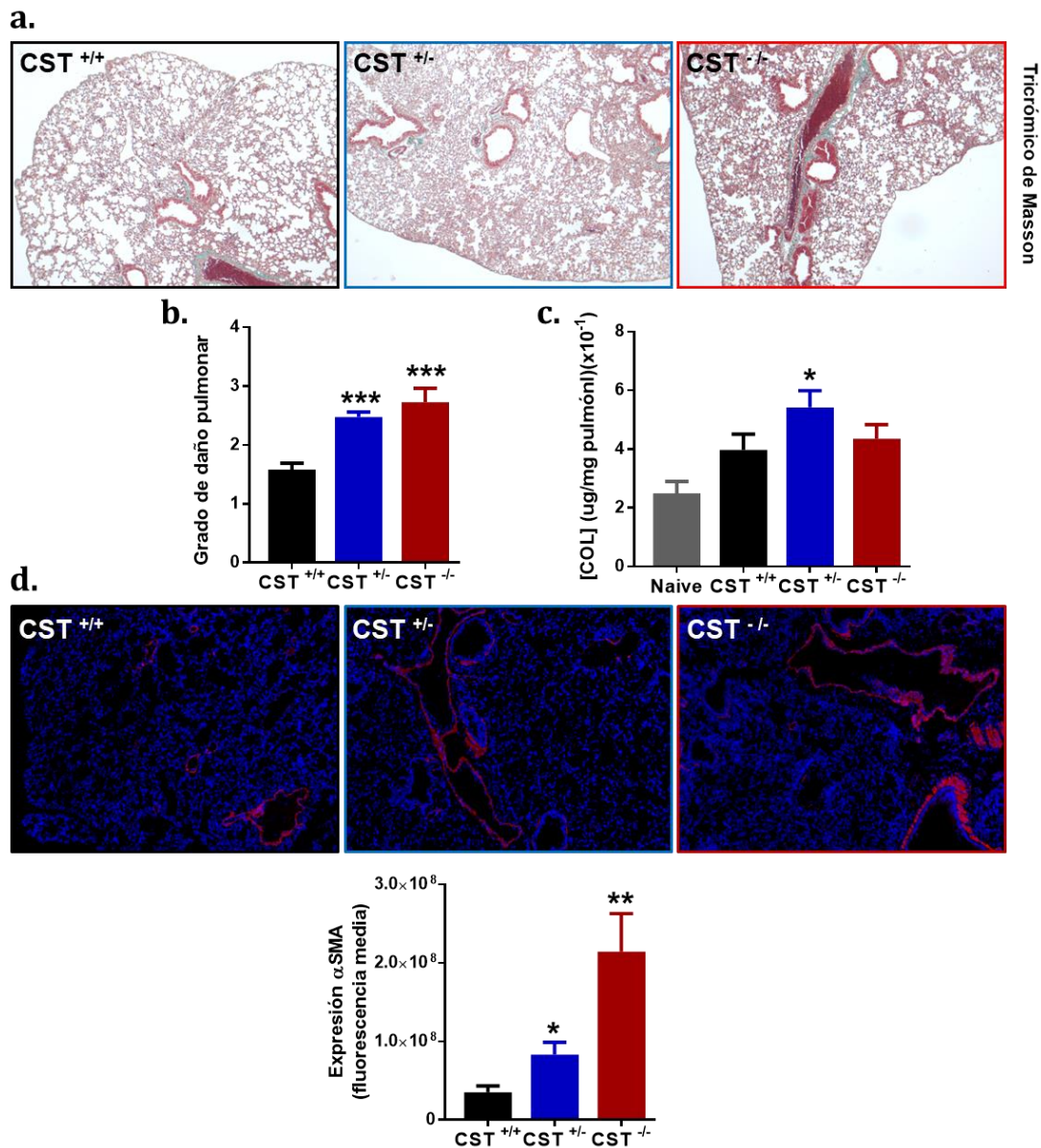


Figura 53. La deficiencia en Cortistatina exacerba la fibrosis pulmonar en ratones con esclerodermia
 Tras los 28 días de la inducción del modelo de esclerodermia representado en la figura 54a, se extrajeron los pulmones de los animales y se analizó: **a** y **b**) el grado de lesión pulmonar (imágenes tomadas a un aumento de 50X de secciones teñidas con tricrómico de Masson) (n=7-10 ratones/grupo); **c**) la cuantificación de la cantidad de colágeno (n=8-13 ratones/grupo); y **d**) la expresión proteica de αSMA y su distribución (inmunofluorescencia de imágenes tomadas a un aumento de 200X). Se marca en rojo la proteína αSMA y en azul los núcleos celulares (n=8-10 ratones/grupo). Se indican las diferencias significativas (Test *Mann-Whitney*, p<0,05 (*), p<0,01 (**), y p<0,001 (***) Vs ratones CST^{+/+}).

4.2 Objetivo 2. Estudio de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el potencial efecto antifibrótico de Cortistatina

Para determinar el efecto directo de Cortistatina endógena sobre la respuesta fibrótica, más allá de su acción sobre la respuesta inflamatoria previa, aislamos fibroblastos pulmonares de los animales $CST^{+/+}$, $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ y analizamos su fenotipo fibrótico. En los siguientes apartados se describirán los resultados obtenidos.

4.2.1 La falta de Cortistatina altera la expresión de α SMA y CTGF

En primer lugar, analizamos si la falta de Cortistatina tenía algún efecto en la producción de moléculas relacionadas el proceso de fibrosis. Pese a que el análisis génico de α SMA tras 24 horas de cultivo reveló una expresión significativamente mayor en las células $CST^{+/-}$ en comparación con las $CST^{+/+}$ y las $CST^{-/-}$ (Figura 54a), a nivel proteico no se observaron diferencias entre los distintos genotipos (Figura 54b). Además, la incubación de los cultivos con un inductor profibrótico ($TGF\beta 1$), favoreció el incremento de la expresión del ARNm de α SMA en los 3 genotipos, hecho no observado a nivel proteico (Figura 54a y b). Por su parte, el análisis de α SMA por medio de una inmunofluorescencia indirecta mostró una expresión similar en los 3 genotipos y en las 2 condiciones de estudio ($\pm TGF\beta 1$), y una distribución a modo de fibras dispuestas por todo el citoplasma celular (Figura 54c). Estos hechos indican que los cultivos primarios de fibroblastos presentaban de forma basal una activación profibrótica hacia el fenotipo de miofibroblasto.

El análisis tanto génico como proteico de CTGF mostró una expresión notablemente aumentada en las células $CST^{+/-}$ basales en comparación con las $CST^{+/+}$. Curiosamente, esta expresión por parte de los cultivos $CST^{+/-}$ basales llegó a igualar a la de las células $CST^{+/+}$ activadas con $TGF\beta 1$, reflejando la activación profibrótica basal de las células $CST^{+/-}$. Por su parte, las células $CST^{-/-}$ presentaron una expresión génica y proteica de CTGF similar a la de los fibroblastos $CST^{+/+}$ (Figura 55).

Se obtuvieron resultados similares, tanto para α SMA como para CTGF, para el análisis de los cultivos incubados durante 6 días (datos no mostrados).

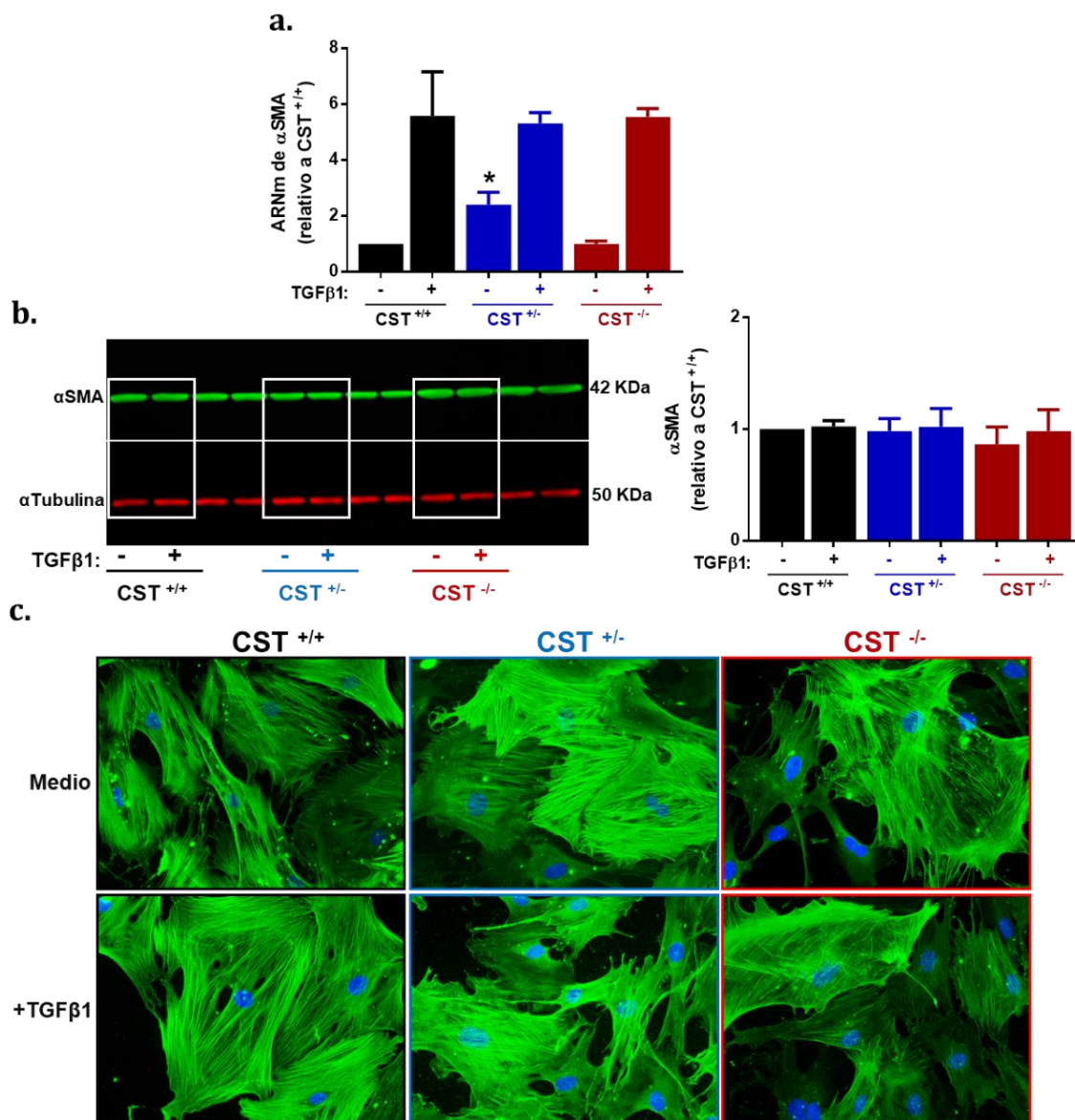


Figura 54. Los fibroblastos pulmonares aislados presentan una activación basal profibrótica

Los fibroblastos aislados de los pulmones de ratones CST^{+/+}, CST^{+/-} y CST^{-/-} se incubaron en medio o en medio+TGF β 1 (10 ng/ml) durante 24 horas. Tras este tiempo se analizó la expresión del ARNm (n=17-20 cultivos con medio y n=9-12 cultivos con medio+TGF β 1) (a), la expresión proteica (5 experimentos con n=3 réplicas/experimento) (b) y la distribución (inmunofluorescencia de imágenes tomadas a un aumento de 200X. 5 experimentos con n=2 réplicas/experimento) de α SMA. Se muestra en verde α SMA y en azul los núcleos celulares. Todos los valores se representan normalizados con respecto a las células CST^{+/+} sin TGF β 1 (*Student t-test* no pareado de dos colas, p<0,05 (*) Vs CST^{+/+} sin TGF β 1).

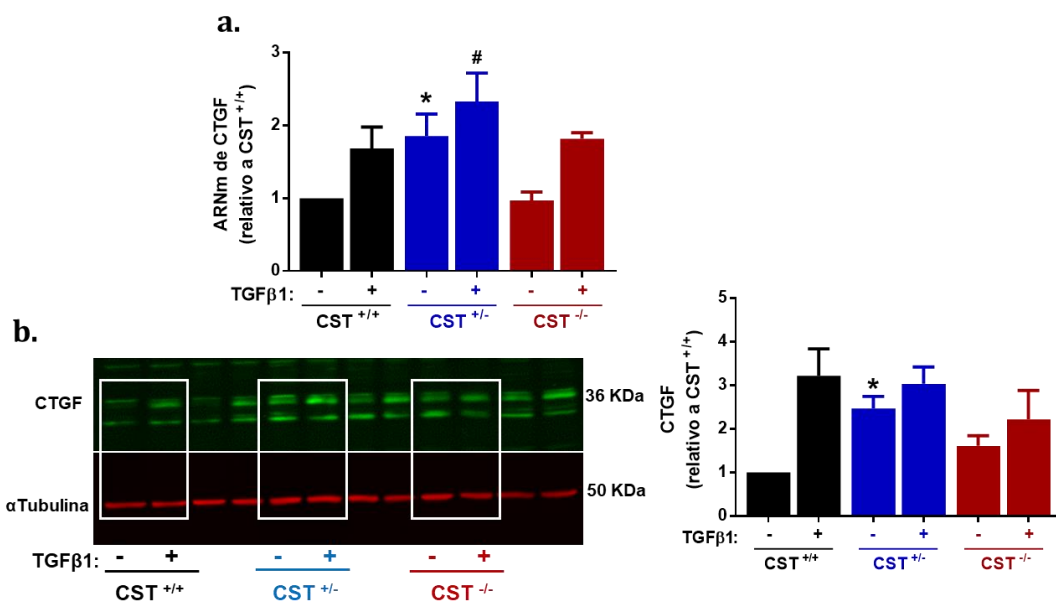


Figura 55. La falta de Cortistatina favorece un aumento de la expresión de CTGF en fibroblastos pulmonares

A partir de los fibroblastos pulmonares cultivados en presencia o ausencia de TGFβ1, se analizó la expresión de CTGF a nivel de: **a)** ARNm (n=17-20 cultivos con medio y n=9-12 cultivos con medio+TGFβ1); y **b)** proteína (3 experimentos con 3 réplicas/experimento). Los valores se representan normalizados con respecto a las células CST^{+/+} sin TGFβ1 (*Student t-test* no pareado de dos colas, p<0,05 (*) Vs CST^{+/+} sin TGFβ1; p<0,05 (#) Vs CST^{+/+} con TGFβ1).

4.2.2 La falta de Cortistatina favorece la activación de las vías de señalización profibróticas de TGFβ

Tras observar que la falta de Cortistatina favorecía a una expresión aumentada de marcadores asociados a fibrosis, pasamos a analizar la activación de las vías de señalización implicadas en dicha expresión.

Debido a que la interacción de TGFβ1 con sus receptores induce la fosforilación/activación y translocación al núcleo del dímero SMAD 2/3 y de AKT, analizamos dicha translocación mediante inmunofluorescencia indirecta. Observamos que la falta de Cortistatina, especialmente la parcial, favoreció una mayor translocación nuclear de SMAD 2/3 y de AKT. De hecho, es importante destacar que las células CST^{+/-} y CST^{-/-} basales presentaron una translocación nuclear similar a la de fibroblastos CST^{+/+} estimulados con TGFβ1 (Figura 56), indicando una mayor activación de las vías profibróticas a nivel basal.

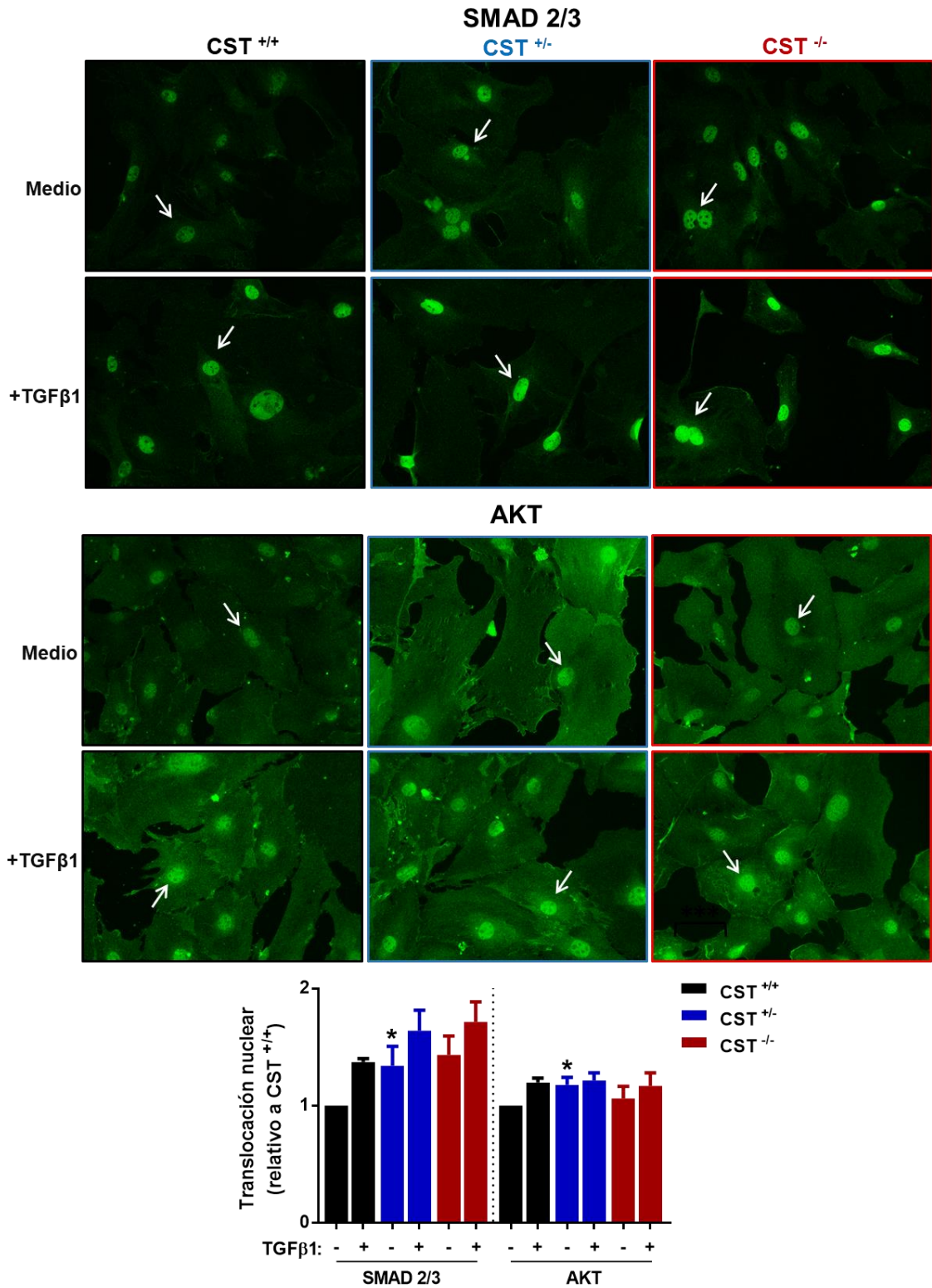


Figura 56. La falta de Cortistatina aumenta la translocación nuclear de SMAD 2/3 y AKT

Tras el cultivo de los fibroblastos pulmonares en presencia o ausencia de TGFβ1 durante 1 hora, se realizó una inmunofluorescencia frente a SMAD 2/3 y AKT. Se tomaron imágenes a un aumento de 400X y se analizó la intensidad de señal en los núcleos celulares, indicados con flechas blancas (5 experimentos con 2 réplicas/experimento). Los resultados se muestran normalizados con respecto a las células CST^{+/+} sin TGFβ1 (*Student t-test* no pareado de dos colas, $p < 0,01$ (*) Vs CST^{+/+} sin TGFβ1).

A su vez, el estudio de fosforilación/activación de las quinasas AKT (Figura 57a), p38 (Figura 57b) y ERK 1/2 (Figura 57c), mostró un incremento de las formas fosforiladas en fibroblastos $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$, reflejando una mayor tendencia en estas células a presentar las vías de señalización profibróticas activadas. Es especialmente relevante el hecho de que las células $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ basales mostraran una ratio [proteína fosforilada/proteína total] similar o incluso mayor al de las células $CST^{+/+}$ estimuladas con TGF β 1 en todos los casos.

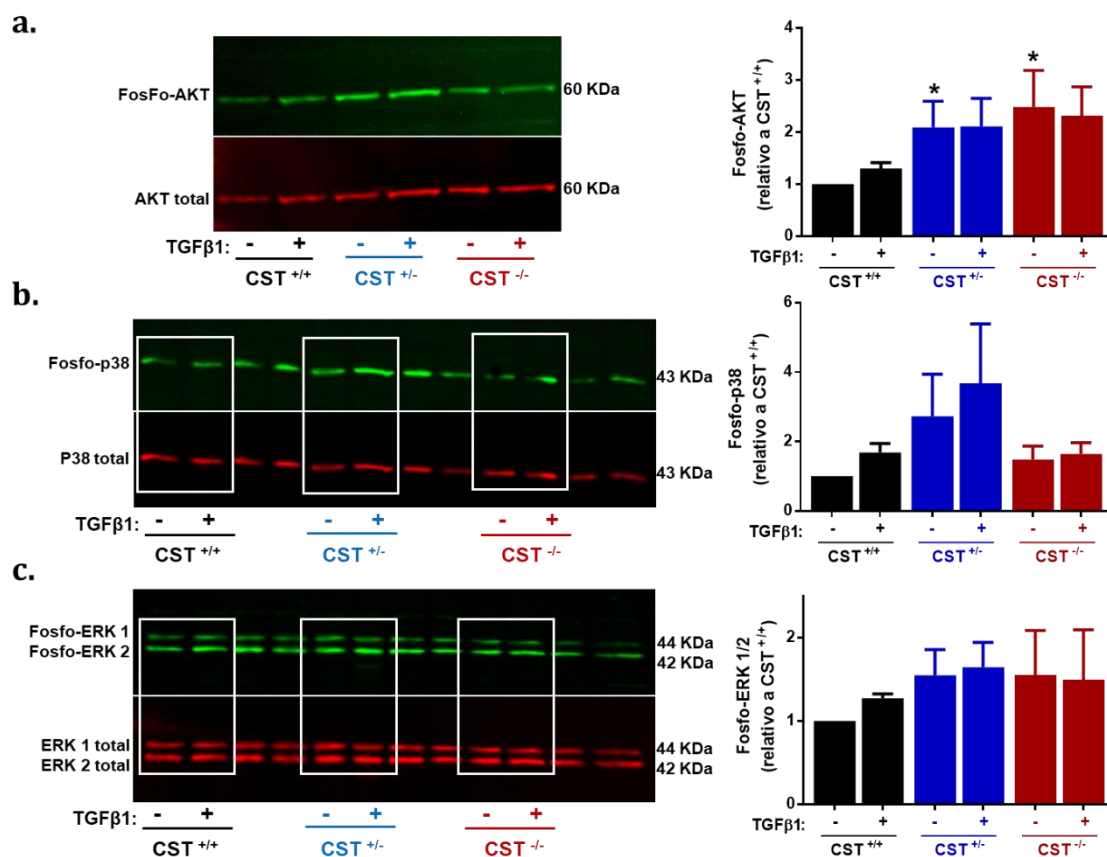


Figura 57. Los fibroblastos pulmonares deficientes en Cortistatina muestran un incremento en la fosforilación/activación de AKT, p38 y ERK 1/2

A partir de los fibroblastos pulmonares cultivados durante 1 hora con medio \pm TGF β 1, se aislaron las proteínas totales y se midió el ratio: **a)** Fosfo-AKT/ AKT total; **b)** Fosfo-p38/p38 total; y **c)** Fosfo-ERK 1/2/ ERK 1/2 total (5 experimentos con 3 réplicas/experimento). Los resultados se muestran normalizados con respecto a las células $CST^{+/+}$ sin TGF β 1 (*Student t-test* no pareado de dos colas, $p < 0,05$ (*) Vs $CST^{+/+}$ sin TGF β 1).

4.2.3 La falta de Cortistatina altera el crecimiento, la viabilidad y la capacidad de migración de los fibroblastos

Con el objetivo de comprobar si la mayor activación y expresión de las vías y marcadores profibróticos observada en las células $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ se debía a una mayor tasa de proliferación y densidad celular, analizamos el tiempo generacional de los diferentes cultivos. Los resultados obtenidos mostraron una tasa de proliferación significativamente aumentada en las células $CST^{+/+}$, con un tiempo generacional de 4,7 días. Por su parte las células $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ mostraron un crecimiento significativamente menor, con tiempos generacionales de 5,9 días y 6,3 días, respectivamente (Figura 58a). Además, los ensayos de *Alamar Blue*, indicadores de la actividad de las enzimas deshidrogenasas celulares, reflejaron una actividad especialmente disminuida en

células $CST^{-/-}$; mientras que los ensayos de ATP no mostraron diferencias significativas (Figura 58b).

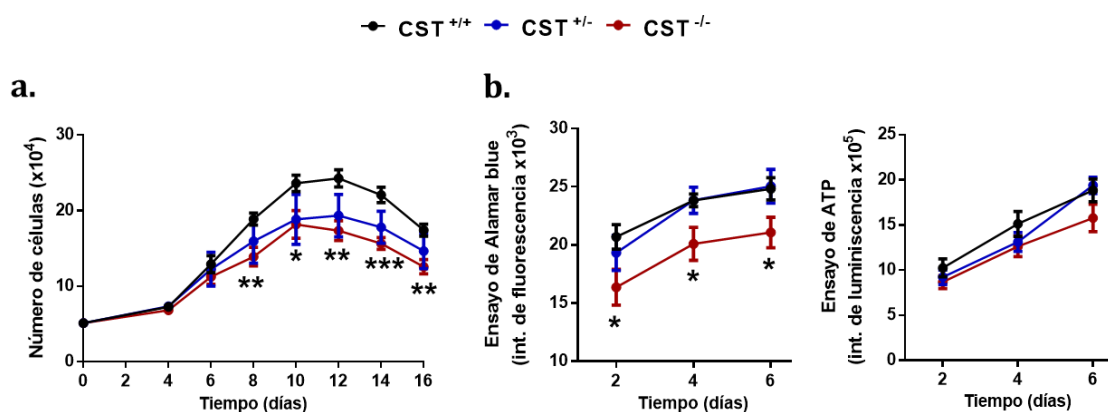


Figura 58. La carencia en Cortistatina predispone a los fibroblastos pulmonares a presentar un crecimiento más lento

a) Curva de crecimiento celular (3 experimentos con n=2 réplicas/punto temporal). b) Ensayos de *Alamar Blue* y ATP. Los valores se expresan en unidades arbitrarias (4 experimentos con 4-7 réplicas/punto temporal) (*Student t-test* no pareado de dos colas, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), o $p < 0,001$ (***) Vs $CST^{+/+}$).

Una acción fundamental que juegan los fibroblastos en la cicatrización de las heridas es la migración que realizan sobre esta con el fin de cerrarla. Para poder analizar la migración de las distintas cepas de fibroblastos realizamos un experimento de *Scratch*, el cual reflejó una capacidad de migración significativamente mayor en los fibroblastos $CST^{+/-}$ respecto a las células $CST^{+/+}$, llegando a cerrar la herida, tras 40-44 horas desde el inicio del experimento. Por su parte, los fibroblastos $CST^{-/-}$ fueron los que mostraron menor capacidad de migración, cerrando la herida con un día de diferencia (Figura 59).

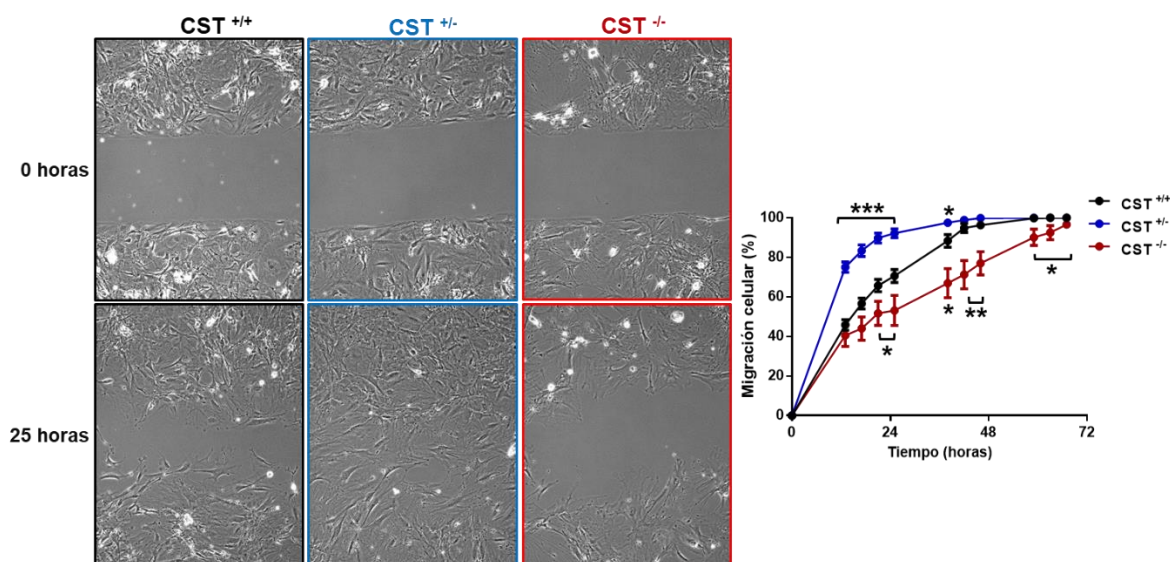


Figura 59. La falta de Cortistatina afecta a la capacidad de migración de los fibroblastos

Se analizó la migración de los fibroblastos pulmonares $CST^{+/+}$, $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ en los puntos temporales indicados. Imágenes tomadas a un aumento de 100X (2 experimentos con 2 réplicas/experimento) (*Student t-test* no pareado de dos colas, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), o $p < 0,001$ (***) Vs $CST^{+/+}$).

4.2.4 El tratamiento de los fibroblastos con Cortistatina mejora la expresión de los marcadores fibróticos

Con el fin de confirmar el efecto directo de Cortistatina sobre los fibroblastos, tratamos con Cortistatina a los fibroblastos pulmonares $CST^{+/+}$, $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ estimulados con $TGF\beta 1$. Tal y como esperábamos, el tratamiento con Cortistatina redujo de forma significativa la expresión de los marcadores profibróticos y componentes de la MEC, tales como α SMA, CTGF y $Col1a2$. Por su parte, aquellos fibroblastos que no fueron tratados con el neuropéptido mostraron una expresión incrementada de los mismos (Figura 60).

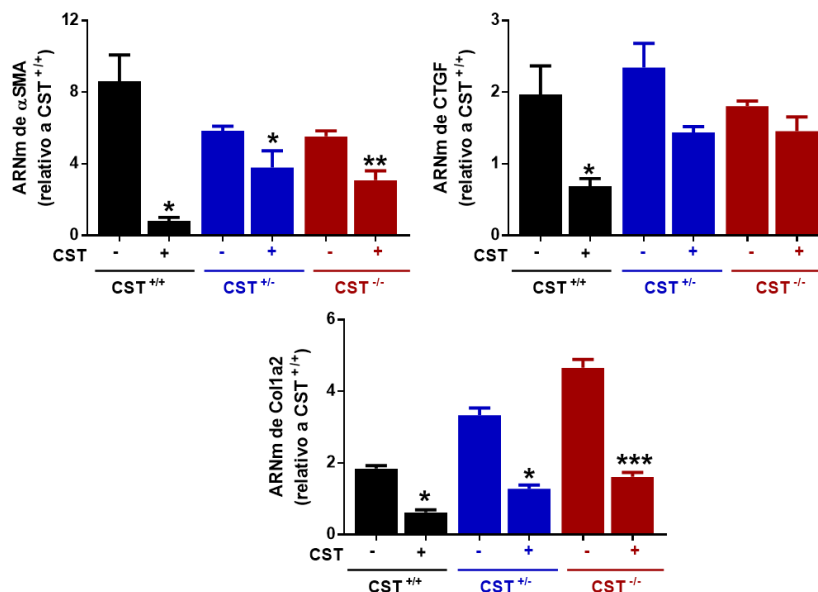


Figura 60. El tratamiento con Cortistatina disminuye la expresión de marcadores profibróticos por parte de los fibroblastos pulmonares

Se analizó la expresión del ARNm de α SMA, CTGF y $Col1a2$ de los fibroblastos pulmonares $CST^{+/+}$, $CST^{+/-}$ y $CST^{-/-}$ estimulados con $TGF\beta 1$ (10 ng/ml) y tratados (+) o no (-) con Cortistatina (10 nM) (n=5-8 cultivos independientes) (*Student t-test* no pareado de dos colas, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) Vs $CST^{+/+}$, $CST^{+/-}$ o $CST^{-/-}$ sin tratar con Cortistatina).

4.2.5 Expresión diferencial en el transcriptoma de fibroblastos $CST^{+/+}$ y $CST^{-/-}$

Una vez que observamos que la falta de Cortistatina favorecía un fenotipo más profibrótico pasamos a realizar un estudio masivo de la expresión génica (ARNseq) de las células con distinta dotación génica de Cortistatina para así poder identificar otros genes relacionados con el proceso de fibrosis. Con el fin de conocer qué genes relacionados con el proceso fibrótico se regulan de forma distinta en función de la expresión de Cortistatina, empleamos fibroblastos pulmonares aislados de ratones $CST^{+/+}$ y $CST^{-/-}$.

En primer lugar, verificamos mediante una RT-qPCR, los genotipos $CST^{+/+}$ y $CST^{-/-}$ de los fibroblastos de estudio (Figura 61a). A continuación, el estudio bioinformático de la expresión del gen de Cortistatina permitió detectar el transcrito de Cortistatina en las réplicas 2 y 3 de los cultivos $CST^{+/+}$ pero no en la 1. Por su parte, las muestras $CST^{-/-}$ no mostraron expresión del neuropéptido (Figura 61b). El análisis de componentes principales (PCA) mostró que la réplica 1 de la muestra $CST^{-/-}$ no se agrupaba correctamente y presentaba un comportamiento atípico por lo

que se descartó en la realización de los estudios de expresión diferencial y de enriquecimiento funcional posteriores (Figura 61c).

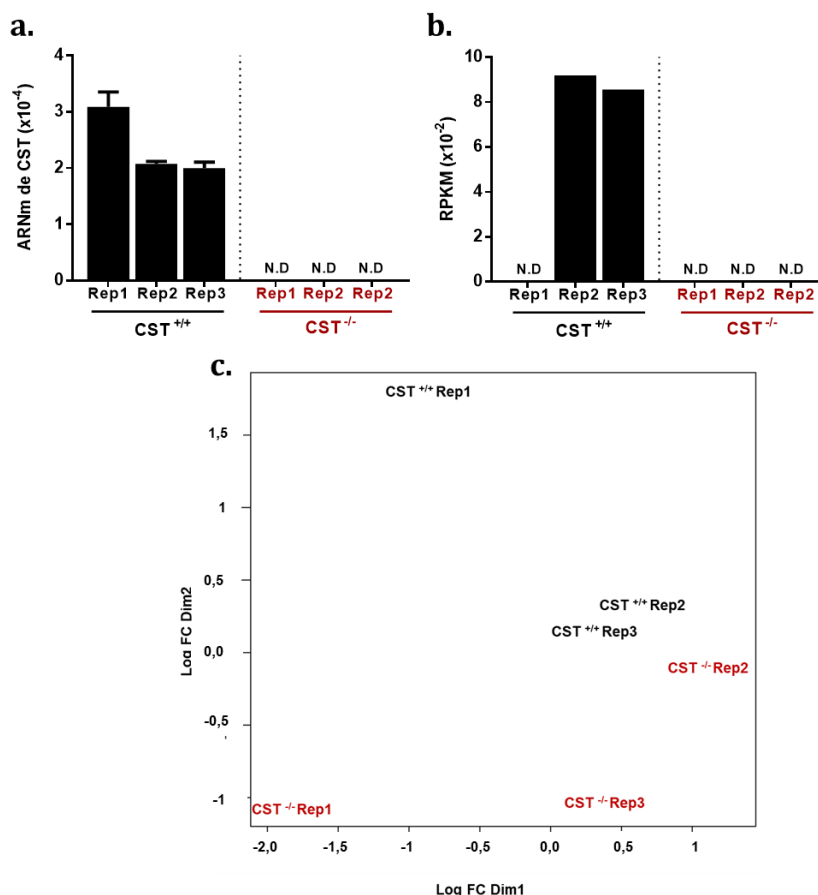


Figura 61. El estudio inicial de los cultivos de fibroblastos verifica su genotipo y agrupación

a) A partir de los fibroblastos CST^{+/+} y CST^{-/-} pulmonares se estudió la expresión del ARNm de Cortistatina (CST). Para cada genotipo se emplearon 3 réplicas (Rep1, Rep2 y Rep3) formadas por la unificación de 2 sub-cultivos (N.D, *Not detected*). A partir de los datos obtenidos del transcriptoma se analizaron: **b)** la detección del transcrito de Cortistatina (CST) mediante un análisis bioinformático. Se muestran las lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas (del inglés *Reads per kilobase Million*, RPKM) del gen de *cortistatina* en cada réplica; y **c)** análisis de componentes principales (PCA). *Log FC* = Logaritmo en base diez del *Fold-Change*. Para ambos estudios se muestran las 3 réplicas del cultivo CST^{+/+} y las 3 del cultivo CST^{-/-}.

El análisis de expresión, representado en un volcano-plot, reveló que había 41 genes regulados de forma diferencial entre los fibroblastos CST^{+/+} y CST^{-/-} con un FDR<0,05 (Tabla 8. Figura 62a. Valores de RPKM en la tabla 11 del anexo). Entre los genes que se encontraban regulados al alza en los cultivos CST^{-/-} se encontraban algunos relacionados con la organización de las fibrillas de colágeno y remodelación de tejido conectivo (*lum*, *cxcl5*), la migración de celular y la reparación de tejidos (*lum*, *ptn*), el crecimiento y la supervivencia celular (*ptn*), la diferenciación celular y la EMT (*lum*, *ptn*), la activación de fibroblastos (*lum*), la angiogénesis (*ptn*, *cxcl5*, *lum*) o la respuesta inmunológica (*lum*, *cxcl5*, *tnfsf8*). Por su parte, entre los genes regulados a la baja en los fibroblastos CST^{-/-}, se encontraban algunos relacionados con la biosíntesis de proteínas (*efl1a2*), la promoción respuestas TH2 (*il1r1l1*), la diferenciación celular y la metabolización de sustratos (*adh7*). De los 41 genes expresados diferencialmente de forma significativa se seleccionaron 8 (5 regulados al alza: *tnfsf8*, *cxcl5*, *ptn*, *lum* y *alpl*; y 3 regulados a la baja: *efl1a2*, *il1r1l1* y *adh7*) cuya expresión diferencial fue validada mediante una RT-qPCR en

Resultados

el laboratorio. Los resultados reflejaron que el *fold-change* de los genes *tnfrsf8*, *cxcl5*, *ptn*, *lum*, *ef1a2* y *adh7* obtenido en las dos técnicas (ARNseq y RT-qPCR) presentaban una buena correlación, mientras que el obtenido para los genes *alpl* e *il1rl1* no mostraron el mismo comportamiento (Figura 62b). A partir de los datos obtenidos para la expresión de todos los genes de interés en ambos análisis, se realizó un estudio de correlación mediante el cual se obtuvo un coeficiente de Pearson de 0,9 indicando, por tanto, una buena correspondencia entre ambos experimentos.

GENES REGULADOS A LA BAJA EN FIBROBLASTOS <i>CST</i>^{-/-}			
Gen	FC	Función	Ref.
<i>platr16</i>	35	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ARN no codificante (ARNnc) regulador de la expresión génica. ▪ Los ARNnc Platr están implicados con el programa de expresión génica asociada a diferenciación y desarrollo de las células madres embrionarias 	(200)
<i>zfp982</i>	28	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gen marcador de las células madre embrionarias de ratón ▪ Previenen la diferenciación neuronal y mantiene las características de las células madre. 	(201)
<i>ef1a2</i>	16	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Biosíntesis y elongación de proteínas ▪ Relacionado con la proliferación de fibroblastos 	(202)
<i>crabp1</i>	14	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Procesos de diferenciación y proliferación mediados por el ácido retinoico. ▪ Marcador de fibroblastos de papila dérmica que influyen en la diferenciación de las células madre en el abultamiento del folículo piloso ▪ Protege el corazón del daño inducido por isoproterenol, reduciendo la hipertrofia y la fibrosis 	(203,204)
<i>zfp984</i>	12	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Regulación de la transcripción. No hay relación con fibrosis 	-
<i>morc1</i>	12	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Espermatogénesis. No hay relación con fibrosis 	-
<i>il1rl1</i>	9	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proliferación y promoción de respuestas Th2 ▪ Proliferación de fibroblastos e inducción de la EMT ▪ Implicación en fibrosis pulmonar, dérmica, hepática y renal ▪ Función cardioprotectora ▪ Papel dual de la forma transmembrana y soluble 	(259,261, 262)
<i>cck</i>	5	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Liberación de enzimas pancreáticas ▪ La activación de su receptor CCKR (presente en fibroblastos) favorece la progresión de la fibrosis pancreática 	(208)
<i>adh7</i>	5	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diferenciación celular por medio de la síntesis de vitamina A ▪ Metabolización de sustratos (etanol, retinol, peróxidos...) ▪ Participa en vías implicadas en reducir la esteatosis y la fibrosis en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica 	(209,210)
<i>igfbp2</i>	4	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se une a IGF-I e IGF-II (factores de crecimiento similares a la insulina) con alta afinidad regulando la proliferación celular ▪ Su expresión se encuentra incrementada en FPI y fibrosis hepática actuando como marcador de ambas patologías 	(211-213)
<i>itgbl1</i>	4	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteína tipo integrina beta 1. Participa en adhesión celular, adhesión célula-matriz, migración celular y señalización mediada por integrina ▪ Regulador clave de la fibrogénesis hepática actuando aguas arriba de TGFβ y promoviendo la expresión de αSMA y la activación de las HSC ▪ Marcador la progresión de la cirrosis 	(214,215)
<i>s100a4</i>	3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteína de unión a calcio marcador de fibroblastos ▪ Promoción de la fibrosis pulmonar a través de la activación de fibroblastos: producción y secreción por parte de macrófagos M2 que lleva a la inducción de la proliferación y activación de fibroblastos ▪ Promoción de fibrosis cardiaca y la fibrosis hepática ▪ Promoción de la motilidad de las células cancerosas ▪ Expresión regulada por Smad3 	(241-244,278, 279)
<i>rab6b</i>	3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Regulador del tráfico de membrana desde el aparato de Golgi hacia el retículo endoplásmico 	(222)
<i>pdpn</i>	3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Marcador de lesión pulmonar y de transición epitelial-mesenquimal ▪ Migración y adhesión celular de células tumorales y fibroblastos asociados al cáncer a la matriz extracelular 	(223-225)
<i>tnfrsf1b</i>	3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Receptor que media los efectos metabólicos del TNF-α 	(226)

Resultados

<i>c1qtnf3</i>	3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Efectos antifibróticos, antiapoptóticos y antiinflamatorios ▪ Mejora la fibrosis renal mediante la inhibición de la señalización de la vía Notch ▪ Inhibe la proliferación, migración y depósito de MEC de las HSC estimuladas TGFβ1 por medio de la disminución de la fosforilación de SMAD 3 ▪ Inhibe la expresión de TGFβ1, CTGF y colágeno I en fibroblastos de colon 	(235,236, 285)
<i>prrx2</i>	2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proliferación de fibroblastos fetales, con baja expresión en piel adulta ▪ Regula positivamente a Wnt5a promoviendo la fibrosis cardiaca 	(230)
GENES REGULADOS AL ALZA EN FIBROBLASTOS <i>CST</i>^{-/-}			
Gen	FC	Función	Ref.
<i>serpine2</i>	2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Acumulación de colágeno ▪ Alteración de la angiogénesis 	(231–233)
<i>piezo2</i>	3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Expresado por células endoteliales. Papel similar a la angiogénesis ▪ Relacionada con sepsis ▪ Piezo1 es expresada por fibroblastos cardiacos y miocitos y está relacionada con la producción de IL6 por fibroblastos cardiacos y con fibrosis pulmonar 	(234,235)
<i>ror1</i>	3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Junto con ROR2 media la señalización de WNT5a, promoviendo enfermedades pulmonares como la FPI ▪ Regulación de la fibrosis intersticial de la glándula submandibular 	(236,237)
<i>cd55</i>	4	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibe la activación del complemento ▪ TGFβ1 aumenta su expresión en fibroblastos protegiéndolos frente al complemento. 	(238,239)
<i>gdf6</i>	5	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Crecimiento óseo y mineralización (calcificación vascular) y formación de la retina ▪ Diferenciación celular 	(240)
<i>pitx2</i>	5	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Papel poco claro en fibrosis. Parece que su deficiencia favorece la expresión de TGFβ y la migración de fibroblastos cardiacos. 	(241,242)
<i>alpl</i>	7	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Crecimiento óseo y mineralización (calcificación vascular) 	(243,244)
<i>lum</i>	8	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Organización de las fibrillas de colágeno y remodelación de tejido conectivo ▪ Migración de celular y la reparación de tejidos ▪ Diferenciación celular ▪ Activación de fibroblastos ▪ Angiogénesis ▪ Respuesta inmunológica 	(245–247)
<i>arisi</i>	10	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Síntesis de hormonas, señalización celular en el desarrollo y degradación de macromoléculas. 	-
<i>tbx20</i>	10	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Desarrollo cardiaco y diferenciación celular. Su deficiencia de asocia a patologías estructurales cardiacas. 	(248)
<i>il1rn</i>	12	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Regulación inmunológica: inhibición de respuestas de la IL1 (observado en células T y células endoteliales in vitro) ▪ Se induce en diferentes tipos de células del SI y los fibroblastos por IgG, citoquinas y productos bacterianos. 	(249)
<i>ptn</i>	16	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Migración de celular y la reparación de tejidos ▪ Crecimiento y supervivencia celular ▪ Diferenciación celular ▪ Angiogénesis ▪ Efectos neuronales (crecimiento, proliferación...) 	(250–252)
<i>olfr1033</i>	24	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Receptor olfatorio. Función desconocida en fibrosis 	-
<i>cxcl5</i>	27	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Organización de las fibrillas de colágeno y remodelación de tejido conectivo ▪ Angiogénesis ▪ Reclutamiento de neutrófilos 	(253,254)
<i>tnfsf8</i>	43	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proliferación linfocitos T ▪ Activación de mastocitos y respuesta inflamatoria 	(255)

Tabla 8. Los fibroblastos *CST*^{-/-} expresan diferencialmente algunos genes con respecto a los fibroblastos *CST*^{+/+}

Genes expresados diferencialmente excepto aquellos de función desconocida. Se indica el nombre de cada gen; el *Fold-change* (FC, veces que cambia la expresión del gen en los cultivos *knockout* con respecto a los cultivos *CST*^{+/+}); la función del gen y su relación la fibrosis; y las referencias bibliográficas. La función general de todos los genes se buscó, adicionalmente, en la base de datos *Uniprot* (página web: www.uniprot.org/).

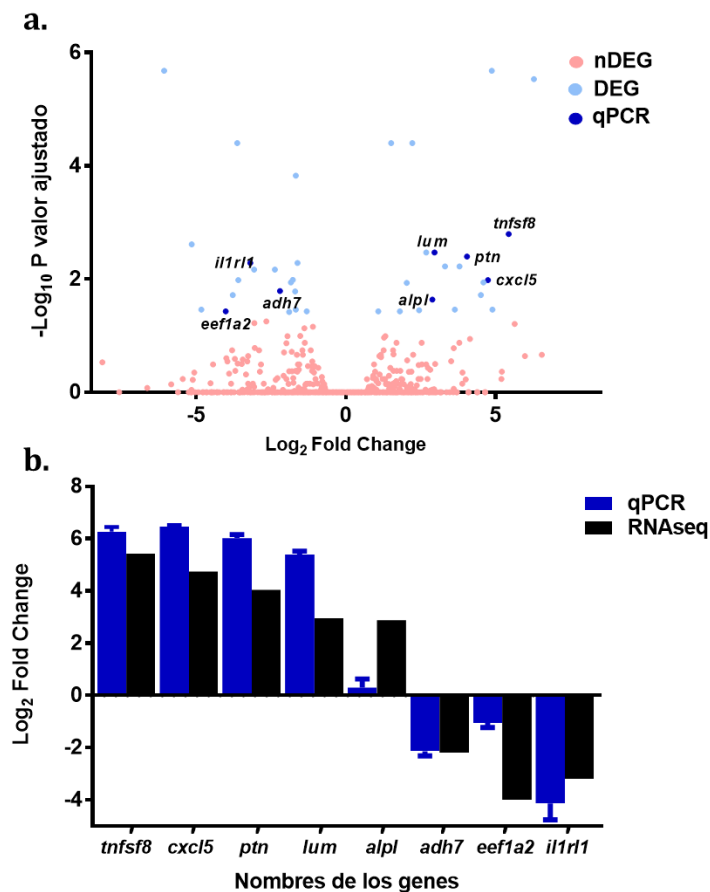


Figura 62. Los fibroblastos $\text{CST}^{+/+}$ y $\text{CST}^{-/-}$ muestran una expresión génica diferencial

a) Volcano-plot de los genes que se expresan diferencialmente en los fibroblastos $\text{CST}^{-/-}$ con respecto a los $\text{CST}^{+/+}$. Para cada gen se muestra el $-\log_{10}$ en base diez de p valor ajustado ($-\text{Log}_{10}$ Adjust P Value, que indica la significancia estadística) frente a logaritmo en base dos del *fold-change* (Log_2 Fold change, que indica la cantidad de veces que un gen se regula al alza (hacia la derecha) o a la baja (hacia la izquierda) con respecto a ese mismo gen en las células $\text{CST}^{+/+}$). En color rojo se representan aquellos genes que no muestran expresión diferencial (nDEG); en color azul claro los que sí la tienen (DEG) con un p valor ajustado $< 0,05$; y en color azul oscuro se muestran los genes con expresión diferencial que se validaron por RT-qPCR (qPCR). **b)** Bar-plot de los 7 genes expresados diferencialmente ($\text{FDR} < 0,05$) escogidos para validar. Se representa el logaritmo en base dos del *fold-change* (Log_2 Fold change) obtenido mediante RT-qPCR (azul) y el análisis bioinformático (negro) para cada gen de interés. Los genes que se muestran por encima del eje X se corresponden con aquellos que muestran una expresión al alza en las células $\text{CST}^{-/-}$ con respecto a las $\text{CST}^{+/+}$. Mientras que aquellos que se muestran por debajo del eje X se corresponden con los que muestran una expresión a la baja. Para realizar la PCR las réplicas se pusieron por duplicado.

A partir de los 41 genes diferencialmente expresados que mostraban un $\text{FDR} < 0,05$, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento de los mismos mediante *Gene Ontology* (GO). Así, en el análisis de los procesos biológicos obtuvimos una participación de los genes en la regulación de la señalización $\text{Nf-}\kappa\beta$, la diferenciación células gliales, la producción de quimioquinas y la morfogénesis de vasos sanguíneos, entre otros (Figura 63a). Por su parte, en el estudio de las funciones moleculares encontramos un enriquecimiento en funciones tales como la unión y actividad de citoquinas o la regulación de receptores (Figura 63b).

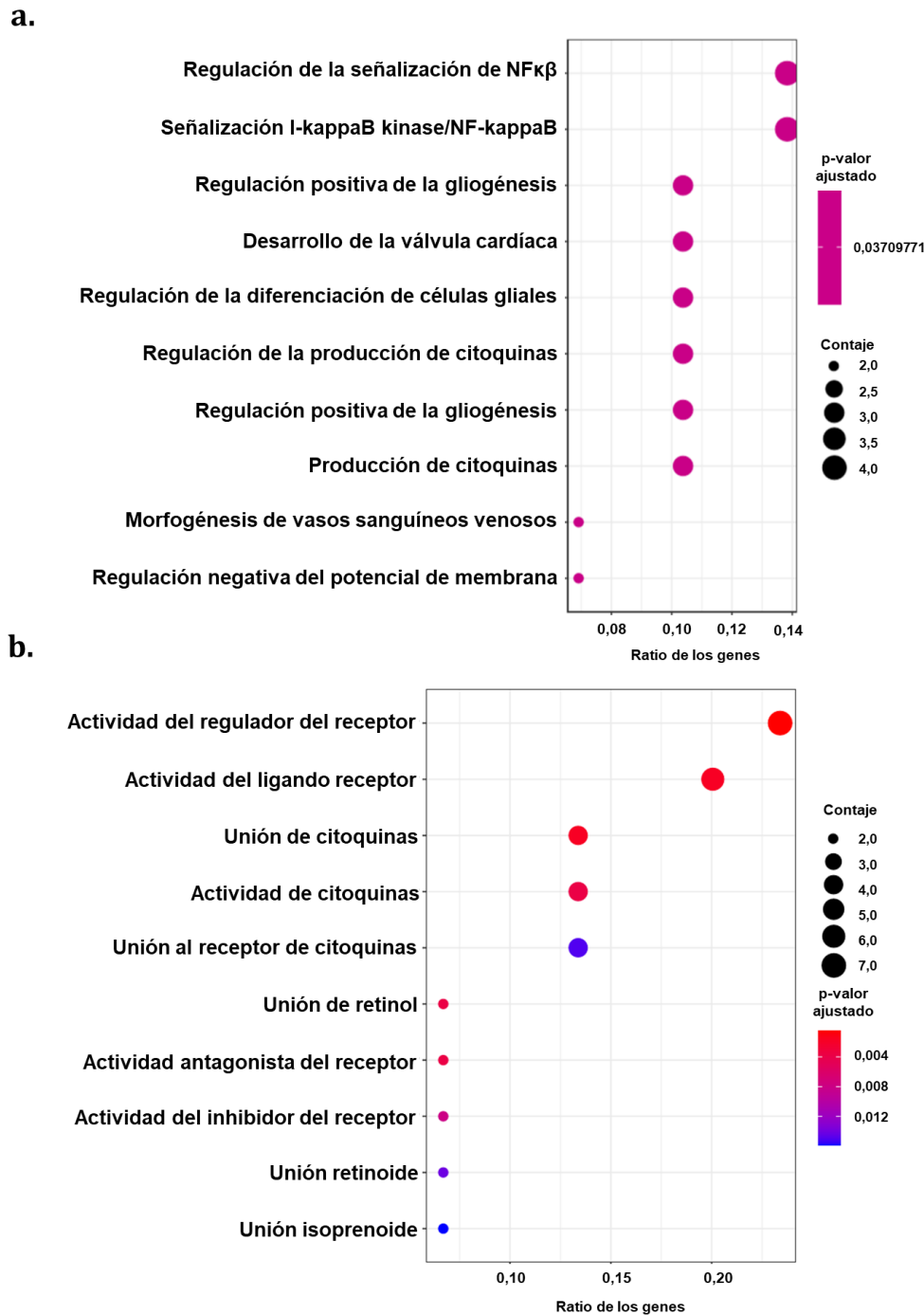


Figura 63. Análisis de enriquecimiento funcional de los genes diferencialmente expresados en cultivos de fibroblastos CST^{+/+} y CST^{-/-}

Enriquecimiento funcional de los 41 genes con un FDR<0,05. Se muestra el enriquecimiento de los procesos biológicos (a) y de las funciones moleculares (b). Para cada análisis se muestra: i) el p valor ajustado, el cual indica la significancia estadística del análisis. Para cada análisis los p-valores obtenidos se representan según los colores indicados; ii) la ratio de genes, el cual indica el ratio o proporción de genes que participan en el proceso biológico o la función molecular correspondiente con respecto al total de genes analizados. Cuanto mayor sea la ratio, más a la derecha se representa; y iii) el número de genes diferencialmente expresados (contaje) implicados en ese proceso biológico o función molecular. El número de genes indicado es representado, así mismo, por el tamaño de los círculos. Así, a mayor tamaño, mayor número de genes participan en ese proceso biológico o función molecular.

4.3 Objetivo 3. Estudio del posible efecto terapéutico de la administración de Cortistatina en enfermedades crónicas asociadas a procesos de fibrosis

Una vez que observamos que Cortistatina presentaba un papel regulador directo sobre el proceso de fibrosis, procedimos a analizar si su administración presentaba efectos en las patologías asociadas a fibrosis crónica. Para llevar a cabo este estudio, empleamos los modelos preclínicos de fibrosis pulmonar y esclerodermia inducidos por Bleomicina descritos previamente. A continuación, se detallan los resultados obtenidos en ambos modelos.

4.3.1 El tratamiento con Cortistatina presenta efectos terapéuticos en fibrosis pulmonar

Para llevar a cabo la inducción del modelo de fibrosis pulmonar en animales $CST^{+/+}$, se empleó una inyección i.t de 3,2 U/kg de Sulfato de Bleomicina. Una vez establecido el modelo, el tratamiento con Cortistatina se realizó siguiendo 2 estrategias: una estrategia protectora, en la cual el tratamiento se realizó 3 veces por semana desde el inicio del modelo; y una estrategia terapéutica, en la cual el tratamiento se realizó a partir del quinto día del inicio del modelo, una vez ya pasado el proceso inflamatorio.

El tratamiento con Cortistatina siguiendo un régimen protector (Figura 64a) redujo significativamente la mortalidad inducida por Bleomicina en un 60% (Figura 64b), así como la pérdida de peso asociada al desarrollo de la enfermedad (Figura 64c).

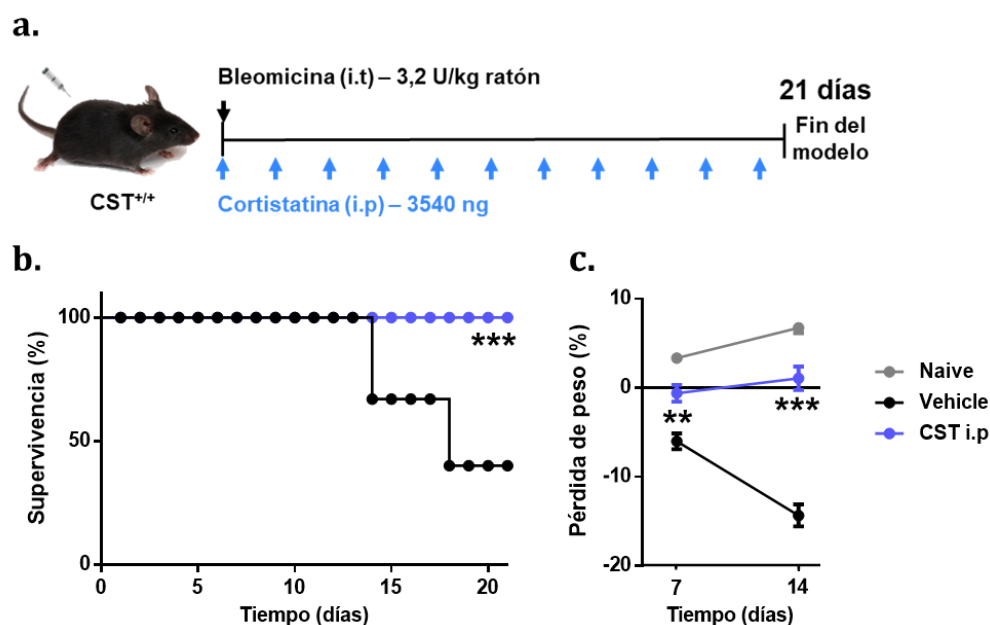


Figura 64. El tratamiento protector con Cortistatina mantiene la supervivencia y el peso de los ratones con fibrosis pulmonar

a) Se desarrolló en ratones $CST^{+/+}$ el modelo de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina y se trató a los animales con Cortistatina siguiendo un régimen protector, como se muestra en la figura. Los animales no tratados con Cortistatina recibieron el vehículo. Durante todo el modelo se monitorizó: b) la mortalidad (n=15 ratones/grupo); y c) la variación del peso de los animales (n=8 ratones/grupo) (*Kaplan–Meier log-rank test* y *test Mann-Whitney* $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***) Vs ratones con vehículo).

El análisis de la respuesta inflamatoria mostró en los animales tratados una disminución significativa de la infiltración leucocitaria (macrófagos, neutrófilos y leucocitos), así como del edema pulmonar (medido por la concentración de proteínas) entre los días 7 y 14 de la inducción del modelo; lo que se acompañó de la disminución en la producción de citoquinas proinflamatorias (MIP2, IL1, IL6 y TGFβ), en comparación con los animales que recibieron el vehículo (Figura 65a). Por su parte, la lesión asociada a fibrosis reflejó una reducción significativa en los ratones tratados con Cortistatina, llegando a reducirse el área afectada en un 50% con respecto a los ratones vehículo (Figura 65b).

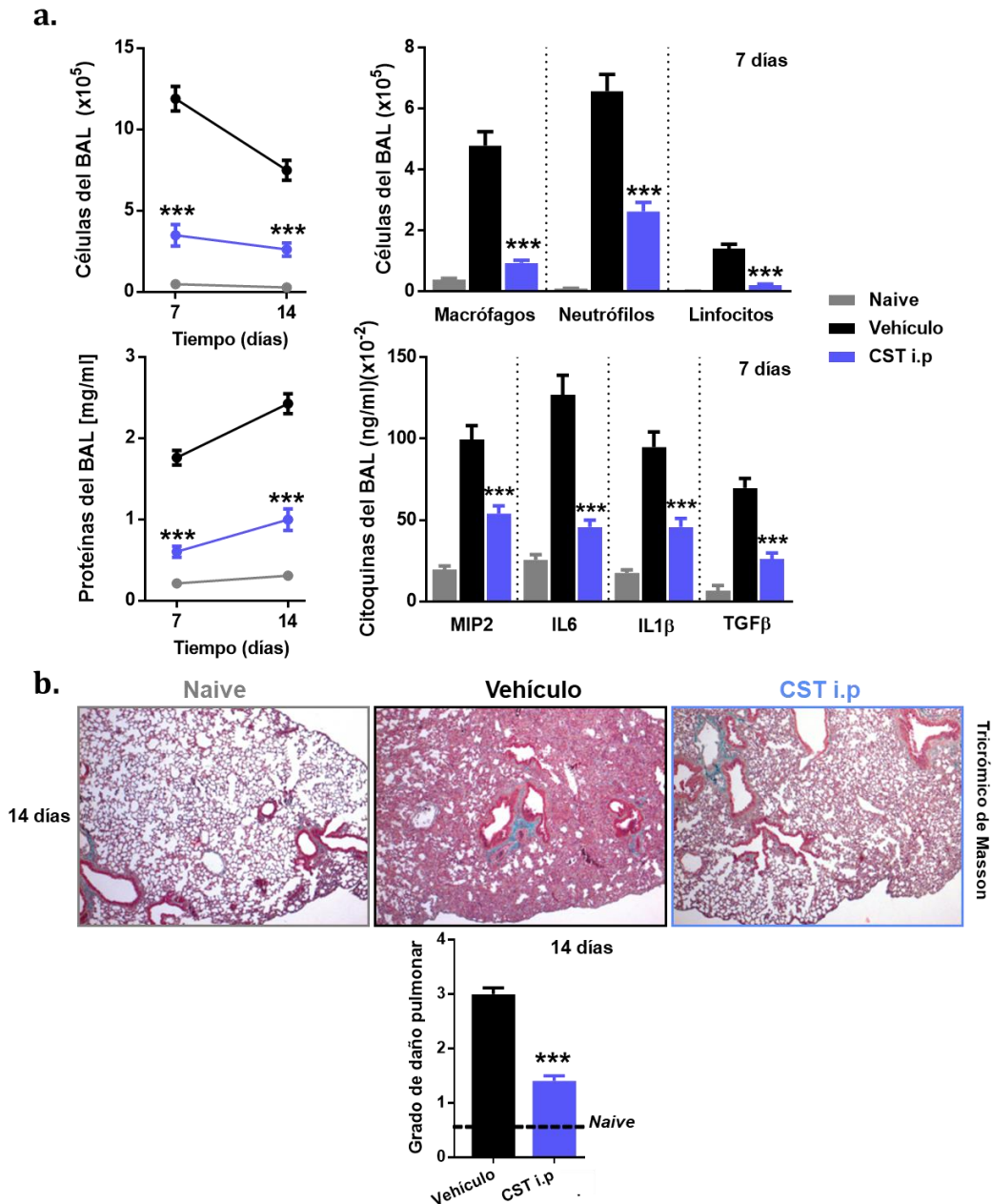


Figura 65. El tratamiento protector con Cortistatina reduce la respuesta inflamatoria en animales con fibrosis pulmonar

Trascurridos 7 y 14 días de la inducción del modelo de fibrosis pulmonar en animales CST^{+/+} tratados con Cortistatina siguiendo un régimen protector (representado en la figura 64a) se analizó: **a)** La respuesta inflamatoria (n=6 ratones/grupo); y **b)** Los signos histopatológicos de fibrosis pulmonar (n=7-13 ratones/grupo). La línea negra discontinua indica el grado de lesión de los ratones *naive* (Test Mann-Whitney p<0,001 (***) Vs ratones con vehículo).

Por otro lado, el tratamiento con Cortistatina, ya fuera i.p o i.n, siguiendo un régimen terapéutico (Figura 66a) incrementó la supervivencia en torno a un 50%, en comparación con los ratones que recibieron el vehículo (Figura 66b).

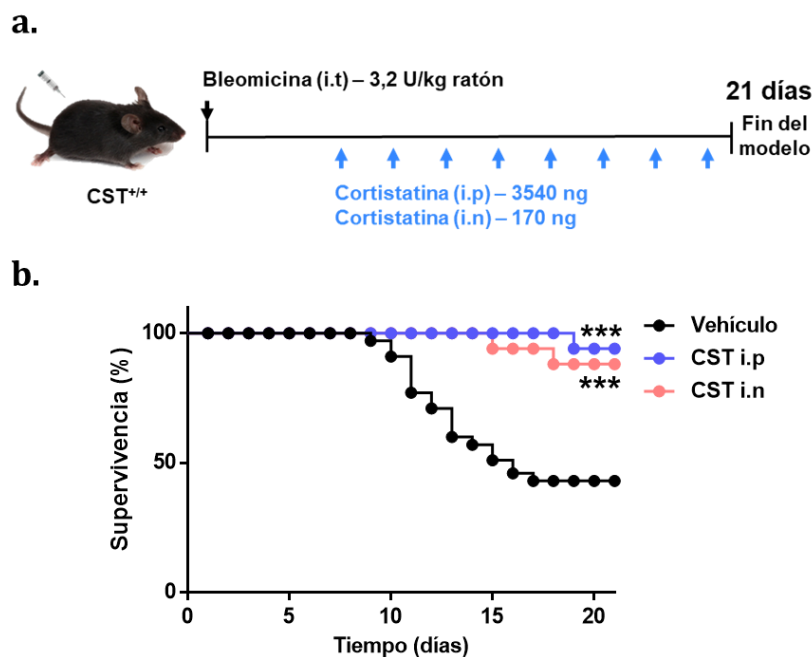


Figura 66. El tratamiento con Cortistatina siguiendo un régimen terapéutico favorece la supervivencia de los ratones con fibrosis pulmonar

a) Se indujo el modelo de fibrosis pulmonar en ratones $CST^{+/+}$ y se trató con Cortistatina siguiendo un régimen terapéutico como se indica en el esquema. Los ratones no tratados con Cortistatina recibieron el vehículo. **b)** Curva de la supervivencia de los ratones durante el transcurso del modelo ($n=35$ ratones vehículo y $n=16$ ratones tratados con Cortistatina i.p e i.n) (*Kaplan-Meier log-rank test* $p<0,001$ (***) Vs ratones con vehículo).

Debido a la elevada mortalidad observada en los animales no tratados decidimos tomar muestras tanto al final del modelo como antes de que se iniciaran las primeras muertes (tras 10 días) con el fin de poder analizar las diferencias entre los ratones tratados y no tratados con Cortistatina antes de llegar al punto crítico en el que los animales empezaban a morir. El análisis histopatológico de los pulmones, así como el análisis de los depósitos de colágeno, mostraron que la administración de Cortistatina, ya fuera de forma i.n o i.p, presentaba efectos terapéuticos. En este sentido, a nivel histopatológico se observó una disminución significativa en la infiltración celular, en la alteración de la arquitectura alveolar y en el depósito de colágeno con respecto a aquellos ratones que recibieron el vehículo (Figuras 67a y 67b). Finalmente, el análisis de α SMA mostró una expresión incrementada de este marcador fibrogénico en los ratones que recibieron el vehículo frente a aquellos que recibieron Cortistatina, indicando una mayor diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y, por tanto, un fenotipo más profibrótico (Figura 67c).

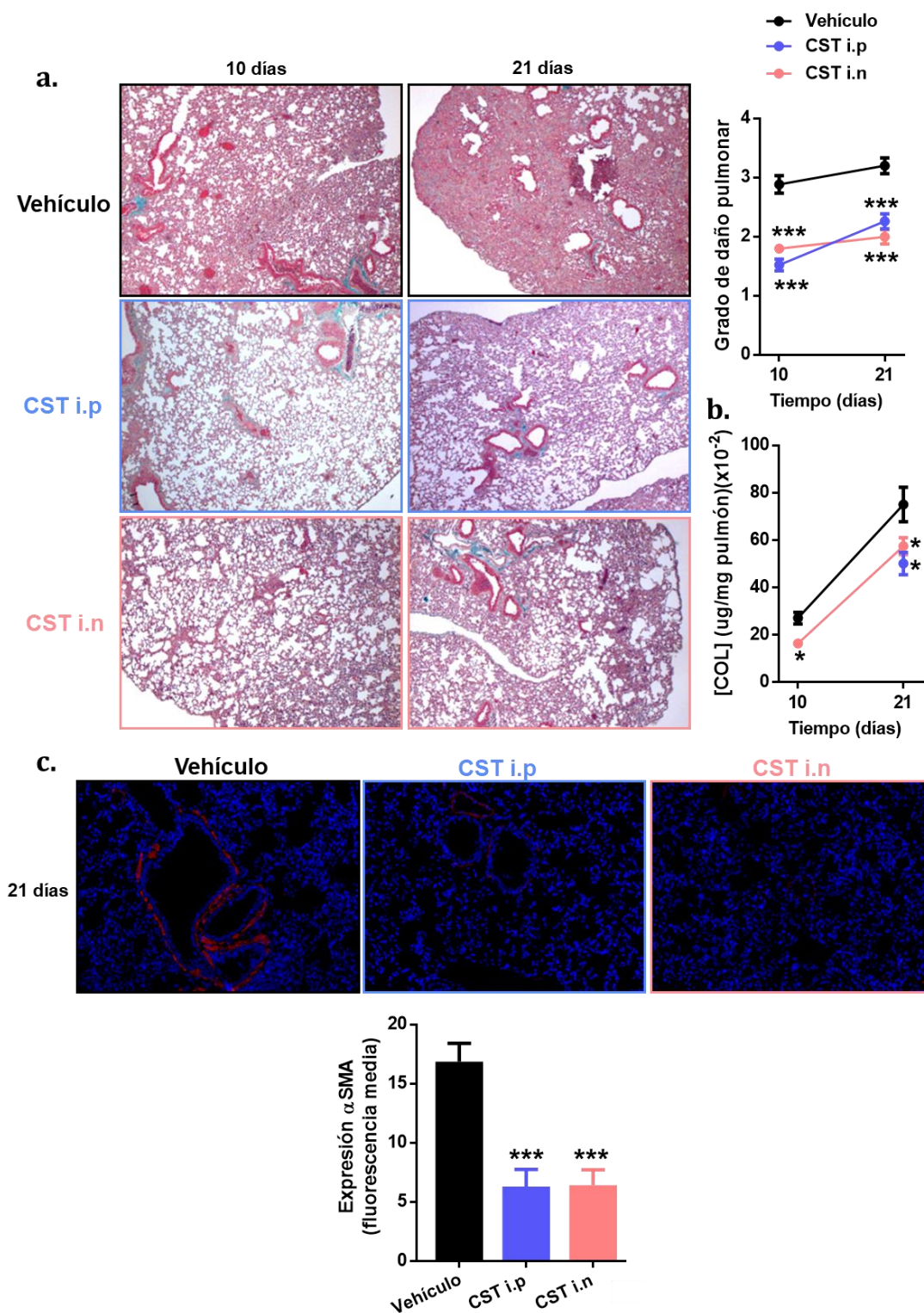


Figura 67. El tratamiento con Cortistatina siguiendo un régimen terapéutico reduce la progresión de la fibrosis pulmonar

Tras 10 y 21 días de la inducción de fibrosis pulmonar en ratones CST^{+/+} a los que se trató con Cortistatina de forma terapéutica (ver figura 66a), se extrajeron los pulmones y se analizó: **a)** la lesión pulmonar (imágenes tomadas a un aumento de 50X de secciones teñidas con Tricrómico de Masson); **b)** la cantidad de colágeno (n=6-10 ratones/grupo); y **c)** la localización y expresión proteica de α SMA (inmunofluorescencia de imágenes tomadas a un aumento de 200X donde se muestra en rojo α SMA y en azul los núcleos celulares) (n=7-8 ratones/grupo) (test *Mann-Whitney*, p<0,05 (*) o p<0,001 (***) Vs ratones con vehículo).

4.3.2 El tratamiento con Cortistatina presenta efectos terapéuticos en esclerodermia

Tras observar el efecto terapéutico de Cortistatina en fibrosis pulmonar, pasamos a analizar si dicho efecto tenía lugar en otro modelo de fibrosis. En el modelo de esclerodermia inducido mediante Bleomicina i.d (3,2 U/kg) el tratamiento con Cortistatina se realizó mediante inyecciones s.c de 3540 ng en un punto de la espalda próximo a la lesión, 3 veces/semana a partir del cuarto día. El análisis histopatológico de la piel de los ratones mostró que Cortistatina fue capaz de disminuir significativamente la lesión dérmica producida por Bleomicina. La piel de los ratones tratados mostró una menor infiltración celular, engrosamiento y descamación epidérmica que la de aquellos que recibieron el vehículo (Figura 68). Por su parte, el análisis de los pulmones mostró que el tratamiento conseguía disminuir de forma significativa la lesión pulmonar, hecho reflejado en la menor infiltración celular y el mantenimiento de la estructura alveolar (Figura 68).

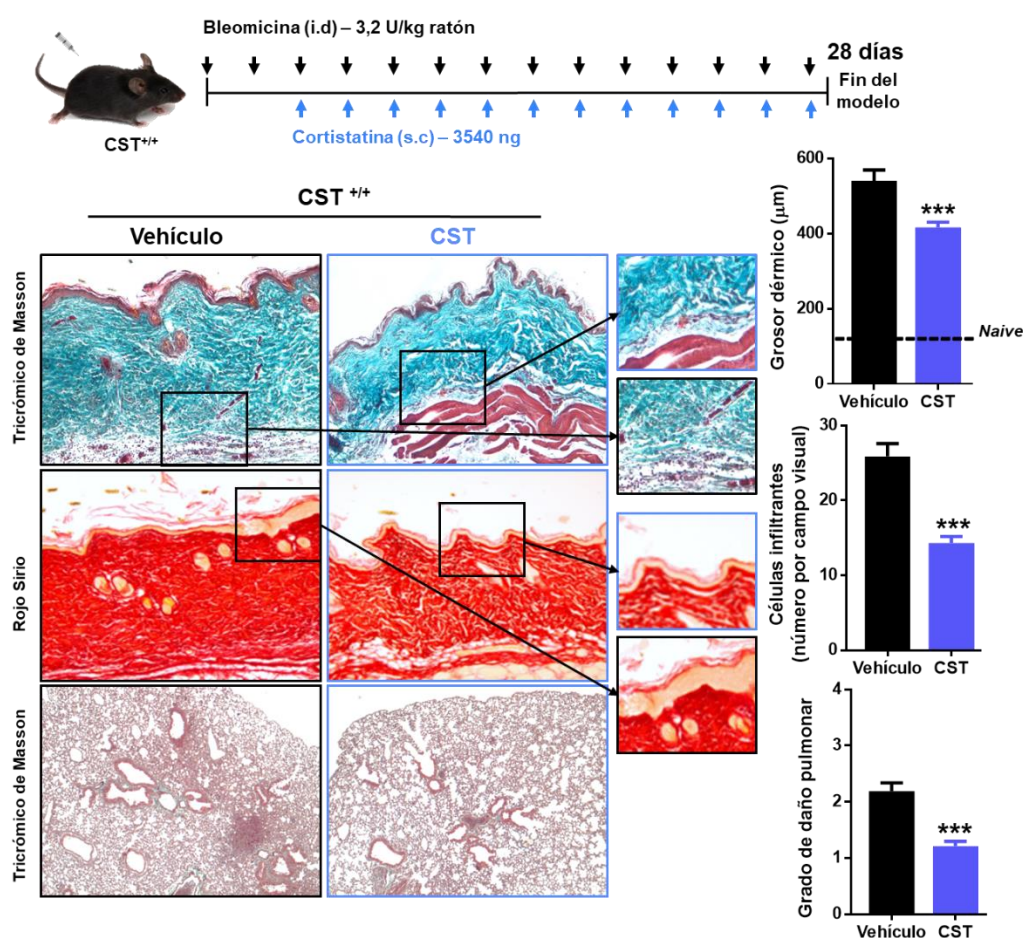


Figura 68. El tratamiento con Cortistatina reduce la fibrosis dérmica y pulmonar de los ratones con esclerodermia

Se desarrolló en ratones $CST^{+/+}$ el modelo de esclerodermia y se trató a los animales con Cortistatina o el vehículo (ver esquema). Tras 28 días se extrajeron la piel y los pulmones y se analizaron los rasgos histopatológicos por medio de las tinciones rojo Sirio (piel) y tricómico de Masson (piel y pulmones) (n=10 ratones/grupo para piel; experimento representativo de 3 con n=5 ratones/grupo para pulmones). Se tomaron imágenes de las secciones a un aumento de 100X para la piel y 50X para el pulmón, y se cuantificaron el grosor dérmico, la cantidad de células infiltrantes en la piel y el grado de lesión pulmonar. Los insertos muestran imágenes aumentadas de grosor de epidermis y de infiltrados inflamatorios subdérmicos. La línea negra discontinua indica el grado del grosor dérmico de los ratones *naive* (test *Mann-Whitney*, $p < 0,001$ (***) Vs ratones con vehículo).

En conjunto, los resultados obtenidos tanto en el modelo de fibrosis pulmonar como en el de SSc indican que Cortistatina presenta potentes efectos terapéuticos y, por tanto, puede considerarse como un posible tratamiento para las patologías asociadas a fibrosis crónica.

4.3.3 El uso de Cortistatina en animales CST^{+/-} con fibrosis pulmonar permite recuperar el fenotipo CST^{+/+}

A continuación, estudiamos si la administración de Cortistatina a animales con falta parcial del neuropéptido (CST^{+/-}) con fibrosis les permitía adquirir un fenotipo CST^{+/+} más resistente al proceso fibrótico. Para ello, se trató a ratones CST^{+/-} con fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina i.t (1,8 U/kg) con inyecciones i.p de Cortistatina (3540 ng) 3 veces por semana a partir del quinto día del inicio del modelo (Figura 69a).

Mientras que los ratones CST^{+/-} no tratados con Cortistatina experimentaron una disminución de la supervivencia del 60%, el tratamiento mantuvo la misma al 100% (Figura 69b). Además, el tratamiento con Cortistatina redujo el grado de lesión pulmonar en comparación con los animales que recibieron el vehículo (Figura 69c). Finalmente, se detectó una disminución significativa en la expresión de α SMA en los pulmones de los ratones tratados, en los cuales se detectó entre 3 y 4 veces menos señal, en comparación con aquellos que recibieron el vehículo (Figura 69d).

Estos resultados ponen de manifiesto que el tratamiento con Cortistatina de ratones CST^{+/-} con fibrosis les permite adquirir un fenotipo similar al de ratones CST^{+/+}, resultando en una mayor resistencia frente a los procesos fibróticos.

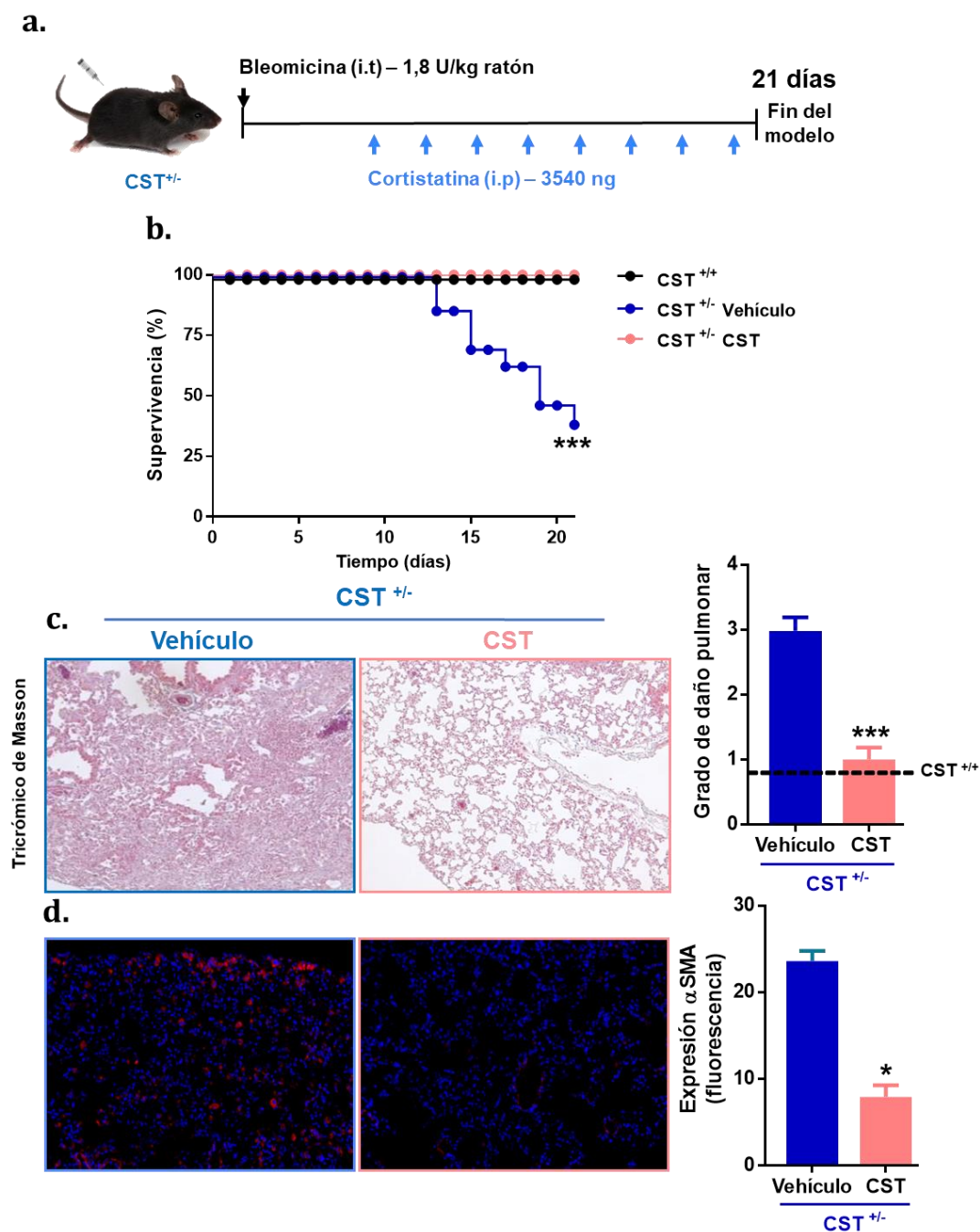


Figura 69. El tratamiento con Cortistatina de ratones CST^{+/-} con fibrosis pulmonar les permite adquirir un fenotipo más resistente frente a la fibrosis

a) Los animales CST^{+/-} con fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina fueron tratados con Cortistatina como se muestra en el esquema. **b)** Curva de supervivencia (n=5-11 ratones/grupo). Como control se emplearon ratones CST^{+/+} con fibrosis. **c)** Análisis histopatológico de los pulmones a partir de imágenes tomadas a un aumento de 50X de secciones teñidas con Tricrómico de Masson (n=5-11 ratones/grupo). La línea negra discontinua indica el grado de lesión de los ratones CST^{+/+} con fibrosis. **d)** Localización y expresión proteica de αSMA (inmunofluorescencia de imágenes tomadas a un aumento 200X). Se observa αSMA marcada rojo y los núcleos celulares marcados en azul (n=4 ratones/grupo) (*Kaplan–Meier log-rank test* y *Mann-Whitney*, p<0,05 (*) y p<0,001 (***) Vs ratones CST^{+/-} vehículo).

4.3.4 El efecto antifibrótico de Cortistatina es ejercido por medio de los receptores de Somatostatina y Grelina

Finalmente, con el objetivo de conocer si Cortistatina ejercía sus efectos antifibróticos por medio de los receptores de Somatostatina y Grelina, administramos a animales $CST^{+/-}$ con fibrosis pulmonar (inducida por Bleomicina i.t 1,8 U/kg) tratados con Cortistatina (3540 ng i.p) Ciclosomatostatina y GHRP-6, antagonistas de $SSTR1-SSTR5$ y $GHSR1\alpha$, respectivamente (Figura 70a). El análisis histopatológico de los pulmones de los ratones mostró un incremento significativo de la fibrosis en aquellos que recibieron los antagonistas de los receptores de Somatostatina y Grelina (Figura 70b y c). De forma correlativa, el bloqueo de los receptores predispuso a los animales a acumular mayor cantidad de colágeno pulmonar (Figura 70d), indicando todos estos hechos que el efecto antifibrótico de Cortistatina es ejercido a través de los receptores $SSTR1-SSTR5$ y $GHSR1\alpha$.

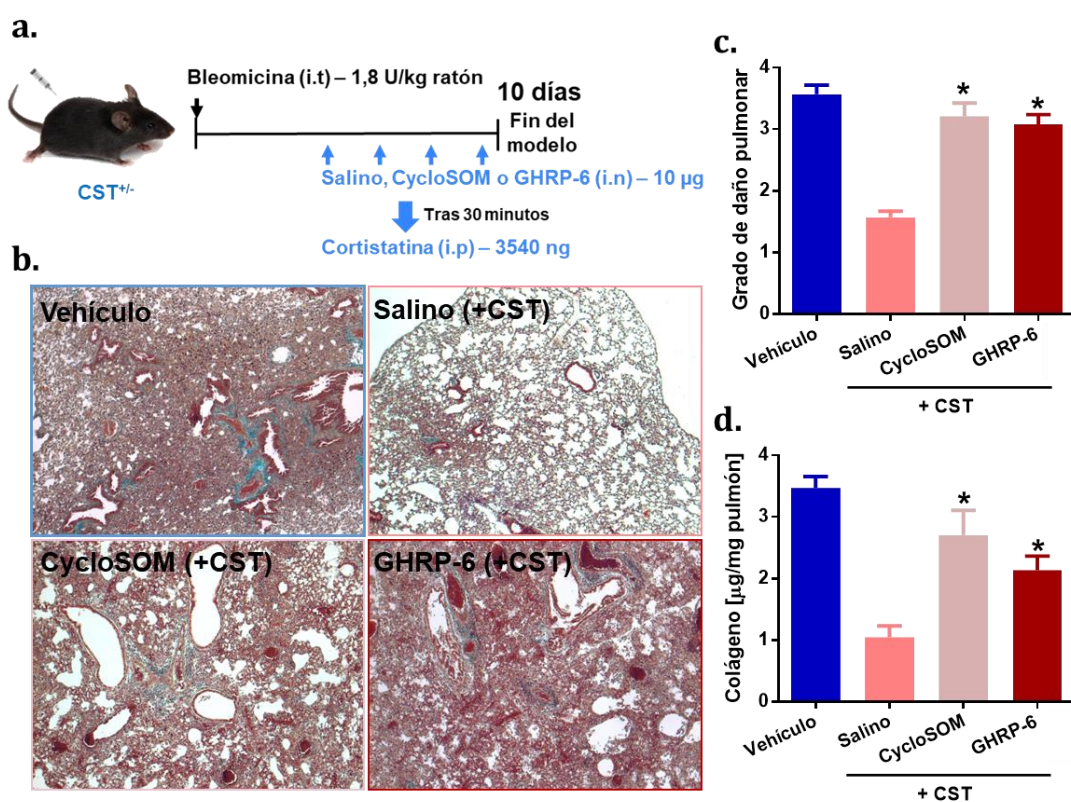


Figura 70. El bloqueo de los receptores de Somatostatina y Grelina impide la acción antifibrótica de Cortistatina

a) Se indujo el modelo de fibrosis pulmonar en ratones $CST^{+/-}$ y se trató con Cortistatina \pm salino, Ciclosomatostatina (CycloSOM) o GHRP-6 30 minutos antes de cada administración de Cortistatina, tal y como se indica en el esquema. Tras 10 días de la inducción del modelo, se aislaron los pulmones de los ratones y se llevó a cabo: **b)** y **c)** el análisis histopatológico de imágenes tomadas a un aumento de 50X de secciones teñidas con Tricrómico de Masson; y **d)** la cuantificación de los depósitos de colágeno. Se emplearon $n=5-6$ ratones/grupo (test *Mann-Whitney*, $p < 0,05$ (*) Vs Salino).

4.4 Objetivo 4. Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en el uso de Cortistatina capaces de incrementar su eficacia en términos de biodisponibilidad

Una vez que observamos que Cortistatina presentaba efectos terapéuticos en patologías asociadas a fibrosis crónica, pasamos a diseñar una molécula con el fin del solventar los problemas principales asociados al uso de neuropéptidos en terapia descritos previamente. Para ello, generamos una molécula de Cortistatina protegida por un escudo molecular conformado por el péptido LAP de TGF β , con el fin de aportar latencia a la construcción; dos *linkers* (L1 y L2) para dar flexibilidad a la molécula y permitirle adquirir la conformación adecuada; una secuencia de corte para enzimas MMPs que permitiera escindir a la molécula de Cortistatina; y la secuencia de Cortistatina, con función inmunorreguladora y antifibrótica.

Una vez generada Cortistatina latente determinamos en qué momento era más eficiente la recogida de los sobrenadantes celulares que contenían esta proteína. Pese a que tras 24 horas no se detectó Cortistatina sí pudo observarse que la secreción del neuropéptido aumentaba a las 48 horas de la transfección. Por su parte, la concentración proteica a 72 horas aumentó con respecto a las 48 horas (Figura 71), probablemente por acumulación de la proteína en el sobrenadante. Tal y como se esperaba, no se detectó Cortistatina en los sobrenadantes de las células transfectadas con la la proteína LAP.

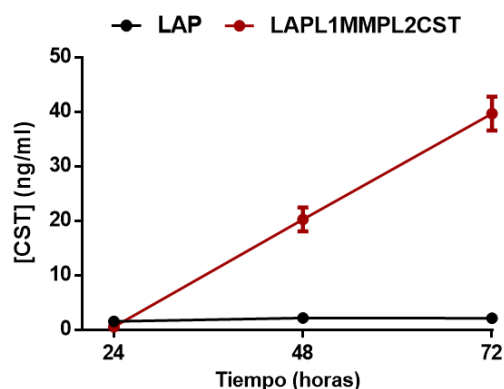


Figura 71. Secreción de Cortistatina latente

Los sobrenadantes de las células HEK293 transfectadas con los plásmidos parentales de LAP y Cortistatina latente (LAPL1MMPL2CST), se recogieron tras 24, 48 o 72 horas. Tras esto, se llevó a cabo la detección de Cortistatina mediante ELISA competitivo (n= 2 réplicas/condición).

A continuación, pasamos a analizar si la administración de Cortistatina latente en un modelo de fibrosis crónica presentaba efectos terapéuticos y, en caso de que así fuera, evaluar su eficacia respecto a la molécula de Cortistatina. Para ello, el tratamiento con Cortistatina latente se realizó mediante una inyección s.c de 1,1 ng por semana a partir del cuarto día del inicio del modelo de esclerodermia inducido por Bleomicina (Figura 72a). Los ratones no tratados con Cortistatina latente recibieron LAP. El estudio histopatológico de la piel mostró una disminución significativa del grosor dérmico en los ratones tratados con Cortistatina latente frente a los no tratados (Figura 72b). Además, los pulmones de los animales tratados vieron significativamente reducida el área de lesión fibrótica un 20% respecto a los animales tratados con LAP (Figura 72c). Los resultados observados en el tratamiento con Cortistatina latente fueron comparables a los obtenidos para el tratamiento con Cortistatina (Figura 72b y 72c). Sin embargo, mientras que las dosis para Cortistatina fueron de 3540 ng tres veces por semana, para Cortistatina latente fueron de 1,1 ng una vez por semana (Figura 72a). Por lo tanto, la cantidad de Cortistatina latente semanal fue 9000 veces menor en comparación con Cortistatina.

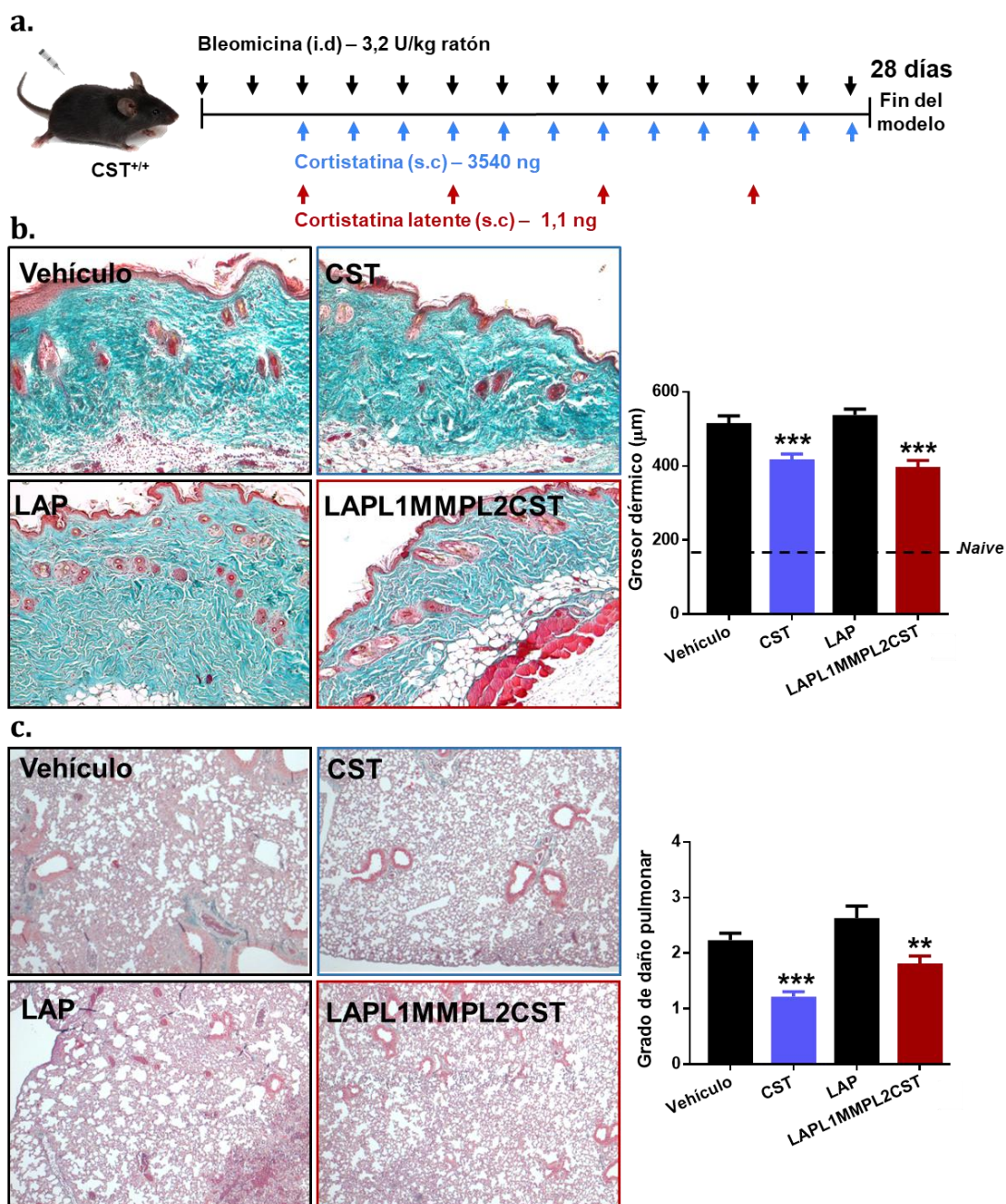


Figura 72. El tratamiento con Cortistatina latente de ratones con esclerodermia presenta elevados efectos terapéuticos

Se desarrolló en los ratones CST^{+/+} el modelo esclerodermia inducido por Bleomicina y se trató con Cortistatina latente como se muestra en la figura (a). Los animales no tratados con Cortistatina latente recibieron LAP. A partir de las muestras obtenidas del modelo de SSc se realizó el análisis histológico de la piel (b) y los pulmones (c) mediante la tinción tricrómico de Masson (imágenes tomadas a un aumento de 100X para piel y 50X para pulmón) (Test *Mann-Whitney*, $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***) Vs vehículo o LAP).

Una vez comprobada la eficacia de Cortistatina latente, pasamos a estudiar si el sitio de corte de las MMPs era un elemento necesario para lograr el efecto terapéutico de Cortistatina (LAPL1L2CST). Al mismo tiempo obtuvimos una Cortistatina latente sin los *linkers* ni el sitio de las MMPs (LAPCST) con el objetivo de evaluar si la sola presencia de estos era una condición necesaria para generar una Cortistatina activa. Las diferentes proteínas generadas fueron administradas a ratones CST^{+/+} con fibrosis pulmonar inducida por Bleomicina con 0,11 ng i.n

una vez por semana a partir del quinto día del inicio del modelo (Figura 73a). El tratamiento con la molécula de Cortistatina latente redujo la mortalidad en un 75% en comparación con LAP (de forma comparable al mantenimiento de la supervivencia ejercido por el tratamiento con 170 ng de Cortistatina 3 veces/semana, sección 4.3.1). Sin embargo, las proteínas LAPCST y LAPL1L2CST apenas tuvieron efecto sobre la supervivencia, que cayó de forma drástica a partir del día 9 (Figura 73b). Debido a que los ratones fueron muriendo durante el modelo, no se pudieron recoger muestras de todas las condiciones ni analizar las diferencias al final del mismo. El análisis histopatológico de los pulmones recogidos en los distintos puntos temporales mostró que los animales que no recibieron Cortistatina latente, tuvieron un grado de lesión pulmonar igual o superior a 3 (Figura 73c). Como consecuencia, presentaron un parénquima pulmonar completamente alterado, con un marcado engrosamiento de los tabiques alveolares y casi carente de espacios alveolares. Por su parte, el tratamiento con la molécula de Cortistatina latente redujo la lesión fibrótica, conservando la estructura pulmonar (Figura 73c).

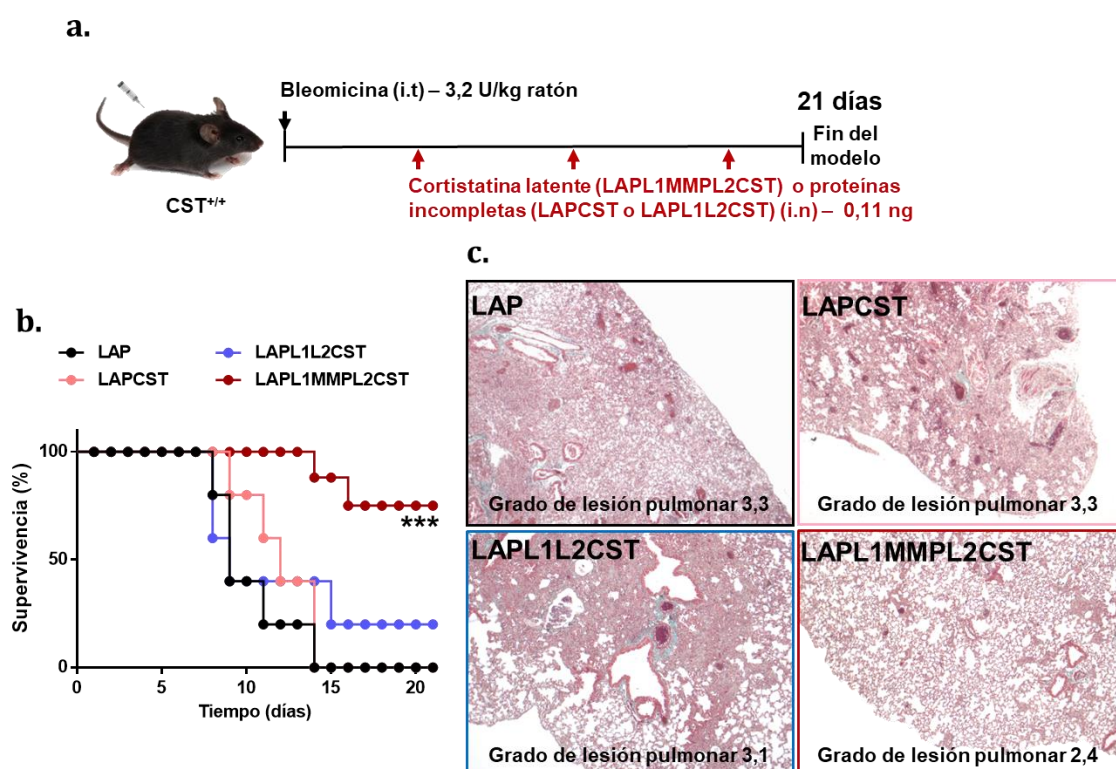


Figura 73. El tratamiento con Cortistatina latente es eficaz si la molécula tiene su estructura completa
a) Se indujo el modelo de fibrosis pulmonar a los ratones CST^{+/+} y se les trató con las diferentes construcciones latentes basadas en Cortistatina (LAPCST, LAPL1L2CST o LAPL1MMPL2CST) como se indica en el esquema. Como control se empleó LAP. Durante el desarrollo de todo el modelo se analizó: **b)** la mortalidad de los animales tratados con las diferentes proteínas latentes (n= 5-8 ratones/grupo) (*Kaplan–Meier log-rank test*, p<0,001 (***) Vs el vehículo); y **c)** el grado de lesión pulmonar (fotografías representativas de secciones pulmonares teñidas con tricrómico de Masson. Imágenes tomadas a un aumento de 50X. n= 3-8 ratones/grupo).

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran la enorme eficacia de Cortistatina latente para el tratamiento de patologías asociadas a fibrosis crónica, permitiendo reducir el número de administraciones y su cantidad por encima de 1000 veces con respecto a Cortistatina.

5. DISCUSIÓN

Cuando se produce una lesión en un tejido, se desencadena un proceso inflamatorio y de cicatrización - fibrosis - fisiológico con el objetivo de restaurar la estructura y función normales del mismo. En esta situación es necesario un equilibrio preciso entre factores inflamatorios y fibrogénicos *versus* inmunomoduladores y antifibróticos que permita sintonizar adecuadamente ambas respuestas. Sin embargo, cuando este escenario se descontrola puede desembocar en una situación de fibrosis perjudicial y patológica que afecte de forma irreversible al órgano dañado. A nivel pulmonar y dérmico la fase fibrótica perjudicial se encuentra precedida por una fase inflamatoria descontrolada, en la cual es característico encontrar focos de infiltración de células inmunológicas (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) en los tejidos dañados (Figura 74a) (7,256), así como un aumento de la permeabilidad a nivel de los epitelios endoteliales y alveolares. Esta inflamación, con la consiguiente liberación excesiva de factores inflamatorios, activa a los fibroblastos residentes tisulares, los cuales se diferencian a miofibroblastos α SMA⁺ y liberan grandes cantidades de moléculas de la MEC, provocando un proceso fibrótico exacerbado (Figura 74a) (256,257). Pese a que la fibrosis y las patologías asociadas a ella suponen una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial y el proceso fibrótico se encuentra muy conservado, debido a la complejidad de la red fibrogénica y de citoquinas implicadas, en la actualidad aún no se han logrado hallar agentes o factores que permitan afrontarlo de forma concreta y eficaz. En la actualidad, la falta de tratamiento implica que los pacientes reciban terapias de carácter sintomatológico incapaces de detener la enfermedad, como son la fototerapia y la quimioterapia, agentes vasodilatadores, antibióticos, analgésicos, corticosteroides, diuréticos, etc (122), y finalmente cirugía (126). Por ello, hallar un componente implicado en la regulación del proceso fibrótico y que sirva como diana terapéutica efectiva se ha convertido en todo un desafío que es necesario resolver en la mayor brevedad posible. En este contexto, nuestro estudio ha buscado determinar el papel del neuropéptido Cortistatina en la regulación de las distintas etapas del proceso fibrótico. Para ello, desarrollamos un modelo de fibrosis pulmonar y otro de esclerodermia y analizamos la progresión de la enfermedad en ratones con diferente dotación génica del neuropéptido (CST^{+/+}, CST^{+/-} y CST^{-/-}). En primer lugar, observamos que la piel y los pulmones de los animales CST^{+/+} expresaba tanto Cortistatina como sus receptores y, curiosamente, la expresión del neuropéptido se veía disminuida en un escenario de fibrosis. Además, encontramos que una deficiencia en Cortistatina predisponía a sufrir una patología más grave, con procesos inflamatorios y fibróticos más exacerbados y con mayores tasas de mortalidad. Así, encontramos que la piel de los ratones deficientes en Cortistatina expuestos a Bleomicina mostraban un incremento del grosor dérmico, así como un aumento en el depósito de colágeno. Además, los pulmones de estos animales mostraron signos de infiltración celular y el desarrollo de fibrosis. Estos hechos se relacionaron con un incremento de la mortalidad de los animales CST^{+/-} y CST^{-/-} en comparación con los CST^{+/+}. Así mismo, el desarrollo del modelo de fibrosis pulmonar reflejó que la deficiencia en la expresión del neuropéptido disponía a los animales a sufrir una fibrosis más severa, con mayores alteraciones del parénquima alveolar, infiltraciones leucocitarias, mayores respuestas inflamatorias, edema, depósito de colágeno y mortalidad, probablemente debida a insuficiencia pulmonar. Todos estos hechos ponen en evidencia que la falta de Cortistatina favorece el desarrollo de procesos fibróticos más exacerbados.

En segundo lugar, se ha visto que el empleo de neuropéptidos como Grelina, Somatostatina y sus análogos en el tratamiento de la fibrosis ha mostrado resultados prometedores (159,160,163,164,258–263). Debido a la acción de Cortistatina sobre la fibrosis y a su actividad sobre los receptores tanto de Grelina como de Somatostatina, el potencial papel terapéutico del neuropéptido en las patologías asociadas a fibrosis es muy evidente. En este escenario, analizamos

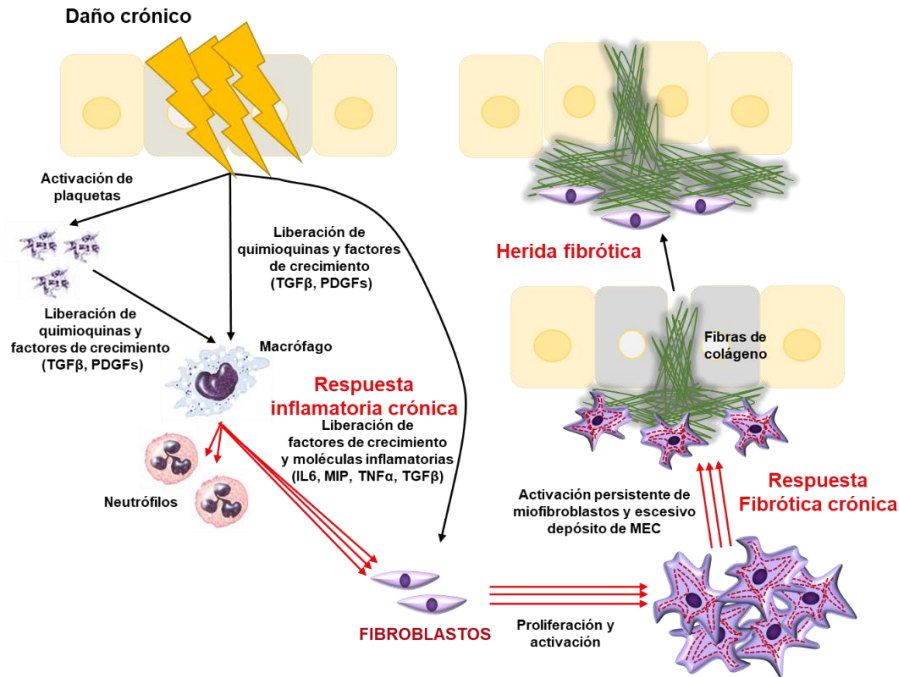
el efecto de la administración de Cortistatina en los modelos fibrosis pulmonar y de esclerodermia en animales $CST^{+/+}$. Reportamos que el tratamiento con Cortistatina, tanto de forma protectora como terapéutica, redujo de forma eficaz la respuesta fibrótica de los ratones expuestos a Bleomicina actuando tanto a nivel del proceso inflamatorio previo como a nivel del proceso fibrótico propiamente dicho. Por tanto, el empleo de Cortistatina como terapia para el tratamiento de patologías crónicas asociadas a fibrosis como son la fibrosis pulmonar idiopática y la esclerodermia emerge como una alternativa muy atractiva y potente. Además, en la actualidad, la pandemia causada por la infección del virus *SARS-CoV-2* y la asociación de la fibrosis pulmonar grave con el mal pronóstico de los pacientes infectados (78) ha puesto en primer plano la necesidad de encontrar alternativas terapéuticas efectivas frente a los procesos fibróticos. Debido al papel inmunomodulador y antifibrótico de Cortistatina, tratamientos basados en el neuropéptido podrían limitar el inicio de la fibrosis pulmonar en pacientes con COVID-19. De hecho, recientemente se ha mostrado la eficacia del empleo de otro neuropéptido inmunomodulador y antifibrótico, el péptido intestinal vasoactivo o Aviptadil (264,265), para el tratamiento no invasivo intranasal de pacientes con COVID-19 con ARDS ((266), ensayo clínico: NCT04311697).

El efecto de Cortistatina observado en los modelos de fibrosis puede deberse a su doble mecanismo de actuación sobre los dos procesos responsables de la patología: el proceso inflamatorio previo y el propio proceso fibrótico (Figura 74b). En primer lugar, estudios previos muestran que Cortistatina regula la respuesta inflamatoria actuando a diferentes niveles de la misma. Por un lado, se sabe que Cortistatina es capaz de actuar sobre la respuesta inmunitaria innata, por medio de los monocitos, macrófagos, microglía y otras células residentes (como las células sinoviales) inhibiendo la liberación de mediadores inflamatorios (como $TNF\alpha$, IL6, IL1 β o IL12, entre otros) y quimioquinas (137,151,153,154). El neuropéptido tiene capacidad para regular la inmunidad adaptativa por medio de la desactivación de la respuesta coestimuladora de los macrófagos y las células dendríticas sobre las células T, limitando la expansión clonal de las células TH1 e inhibiendo la diferenciación de las células TH1 y TH17 (137,151,152,154,155,170). Además, debido a que las células TH1 promueven la secreción de autoanticuerpos por parte de los linfocitos B autorreactivos, así como el depósito de inmunocomplejos y la activación del complemento en el tejido diana, la inhibición de las células TH1 también regula la respuesta de las células B. También se ha reportado que Cortistatina puede favorecer la expansión de las células TH2 y las células T reguladoras, liberadoras de la quimioquina antiinflamatoria IL10 (137,151,152,170). En nuestro estudio corroboramos ese papel inmunomodulador de Cortistatina pues la falta, tanto parcial como total, del neuropéptido dio lugar a procesos inflamatorios acrecentados con una mayor extravasación de células infiltrantes (destacando los macrófagos y neutrófilos), lo que condujo a una mayor producción de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias en el BAL de los ratones. Todo ello favoreció una fisiopatología agravada reflejada en una elevada mortalidad. Por otro lado, el tratamiento con Cortistatina de animales con fibrosis pulmonar redujo significativamente los marcadores inflamatorios, así como la severidad de la patología, poniendo de relieve no sólo el papel endógeno del neuropéptido en inflamación, sino también su efecto terapéutico. Estos hechos se correlacionan, además, con los observados en ratones deficientes en Cortistatina con ALI inducida por administración de LPS, en los cuales se observó una infiltración celular, producción de proteínas y citoquinas proinflamatorias y alteración del parénquima alveolar aumentados en comparación con los ratones con dotación génica normal del neuropéptido (156). Por otro lado, en otro trabajo en el que se estudió el papel de Cortistatina en el proceso inflamatorio asociado a asma se reportó que los animales deficientes para Cortistatina con un modelo de asma inducido

por administración de ovoalbúmina presentaron un proceso inflamatorio exacerbado en comparación con ratones con una expresión normal del neuropéptido. Así, la falta de Cortistatina dio lugar a unos niveles incrementados de células inmunológicas y moléculas proinflamatorias, así como una mayor alteración del parénquima alveolar. Además, en ese mismo estudio mostraron que la quimioquina CCL2, un factor clave para el asma, podía estar regulada por Cortistatina, pues su expresión aumentó en ratones deficientes para el neuropéptido (157). Por otro lado, en ambos estudios, el tratamiento de las distintas patologías con Cortistatina mejoró significativamente los signos de inflamación y daño pulmonar (156,157). Por tanto, en nuestro estudio confirmamos que Cortistatina es capaz de modular la respuesta inflamatoria previa al proceso fibrótico, reduciendo la permeabilidad vascular, la extravasación y activación de macrófagos, neutrófilos y linfocitos, y la liberación de factores proinflamatorios (Figura 74b). Todos estos efectos pueden deberse a una acción autocrina y/o paracrina del propio neuropéptido sobre los macrófagos, los cuales expresan tanto Cortistatina como sus receptores (153,267,268). De hecho, la acción de Cortistatina sobre los macrófagos podría ser la responsable de la infiltración y acción del resto de células inmunomoduladoras. Debido a que el proceso inflamatorio precede al fibrótico, todas estas acciones de Cortistatina sobre la respuesta inflamatoria afectaran al proceso de fibrosis posterior, haciendo que sea menos activo (Figura 74b).

Por otro lado, pese a que la potente acción inmunomoduladora de Cortistatina puede tener importantes efectos en el proceso fibrótico posterior, la evidencia sugiere que Cortistatina puede jugar un importante papel en la regulación directa del proceso de fibrosis (Figura 74b y 75). En este sentido, hemos reportado que Cortistatina también puede actuar de forma directa sobre la propia respuesta fibrótica, pues su carencia favorece la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos α SMA⁺ por medio del incremento de la expresión de factores implicados en el proceso de activación y diferenciación tales como *gdf6* (240), *lum* (246,247), *ptn* (250,251) o *alpl* (243). De hecho, observamos que la expresión endógena de Cortistatina en los fibroblastos CST^{+/+} redujo, tanto a nivel basal como tras su estimulación con TGF β 1, la activación de las vías profibróticas de TGF β - incluidas SMAD 2/3, AKT, p38 y ERK 1/2 - lo que se tradujo en una menor liberación de moléculas profibróticas como CTGF y de componentes de la MEC como el colágeno (Figura 75a y c). Por el contrario, la falta de expresión de Cortistatina favoreció la activación profibrótica de los fibroblastos CST^{+/-} y CST^{-/-} (Figura 75b y d), pues las células carentes en la expresión del neuropéptido presentaron factores relacionados con la síntesis y organización de las fibras de colágeno y con la promoción de procesos fibróticos tales como son *serpine2* (231), *lum* (245,246), *cd55* (238,239) y *ror1*(237). Además, el tratamiento de fibroblastos estimulados con TGF β 1 mediante Cortistatina logró reducir de forma significativa la expresión de marcadores profibróticos como α SMA, CTGF o Colla2, demostrando su efecto antifibrótico directo sobre estas células. Por último, la falta de Cortistatina endógena también modificó la migración de los fibroblastos, probablemente por medio de la alteración en regulación de las vías ERK 1/2, p38 y JNK, tal y como se había reportado anteriormente (167,269).

a. Proceso de inflamación y fibrosis



b. Papel doble de Cortistatina en inflamación y fibrosis

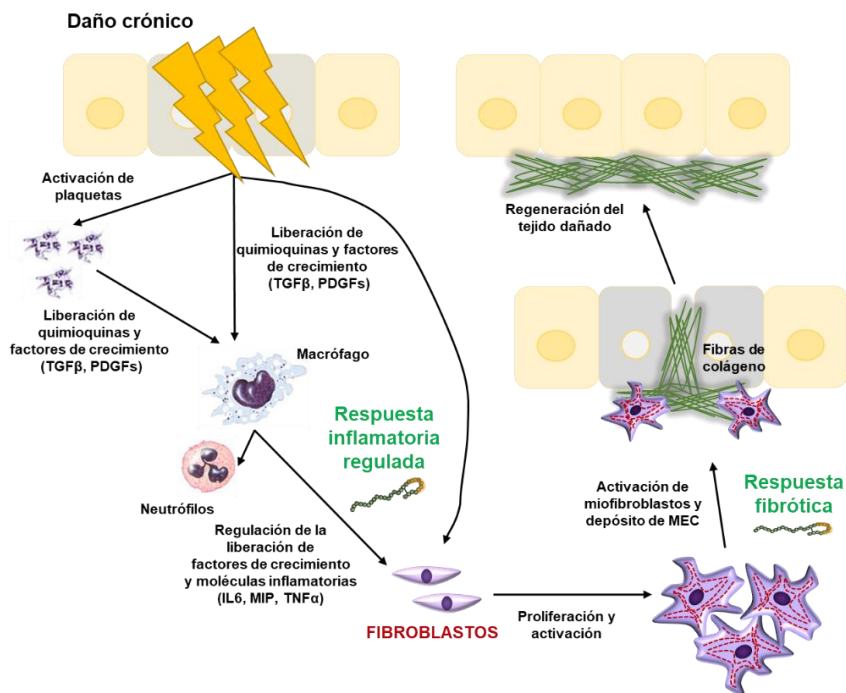
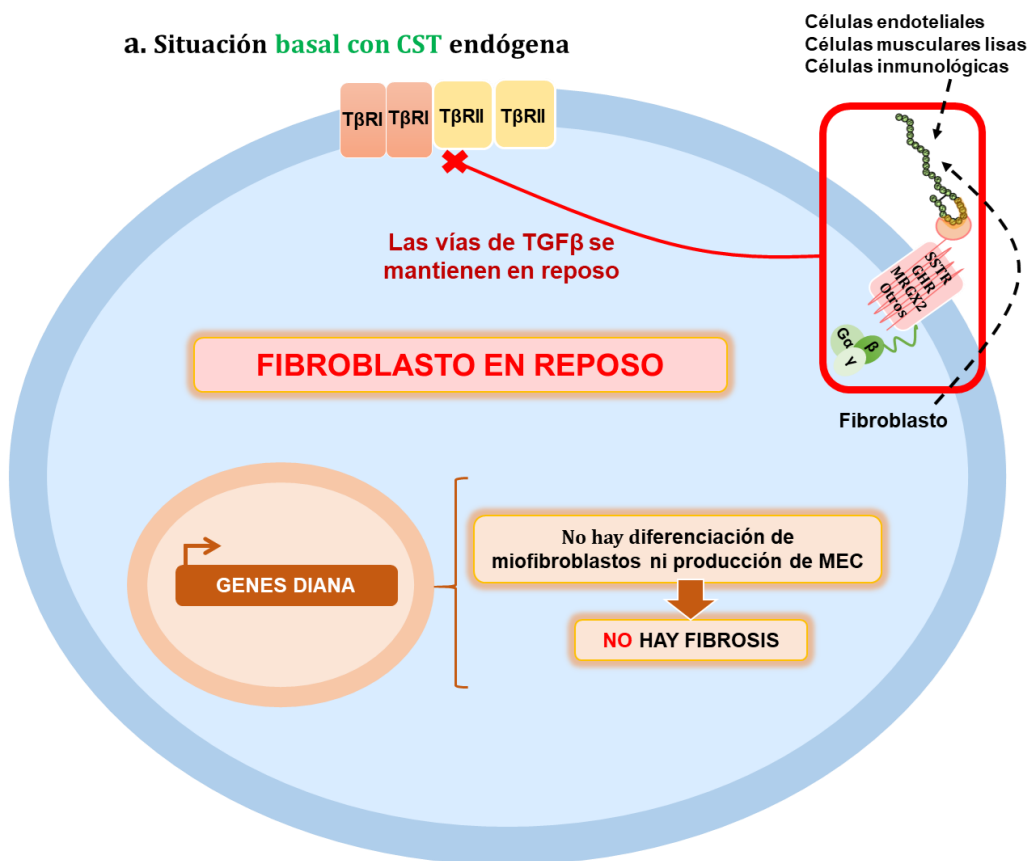


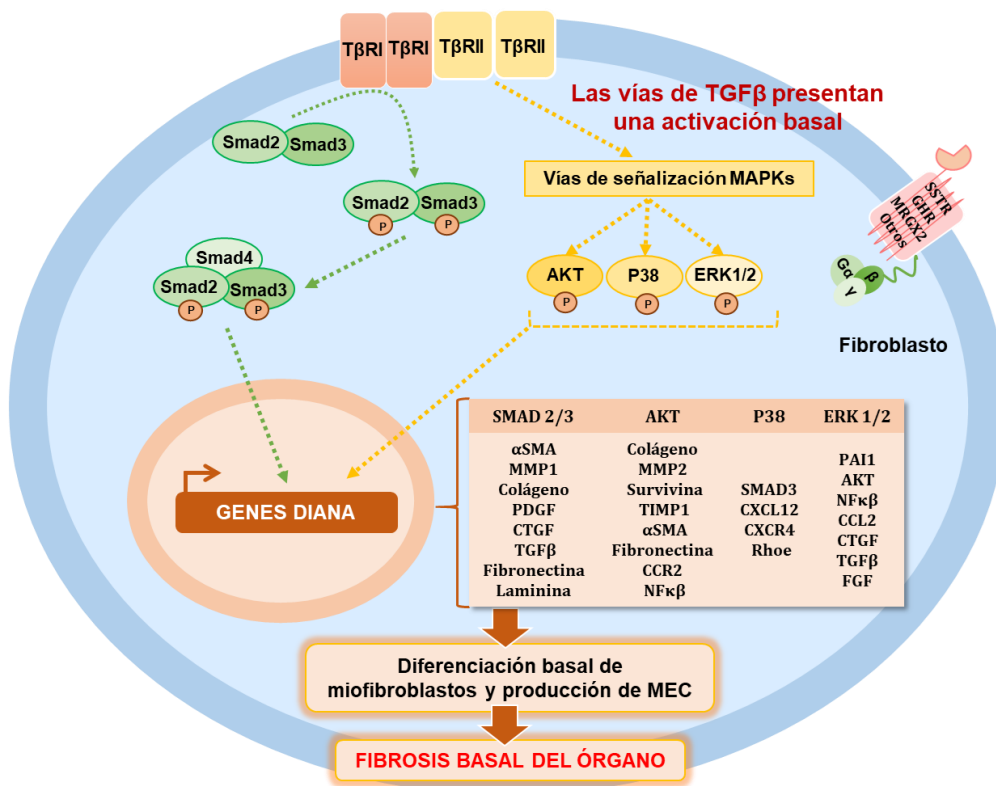
Figura 74. Cortistatina juega un papel doble en inflamación y fibrosis a nivel tisular

Cuando se produce un daño en un tejido se induce una respuesta inflamatoria que favorece el desarrollo de una respuesta fibrótica, con el fin de reparar la lesión. Si este proceso se hace crónico la respuesta inflamatoria se vuelve exacerbada y persistente favoreciendo el desarrollo de una respuesta fibrótica con una activación de los fibroblastos y un depósito de componentes de la MEC que dan lugar, finalmente, a la fibrosis del órgano afectado (a). En este contexto, Cortistatina juega un papel doble, pues regula de forma directa la respuesta inflamatoria disminuyendo la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de los macrófagos y el reclutamiento de neutrófilos y, como consecuencia de esto, favorece la generación de una respuesta fibrótica posterior reducida. Además, Cortistatina actúa sobre los fibroblastos, ejerciendo así una acción directa sobre el propio proceso fibrótico. Como resultado de la acción de Cortistatina, se evita una activación persistente de la respuesta profibrótica, evitando así un depósito excesivo de MEC y la generación de fibrosis, y favoreciendo la regeneración del tejido dañado (b).

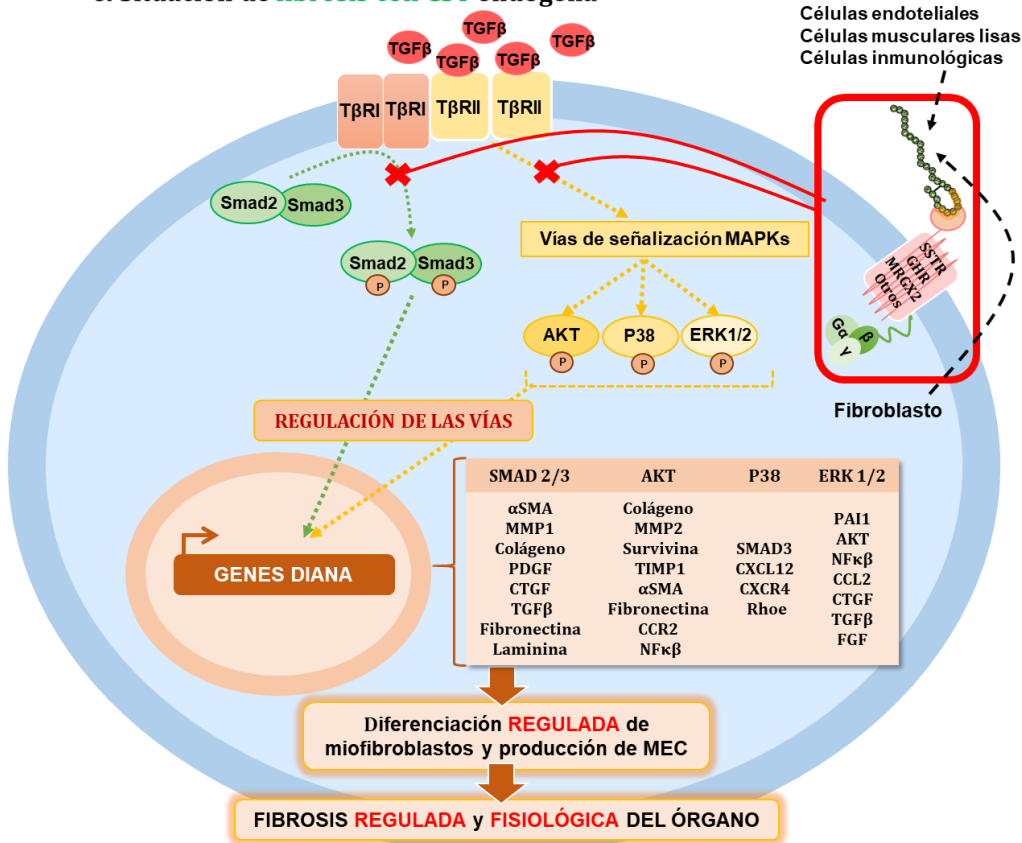
a. Situación basal con CST endógena



b. Situación basal sin CST endógena



c. Situación de fibrosis con CST endógena



d. Situación de fibrosis sin CST endógena

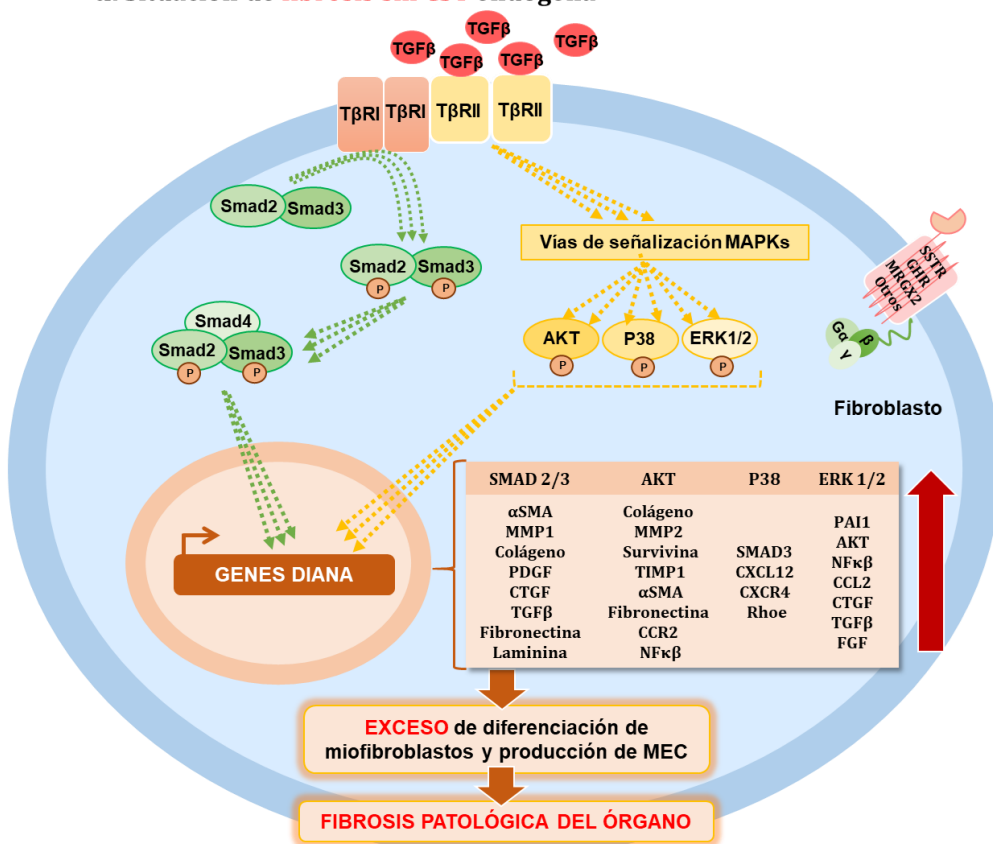


Figura 75. Cortistatina endógena regula la activación de los fibroblastos y el proceso fibrótico

a) En una situación sin fibrosis en la que hay expresión de Cortistatina, los fibroblastos se encuentran en reposo de forma que no producen moléculas de la MEC y no se genera la fibrosis del órgano. **b)** Por su parte, cuando hay deficiencia en la expresión de Cortistatina los fibroblastos presentan una activación basal de las vías de TGF β , dando lugar a una diferenciación hacia miofibroblastos y la producción de MEC. Por tanto, la carencia de Cortistatina a nivel basal predispone a una activación de los fibroblastos y un fenotipo profibrótico. **c)** Cuando se genera un daño en un tejido, la expresión de moléculas profibróticas como TGF β activa vías (tales como las vías de SMAD 2/3, AKT, p38 y ERK 1/2) las cuales inducen la expresión de factores de crecimiento profibróticos (CTGF, PDGF, FGF, TGF β) y la expresión de genes relacionados con la diferenciación del fibroblasto a miofibroblasto (α SMA, Rho, CXCL12, CXCR4), la producción de MEC (colágeno, fibronectina, PAI1, MMP1, MMP2, TIMP1, laminina), la supervivencia celular (survivalina, NF- κ B) y la migración (CCL2, TIMP1, MMP2, CCR2). La acción de Cortistatina (expresada por parte tanto de las células inmunológicas, endoteliales y musculares lisas como por parte de los propios fibroblastos) sobre los receptores expresados en la superficie de los fibroblastos, regula la activación de las vías de señalización de TGF β , impidiendo la expresión aberrante de los genes anteriormente nombrados y regulando así la activación y diferenciación de los fibroblastos. Como consecuencia de esto, se produce una síntesis adecuada de moléculas de la MEC que permite la cicatrización de la herida. **d)** La falta de Cortistatina endógena, ya sea parcial o total, predispone a una mayor activación de las vías profibróticas, hecho que tiene como consecuencia un exceso en la activación y diferenciación de los miofibroblastos y de depósito de componentes de la MEC, dando como resultado la fibrosis patológica del órgano afectado.

Como consecuencia de la acción directa de Cortistatina sobre los fibroblastos, la fibrosis tisular observada tanto a nivel pulmonar como dérmico se redujo de forma significativa, disminuyendo el depósito de MEC, la pérdida de la estructura y funcionalidad orgánicas y la mortalidad de los animales. Tal y como ocurría con los macrófagos, este efecto de Cortistatina podría estar mediado de forma autocrina y/o paracrina, pues hemos corroborado que los fibroblastos expresan tanto Cortistatina como sus receptores (Figura 75), tal y como se había reportado previamente (159,263,270). Curiosamente, al igual que lo que ocurría a nivel tisular, la expresión por parte de los fibroblastos de Cortistatina y del receptor SSTR4 se vio significativamente disminuida en situación de fibrosis. Por otro lado, se ha reportado que Cortistatina es expresada por otras células implicadas en fibrosis tales como las células endoteliales, las células musculares lisas y las células del sistema inmunológico (132). Por tanto, el efecto, aparentemente contradictorio, de la disminución de la expresión de Cortistatina en tejidos fibróticos a los que están llegando células que expresan el neuropéptido podría explicarse por el hecho de que la activación de los fibroblastos reduce la producción de Cortistatina. Por su parte, el bloqueo de los receptores de Cortistatina mediante el uso de antagonistas inhibió el efecto antifibrótico del neuropéptido, favoreciendo el desarrollo de fibrosis y confirmando la acción del neuropéptido por medio de los mismos.

Es interesante señalar que el empleo de Cortistatina a nivel clínico ya ha sido probado, lo que supone un antecedente y una garantía segura para su uso en terapia. En este sentido, Cortistatina ha sido empleada para el tratamiento de pacientes con acromegalia, en los cuales inhibió la secreción de hormona del crecimiento de forma significativa. Además, la administración de Cortistatina a pacientes con prolactinoma también redujo de forma importante la producción de la prolactina (271). Así mismo, el tratamiento con Cortistatina de pacientes con síndrome de Cushing redujo la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y la liberación de ACTH y cortisol sin ningún efecto secundario (272).

Como se comentó previamente, un aspecto destacable es que la deficiencia parcial de Cortistatina parece predisponer a un individuo a padecer un proceso de fibrosis más exacerbado, por lo que el análisis de los niveles del neuropéptido podría emplearse para determinar la susceptibilidad frente a la fibrosis. Por un lado, este hecho permitiría emplear a Cortistatina como

un biomarcador eficaz frente a la fibrosis. Este aspecto es especialmente interesante pues pese a que el desarrollo de las técnicas bioinformáticas ha permitido determinar conjuntos de genes diferencialmente expresados entre individuos sanos y pacientes con patologías fibróticas como es la esclerodermia, así como determinar diferencias de expresión entre distintos subgrupos de los propios pacientes (273,274), actualmente aún es necesario hallar biomarcadores específicos capaces de determinar la predisposición de un individuo a padecer patologías asociadas a fibrosis, como podría ser Cortistatina. En este sentido, tanto para esclerodermia como para la fibrosis pulmonar idiopática, los biomarcadores propuestos hasta la actualidad han sido principalmente citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y moléculas asociadas a la MEC (115,117). Sin embargo, pese a que en estas patologías aún no se ha estudiado si existe una deficiencia en Cortistatina, a nivel hepático sí se ha encontrado que la expresión del neuropéptido se reduce de forma significativa en situación de fibrosis y cirrosis, estableciéndose así una relación inversa entre los niveles de Cortistatina y los procesos fibróticos. De hecho, la deficiencia en Cortistatina favorece la activación y transformación de las células estrelladas hepáticas a miofibroblastos α SMA⁺, lo que explicaría la relación entre la falta del neuropéptido y el fenotipo profibrótico (275).

Por otro lado, nuestro estudio confirma que el tratamiento con el neuropéptido podría corregir una deficiencia en Cortistatina y mejorar la progresión de la enfermedad. Pese a que aún no se conocen bien las causas por las cuales fluctúan los niveles de Cortistatina, es importante señalar que el ser humano puede sufrir una delección del brazo pequeño del cromosoma 1 (síndrome de monosomía 1.36p), en el cual se sitúa el gen de Cortistatina (1p36.22). Esta pérdida cromosómica terminal es la más común en el hombre (1 de cada 5000 casos) y genera una serie de síntomas tales como el retraso en el desarrollo y la capacidad intelectual, alteraciones cerebrales, rasgos faciales típicos, hipotonía, alteración de la visión y anomalías en diversos órganos, como fibrosis cardíaca y miocardiopatía (276).

Por otra parte, es interesante resaltar la implicación de Bleomicina en los modelos de fibrosis inducidos en nuestro estudio. Bleomicina es un antibiótico empleado de forma frecuente como antineoplásico en varios tipos de tumores, como tumores de células germinales, linfomas, sarcoma de Kaposi, cáncer de cuello uterino y carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (277). De los pacientes que reciben Bleomicina como tratamiento entre un 3 y un 40% desarrollan una neumonitis pulmonar intersticial y en torno al 3-5% de los casos la neumonitis progresa a fibrosis pulmonar (278,279). Además, un síntoma frecuente en el tratamiento con Bleomicina son las alteraciones a nivel dérmico, generando cambios similares a los de la esclerodermia (280). Por tanto, entender que la deficiencia de un factor endógeno como Cortistatina puede predisponer a esos efectos adversos podría ayudar a seleccionar la quimioterapia correcta o a tratar de corregir las terapias escogidas por medio de tratamientos basados en el empleo de Cortistatina.

En la figura 76 se muestra un resumen general del efecto de Cortistatina, tanto endógena como exógena, en los procesos de inflamación y fibrosis:

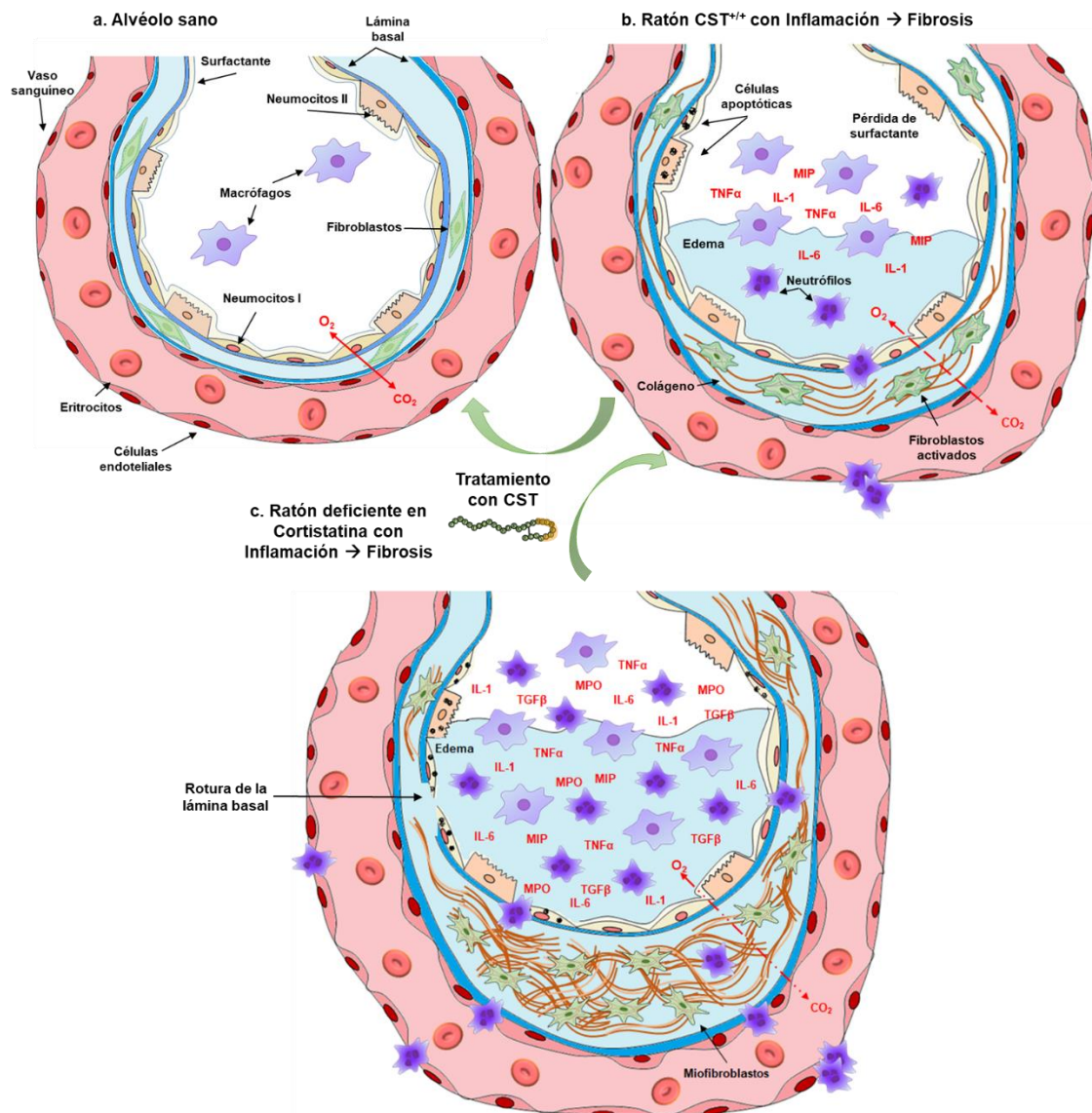


Figura 76. Resumen del efecto de Cortistatina en los procesos de inflamación y fibrosis pulmonar

a) Se muestra un alvéolo pulmonar sano conformado por los neumocitos tipo I, cuya función principal es el intercambio de gases; y los neumocitos tipo II, cuya función es mantener el espacio alveolar mediante la secreción de proteínas tensioactivas y otros componentes de la MEC. Además, el alvéolo presenta macrófagos residentes encargados de mantener la homeostasis y de producir moléculas proinflamatorias y reclutar células inmunológicas en el caso de que se produjera una agresión al parénquima alveolar. Situada entre la lámina basal alveolar y la endotelial se encuentra una matriz de tejido conjuntivo con fibroblastos residentes. **b)** Cuando se genera un daño en el tejido, ya sea producido por infecciones (ej: toxinas bacterianas como el LPS) o por agentes químicos (ej: Bleomicina) se produce la activación de los macrófagos residentes los cuales liberan citoquinas proinflamatorias (TNF α , MIP, IL1, IL6) que favorecen la llegada de neutrófilos y la generación de una cascada inflamatoria. Si esta respuesta proinflamatoria se vuelve exagerada, se generan especies reactivas de oxígeno que dañan a las células epiteliales alveolares, las cuales entran en apoptosis, dañando la barrera alveolar-capilar y favoreciendo el desarrollo de edema pulmonar e hipoxia. Además, estas citoquinas y factores de crecimiento tales como TGF β , activan a los fibroblastos residentes, los cuales liberan moléculas de la MEC con el fin de reparar el tejido, generando una cicatriz que dificulta aún más el intercambio gaseoso. **c)** Debido al papel doble de Cortistatina sobre la inflamación y la fibrosis, su deficiencia, ya sea parcial o total, predispone a sufrir unos procesos exacerbados. De esta manera, la falta del neuropéptido favorece una sobre-activación de los macrófagos y una extravasación aumentada de los neutrófilos, generando una tormenta de citoquinas proinflamatorias, que dan lugar a un edema aumentado y persistente y a una alteración alveolar. Además, este proceso inflamatorio induce una respuesta profibrótica en la cual los fibroblastos se convierten en miofibroblastos α SMA⁺, con enorme capacidad de producción de moléculas de la MEC y capacidad contráctil, que

provocarán la cicatrización de todo el parénquima alveolar, impidiendo la reabsorción del edema y provocando insuficiencias respiratorias de elevada gravedad. El tratamiento con Cortistatina de los ratones que padecen estos procesos inflamatorios/fibróticos les permite adquirir un fenotipo menos agresivo, pues el neuropéptido ejerce un papel inmunomodulador directo sobre los macrófagos, así como un papel antifibrótico directo debido a su acción sobre los fibroblastos.

Finalmente, pese a que Cortistatina tiene un evidente efecto terapéutico y podría ser considerada como un posible tratamiento en patologías asociadas a fibrosis crónica, desde el punto de vista clínico su uso podría suponer una serie de inconvenientes: 1) una baja estabilidad y vida media debido a la acción de enzimas peptidasas, hecho que implica una administración frecuente de dosis relativamente elevadas; y 2) la potencial aparición de efectos pleiotrópicos como consecuencia de dichas administraciones y de la distribución de sus receptores en el organismo. Debido a ello se han desarrollado diversas estrategias para aumentar la vida media de las moléculas empleadas como tratamiento, así como la especificidad de su acción: la encapsulación de los principios activos en nanopartículas, el empleo de vectores virales, la generación de biopolímeros basados en elastina, la generación de prodrogas, etc (172,175,177,178,281). Entre las diferentes estrategias se encuentra el empleo de péptidos cuya secuencia es modificada con el fin de generar moléculas con mayor estabilidad y/o actividad. En este sentido es de destacar el trabajo realizado por nuestro grupo (282) en el cual, basándose en el estudio de la estructura de Cortistatina por resonancia magnética nuclear y los antecedentes sobre los análogos de Somatostatina, generaron un análogo de Cortistatina-14 cuya vida media fue 10,5 veces mayor a la de molécula original. Además, en estudios *in vitro* el análogo mostró actividad antiinflamatoria pues fue capaz de reducir de forma importante la producción de los mediadores inflamatorios por parte de macrófagos murinos, así como la respuesta proliferativa de células de bazo murinas, tras su activación con LPS. Además, en dos modelos experimentales *in vivo* de enfermedad inflamatoria intestinal inducidos por la administración oral de dextrano sulfato sódico y por infusión intrarrectal de ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico, la administración del análogo de Cortistatina tanto al inicio de los modelos (punto de vista protector) como una vez que hubieron progresado (punto de vista terapéutico) mostró una reducción muy significativa los signos clínicos y una mejora de la supervivencia. De hecho, los tratamientos con el análogo de Cortistatina mostraron una eficacia mayor que la observada en las terapias de referencia empleadas en las enfermedades inflamatorias intestinales hasta el momento. Por otro lado, una característica importante derivada del desarrollo de la vehiculización de los principios activos es la posibilidad que aporta a la hora de poderlos proteger intelectualmente en forma de patentes. Esto es muy interesante, pues desde el punto de vista farmacéutico y empresarial la patente supone una importante ventaja competitiva y convierte a la terapia desarrollada en una herramienta muy atractiva para su uso y comercialización.

Teniendo todos estos aspectos en cuenta, desarrollamos mediante ingeniería genética una molécula latente de Cortistatina basada en la secuencia LAP de TGF β . El uso de esta aproximación para mejorar la estabilidad y biodisponibilidad de la molécula de Cortistatina es especialmente interesante si se tiene en cuenta que estamos partiendo de un péptido recombinante basado en un mecanismo de latencia asociado a fibrosis existente en la naturaleza y que, además, tiene la ventaja de presentar un modo de escisión y liberación del péptido activo que le confiere especificidad de acción. Los estudios *in vivo* sobre la funcionalidad de la molécula latente tuvieron resultados muy prometedores. Así, el empleo de la molécula de Cortistatina latente en ratones CST^{+/+} con fibrosis pulmonar y esclerodermia fue capaz de reducir y frenar el proceso fibrótico de forma significativa. En este sentido, los animales tratados vieron reducido el grado de la lesión pulmonar con la consiguiente recuperación de la supervivencia, así como una disminución del

grosor de la piel, en una magnitud similar a los animales que fueron tratados con la molécula comercial, reduciéndose de forma muy significativa las dosis y el número de administraciones necesarias para igualar dicha eficacia. Una razón que puede explicar esta elevada efectividad del tratamiento con la molécula latente se encuentra en que la estructura LAPL1MMPL2 actúa como un escudo molecular protegiendo de forma eficaz a la molécula de Cortistatina, evitando su degradación y permitiendo además su liberación y acción en el foco fibrótico, rico en MMPs. Este hecho pone de manifiesto que el tratamiento con Cortistatina latente no sólo es efectivo si no que es capaz de superar el principal inconveniente del tratamiento con la molécula de Cortistatina comercial: su corta vida media en suero debido a su rápida degradación. Por tanto, mediante el desarrollo de esta estrategia hemos conseguido mejorar la estabilidad de la molécula, lo que a su vez ha permitido utilizar dosis sustancialmente menores para emplearla como tratamiento efectivo frente a fibrosis. Desde el punto de vista clínico, la molécula de Cortistatina latente supondría una gran ventaja ya que, por un lado, permitiría focalizar la acción de Cortistatina en el sitio de daño tisular y, por otro, permitiría que los pacientes fuesen tratados con menos dosis, reduciéndose al mínimo los posibles efectos secundarios derivados de la actuación pleiotrópica del neuropéptido (no observados por el momento en los animales de estudio). Por otro lado, pese a los resultados obtenidos, sería necesario realizar más ensayos en otros modelos animales con el fin de validar la eficacia de la molécula, empleando las mismas dosis de Cortistatina comercial y latente para poder comparar de forma inequívoca el efecto de ambos tratamientos. Finalmente, reportamos que el tratamiento de ratones con fibrosis pulmonar con las proteínas LAPCST y LAPL1L2CST no presentaron efectos terapéuticos. Los resultados obtenidos indicarían que el sitio de corte para MMPs es una condición fundamental para que Cortistatina latente se active en el sitio de inflamación y que la sola presencia de los *linkers* sin el sitio MMPs no es una condición suficiente para que el neuropéptido se active. Sin este sitio de corte, Cortistatina no podría liberarse en su forma nativa impidiéndose así su interacción con los receptores. Además, debido al ambiente rico en enzimas MMPs que se genera en los tejidos con fibrosis, la presencia de la secuencia de corte de las MMPs en la molécula latente de Cortistatina permitiría dirigir su acción de forma específica a los tejidos fibróticos.

En conjunto, todos estos resultados ponen de manifiesto que la falta del neuropéptido Cortistatina predispone a presentar un genotipo y un fenotipo más profibrótico, por lo que Cortistatina surge como un potente freno a la fibrosis y su deficiencia como un posible biomarcador de mal pronóstico de la misma. Además, este estudio demuestra la eficacia de las terapias basadas en el uso de Cortistatina y sus análogos, emergiendo como alternativas muy atractivas para el tratamiento de enfermedades crónicas para las que aún no existe solución desde un punto de vista clínico.

6. CONCLUSIONES

1. Existe una correlación inversa entre la expresión de Cortistatina y la respuesta fibrogénica. Así, los niveles de Cortistatina en piel y pulmón disminuyen en modelos experimentales de fibrosis pulmonar y esclerodermia inducidos con Bleomicina y en fibroblastos dérmicos y pulmonares estimulados con el agente profibrótico TGF β 1.
2. La deficiencia de Cortistatina predispone a sufrir procesos inflamatorios y fibróticos más exacerbados en modelos experimentales de fibrosis pulmonar y esclerodermia inducidos con Bleomicina:
 - i. En el modelo de fibrosis pulmonar, la falta total o parcial de Cortistatina endógena aumenta la permeabilidad vascular, la extravasación y activación de las células inmunitarias (principalmente macrófagos y neutrófilos) y la liberación de factores proinflamatorios, dando lugar a un edema persistente y a una respuesta inflamatoria pulmonar temprana hiperactivada. Por otro lado, la deficiencia en Cortistatina endógena favorece el desarrollo de una fibrosis pulmonar más severa, con una mayor expresión de marcadores asociados a fibrosis (colágeno, α SMA y CTGF) y aumento de miofibroblastos activados, lo que se traduce en un incremento significativo en la severidad de la lesión pulmonar y en la tasa de mortalidad.
 - ii. En el modelo de esclerodermia, la falta total o parcial de Cortistatina endógena exagera los signos patológicos de la lesión dérmica, con un mayor engrosamiento de la dermis y epidermis, aumento del depósito de colágeno y de la expresión de marcadores fibróticos en la dermis e incremento significativo en la infiltración inflamatoria subdérmica. Además, la deficiencia en Cortistatina predispone a padecer fibrosis pulmonar severa asociada al desarrollo de esclerodermia, con una alteración significativa del parénquima alveolar y una mayor tasa de mortalidad.
3. Cortistatina actúa como un freno molecular endógeno de la fibrosis incidiendo directamente en el fibroblasto. Así, los fibroblastos pulmonares deficientes en Cortistatina muestran una hiperactivación de las vías profibróticas canónica-clásica mediada por SMAD 2/3 y no canónica mediada por las MAPKs ERK 1/2, p38 y AKT. Todo ello favorece el desarrollo de un fenotipo profibrótico en fibroblastos deficientes en Cortistatina, su diferenciación hacia miofibroblastos α SMA⁺ y la producción de moléculas de la MEC, aún en ausencia de estimulación fibrogénica con TGF β 1. Por el contrario, el tratamiento con Cortistatina de fibroblastos pulmonares estimulados con TGF β 1 disminuye la expresión de varios marcadores fibróticos.
4. El tratamiento temprano con Cortistatina de la fibrosis pulmonar experimental inducida con Bleomicina disminuye el edema pulmonar, la extravasación de células inmunológicas y los niveles de citoquinas y quimioquinas inflamatorias en el pulmón, lo que se traduce en una protección del desarrollo subsiguiente de la lesión pulmonar y la muerte debida a fallo pulmonar. Estos resultados apoyan un efecto de Cortistatina sobre la respuesta inflamatoria temprana que ocurre inmediatamente después de producirse el daño pulmonar.
5. El tratamiento tanto local como sistémico con Cortistatina, siguiendo un régimen terapéutico una vez establecida la respuesta inflamatoria pulmonar, reduce significativamente la mortalidad, la severidad de las lesiones fibróticas pulmonares y la expresión de marcadores fibrogénicos en animales sometidos a fibrosis pulmonar inducida con Bleomicina. Además, la administración de Cortistatina exógena revierte el fenotipo fibrótico exacerbado que muestran los ratones deficientes para el neuropéptido y protege de la muerte provocada por la exposición

- a Bleomicina en los mismos. Estos resultados apoyan un efecto directo de Cortistatina sobre la respuesta fibrogénica en el pulmón.
6. El tratamiento con Cortistatina en un modelo experimental de esclerodermia inducida por inyección intradérmica de Bleomicina reduce los signos patológicos de la enfermedad en la piel (engrosamiento dérmico, depósito de colágeno e infiltración inflamatoria), y evita la aparición de fibrosis pulmonar secundaria a la lesión cutánea.
 7. La administración intranasal de antagonistas de los receptores de Somatostatina y Grelina evitan la acción terapéutica de Cortistatina en el modelo experimental de fibrosis pulmonar inducida con Bleomicina. Estos resultados implican la participación de ambos receptores en el efecto antifibrótico de Cortistatina.
 8. La molécula latente de Cortistatina, LAPL1MMPL2CST, basada en la incorporación de un escudo molecular y un elemento de liberación controlado por metaloproteinasas muestra efectos terapéuticos en fibrosis pulmonar y esclerodermia con una elevada eficacia en comparación con el tratamiento con la molécula de Cortistatina comercial.

REFERENCIAS

1. Wynn T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008;214(2):199–210.
2. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2013;18(7):1028–40.
3. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest.* 2007;117(3):524–9.
4. Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, Violette S. Therapy for fibrotic diseases: Nearing the starting line. *Sci Transl Med.* 2013;5(167):167sr1.
5. Weiskirchen R, Weiskirchen S, Tacke F. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Mol Aspects Med.* 2019;65:2–15.
6. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis — A Common Pathway to Organ Injury and Failure. *N Engl J Med.* 2015;372(12):1138–49.
7. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med.* 2011;208(7):1339–50.
8. López A, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Rev Esp Cardiol.* 2013;13(B):2–7.
9. Chen DQ, Feng YL, Cao G, Zhao YY. Natural Products as a Source for Antifibrosis Therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2018;39(11):937–52.
10. Wynn TA. Fibrotic Disease and the TH1/TH2 Paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2009;4(8):583–94.
11. Varga J, Denton CP, Wigley FM. Mechanism of Fibrosis. In: *Scleroderma: From Pathogenesis to Comprehensive Management.* Springer Science+Business Media LLC; 2012. p. 1–689.
12. Weiskirchen R, Weiskirchen S, Tacke F. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Mol Aspects Med.* 2019 Feb;65:2–15.
13. Marinovic MA. Inflammation, damage and repair in rheumatic diseases. *Medwave.* 2008;8(6):e502.
14. Trojanowska M, Varga J. Molecular pathways as novel therapeutic targets in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2007;19(6):568–73.
15. Carlos RA, Carina BB, G. CLJ, Martha MR. El miofibroblasto, una célula multifuncional en la patología pulmonar. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2004;17(3):215–31.
16. Bainbridge P. Wound healing and the role of fibroblasts. *J Wound Care.* 2013;22(8):407–12.
17. Kendall RT, Carol A. Feghali-Bostwick. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol.* 2014;5:1–14.
18. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2014;7:301–11.
19. Friedman SL. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol Rev.* 2008;88(1):125–72.

Referencias

20. Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;121:27–42.
21. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G. The Myofibroblast. *Am J Pathol.* 2007;170(6):1807–16.
22. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(5):349–63.
23. Hinz B. Masters and servants of the force: The role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. *Eur J Cell Biol.* 2006;85(3–4):175–81.
24. Dugina V, Fontao L, Chaponnier C, Vasiliev J, Gabbiani G. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *J Cell Sci.* 2001;114(18):3285–96.
25. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell.* 2001;12(9):2730–41.
26. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113(6):685–700.
27. Kubiczкова L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF- β – an excellent servant but a bad master. *J Transl Med.* 2012;10(1):183.
28. Fernandez IE, Eickelberg O. The impact of TGF- β on lung fibrosis: From targeting to biomarkers. *Proc Am Thorac Soc.* 2012;9(3):111–6.
29. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12(6):325–38.
30. Prieto M, Rivas J V., Novoa JML, Pérez-Barriocanal F. El TGF- β : síntesis y mecanismo de acción. *Nefrología.* 2002;22(2):135–43.
31. Lafyatis R. Transforming growth factor β - At the centre of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(12):706–19.
32. Fabregat I, Caballero-Díaz D. Transforming growth factor- β -induced cell plasticity in liver fibrosis and hepatocarcinogenesis. *Front Oncol.* 2018;8:357.
33. Poniatowski LA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D. Transforming growth factor beta family: Insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:13782.
34. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors.* 2011;29(5):196–202.
35. Penttinen RP, Kobayashi S, Bornstein P. Transforming growth factor β increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(4):1105–8.
36. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of transforming growth factor- β by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res.* 2004;296(2):89–93.
37. Rosenbloom J, Edward Macarak, Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Human Fibrotic Diseases: Current Challenges in Fibrosis Research. In: Rittié L, editor. *Fibrosis: Methods and Protocols*,

- Methods in Molecular Biology. Springer Science+Business Media LLC; 2017. p. 1–23.
38. Ramazani Y, Knops N, Elmonem MA, Nguyen TQ, Arcolino FO, van den Heuvel L, et al. Connective tissue growth factor (CTGF) from basics to clinics. *Matrix Biol.* 2018;68–9, 44–66.
 39. Sakai N, Nakamura M, Lipson KE, Miyake T, Kamikawa Y, Sagara A, et al. Inhibition of CTGF ameliorates peritoneal fibrosis through suppression of fibroblast and myofibroblast accumulation and angiogenesis. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–13.
 40. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, et al. Serum levels of CTGF are elevated in patients with systemic sclerosis association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol.* 2000;27:49–15.
 41. Makino K, Makino T, Stawski L, Lipson KE, Leask A, Trojanowska M. Anti-connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) monoclonal antibody attenuates skin fibrosis in mice models of systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):1–10.
 42. Asano Y. Future treatments in systemic sclerosis. *J Dermatol.* 2010;37(1):54–70.
 43. Leask A. CCN2 in Skin Fibrosis. In: Takigawa M, editor. *CCN Proteins: Methods and Protocols* M. New York: Springer Science+Business Media New; 2017. p. 417–21.
 44. Betsholtz C. Biology of Platelet-Derived Growth Factors in Development. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev.* 2003;69(4):272–85.
 45. Boor P, Ostendorf T, Floege J. PDGF and the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29:45–54.
 46. Ruiz-ortega M, Rayego-mateos S, Lamas S, Ortiz A, Rodrigues-diez RR. Targeting the progression of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16(5):269–88.
 47. Andrews JP, Marttala J, Macaraka E, Rosenbloom J, Uitto J. Keloids: The paradigm of skin fibrosis – pathomechanisms and treatment. *Matrix Biol.* 2016;51:37–46.
 48. Agostini C, Gurrieri C. Chemokine/cytokine cocktail in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(4):357–63.
 49. Abdollahi A, Li M, Ping G, Plathow C, Domhan S, Kiessling F, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. *J Exp Med.* 2005;201(6):925–35.
 50. Bi J, Ge S. Potential roles of BMP9 in liver fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2014;15(11):20656–67.
 51. Murphy AM, Wong AL, Bezuhly M. Modulation of angiotensin II signaling in the prevention of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2015;8(1):1–7.
 52. Schnee JM, Hsueh WA. Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res.* 2000;46:264–8.
 53. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension.* 2001;38:635–8.
 54. Serlin DM, Kuang PP, Subramanian M, O'Regan A, Li X, Berman JS, et al. Interleukin-1 β induces osteopontin expression in pulmonary fibroblasts. *J Cell Biochem.* 2006;97(3):519–29.
 55. Mathai SK, Gulati M, Peng X, Russell TR, Shaw AC, Rubinowitz AN, et al. Circulating monocytes from systemic sclerosis patients with interstitial lung disease show an enhanced profibrotic phenotype. *Lab Investig.* 2010;90(6):812–23.

Referencias

56. Gharaee-Kermani M, McGarry B, Lukacs N, Huffnagle G, Egan RW, Phan SH. The role of IL-5 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Leukoc Biol.* 1998;64(5):657–66.
57. Fallon PG, Richardson EJ, McKenzie GJ, McKenzie ANJ. Schistosome Infection of Transgenic Mice Defines Distinct and Contrasting Pathogenic Roles for IL-4 and IL-13: IL-13 Is a Profibrotic Agent. *J Immunol.* 2000;164(5):2585–91.
58. Liu JY, Brass DM, Hoyle GW, Brody AR. TNF- α receptor knockout mice are protected from the fibroproliferative effects of inhaled asbestos fibers. *Am J Pathol.* 1998;153(6):1839–47.
59. Wei J, Bhattacharyya S, Tourtellotte WG, Varga J. Fibrosis in systemic sclerosis: Emerging concepts and implications for targeted therapy. *Autoimmun Rev.* 2011;10(5):267–75.
60. Cui A, Anhenn O, Theegarten D, Ohshimo S, Bonella F, Sixt SU, et al. Angiogenic and angiostatic chemokines in idiopathic pulmonary fibrosis and granulomatous lung disease. *Respiration.* 2010;80(5):372–8.
61. Schulz JN, Plomann M, Sengle G, Gullberg D, Krieg T, Eckes B. New developments on skin fibrosis - Essential signals emanating from the extracellular matrix for the control of myofibroblasts. *Matrix Biol.* 2018;68–69(2017):522–32.
62. Pakyari M, Farrokhi A, Maharlooei MK, Ghahary A. Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Adv Wound Care.* 2013;2(5):215–24.
63. Lakatos HF, Thatcher TH, Kottmann RM, Garcia TM, Phipps RP, Sime PJ. The role of PPARs in lung fibrosis. *PPAR Res.* 2007;2007:71323.
64. Genovese T, Mazzon E, Di Paola R, Muià C, Crisafulli C, Caputi AP, et al. Role of endogenous and exogenous ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor α in the development of bleomycin-induced lung injury. *Shock.* 2006;24(6):547–55.
65. Horn A, Palumbo K, Cordazzo C, Dees C, Akhmetshina A, Tomcik M, et al. Hedgehog signaling controls fibroblast activation and tissue fibrosis in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(8):2724–33.
66. Lavozy C, Poveda J, Marquez-Exposito L, Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez RR, Ortiz A, et al. Gremlin activates the Notch pathway linked to renal inflammation. *Clin Sci (Lond).* 2018;132(11):1097–115.
67. Piera-Velazquez S, Mendoza F, Jimenez S. Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases. *J Clin Med.* 2016;5(1):22.
68. Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, Raghu G, Richeldi L, Selman M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3:1–20.
69. Camelo A, Dunmore R, Sleeman MA, Clarke DL. The epithelium in idiopathic pulmonary fibrosis: Breaking the barrier. *Front Pharmacol.* 2014;4:1–11.
70. Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch III JP, Martinez FJ. Mechanisms of Pulmonary Fibrosis. *Annu Rev Med.* 2004;55(1):395–417.
71. Richeldi L, Collard HR, Jones MG. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet.* 2017;389(10082):1941–52.
72. Upagupta C, Shimbori C, Alsilmi R, Kolb M. Matrix abnormalities in pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev.* 2018;27(148).

Referencias

73. Glassberg MK. Overview of idiopathic pulmonary fibrosis, evidence-based guidelines, and recent developments in the treatment landscape. *Am J Manag Care*. 2019;25(11):S195–203.
74. Smith ML. Update on pulmonary fibrosis: Not all fibrosis is created equally. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(3):221–9.
75. Ware L, Matthay M. The Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*. 2000;1334.
76. B. Taylor Thompson, M.D., Rachel C. Chambers, Ph.D., and Kathleen D. Liu, M.D. PD. Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*. 2017;377.
77. Gentile F, Aimo A, Forfori F, Catapano G, Clemente A, Cademartiri F, et al. COVID-19 and risk of pulmonary fibrosis: the importance of planning ahead. *Eur J Prev Cardiol*. 2020;27(13):1442–6.
78. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*. 2020;395(10229):1033–4.
79. Spagnolo P, Balestro E, Aliberti S, Cocconcelli E, Biondini D, Casa G Della, et al. Pulmonary fibrosis secondary to COVID-19: a call to arms? *Lancet Respir Med*. 2020;8(8):750–2.
80. Wakwaya Y, Brown KK. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Epidemiology, Diagnosis and Outcomes. *Am J Med Sci*. 2019;357(5):359–69.
81. Nalysnyk L, Cid-Ruzafa J, Rotella P, Esser D. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: Review of the literature. *Eur Respir Rev*. 2012;21(126):355–61.
82. Olson AL, Gifford AH, Inase N, Fernández Pérez ER, Suda T. The epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis and interstitial lung diseases at risk of a progressive-fibrosing phenotype. *Eur Respir Rev*. 2018;27(150):180077.
83. Yagi M, Yonei S. Glycative stress and anti-aging: 7. Glycative stress and skin aging. *Glycative Stress Res*. 2018;5(1):50–4.
84. Do NN, Eming S a. Skin fibrosis: Models and mechanisms. *Curr Res Transl Med*. 2016;64:185–93.
85. Chhabra S, Chhabra N, Kaur A, Gupta N. Wound Healing Concepts in Clinical Practice of OMFS. *J Maxillofac Oral Surg*. 2017;16(4):403–23.
86. Atamas SP, Luzina IG. Fibrotic Skin Diseases. In: Gaspari A., Tying S., editors. *Clinical and Basic Immunodermatology*. London: Springer; 2008. p. 721–37.
87. Nikpour M, Stevens WM, Herrick AL, Proudman SM. Epidemiology of systemic sclerosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24(6):857–69.
88. Chairta P, Nicolaou P, Christodoulou K. Genomic and genetic studies of systemic sclerosis: A systematic review. *Hum Immunol*. 2017;78(2):153–65.
89. Chiffhot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J. Incidence and Prevalence of Systemic Sclerosis: A Systematic Literature Review. *Semin Arthritis Rheum*. 2008;37(4):223–35.
90. Sanchez-Valle V, C. Chavez-Tapia N, Uribe M, Mendez-Sanchez N. Role of Oxidative Stress and Molecular Changes in Liver Fibrosis: A Review. *Curr Med Chem*. 2012;19(28):4850–60.
91. Rockey DC. Hepatic Fibrosis, Stellate Cells, and Portal Hypertension. *Clin Liver Dis*. 2006;10(3):459–79.

Referencias

92. Rockey DC. Translating an understanding of the pathogenesis of hepatic fibrosis to novel therapies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(3):224–31.
93. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(23):7312–24.
94. Hernandez-Gea V, Friedman Division SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2011;(6):425–56.
95. Sanyal AJ, Bosch J, Blei A, Arroyo V. Portal Hypertension and Its Complications. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1715–28.
96. Bloom S, Kemp W, Lubel J. Portal hypertension: Pathophysiology, diagnosis and management. *Intern Med J*. 2015;45(1):16–26.
97. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002;346(16):1221–31.
98. Wattacheril J, Issa D, Sanyal A. Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) and Hepatic Fibrosis : Emerging Therapies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2018;58:31.1-31.1414.
99. Nogueira A, Pires MJ, Oliveira PA. Pathophysiological mechanisms of renal fibrosis: A review of animal models and therapeutic strategies. *In Vivo*. 2017;31:1–22.
100. El Nahas AM, Muchaneta-Kubara EC, Essawy M, Soylemezoglu O. Renal fibrosis: Insights into pathogenesis and treatment. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29(1):55–62.
101. Falke LL, Gholizadeh S, Goldschmeding R, Kok RJ, Nguyen TQ. Diverse origins of the myofibroblast-implications for kidney fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11(4):233–44.
102. Webster AC, Nagler E V, Morton RL, Masson P. Chronic kidney disease. *Lancet*. 2017;389(10075):1238–52.
103. Romagnani P, Remuzzi G, Glasscock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, et al. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3:1–24.
104. Hill JA, Olson EN. Cardiac plasticity. *N Engl J Med*. 2008;358(13):1370.
105. Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol*. 2010;225(3):631–7.
106. Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: Mechanisms: Part 1 of 2. *Circulation*. 2013;128(4):388–400.
107. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*. 2007;93(9):1137–46.
108. Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, et al. The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J*. 1997;18(2):208–25.
109. Lucena J, Hernández AI, Rico A, Santos M, Blanco M, Marín R, et al. Lipomatosis cardiaca y muerte súbita. Diagnóstico diferencial con la miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho y la metaplasia grasa del infarto de miocardio antiguo. *Cuad Med Forense*. 2007;13(50):275–82.
110. Weber KT, Jalil JE, Janicki JS, Pick R. Myocardial Collagen Remodeling in Pressure Overload Hypertrophy. *Am J Hypertens*. 1989;2(12):931–40.
111. Weber KT, Janicki JS. Angiotensin and the remodelling of the myocardium. *Br J Clin Pharmacol*. 1989;28(2 S):141S-150S.

Referencias

112. Barone-Rochette G, Piérard S, De Meester De Ravenstein C, Seldrum S, Melchior J, Maes F, et al. Prognostic significance of LGE by CMR in aortic stenosis patients undergoing valve replacement. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(2):144–54.
113. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89–95.
114. Schuppan D, Ashfaq-Khan M, Yang AT, Kim YO. Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies. *Matrix Biol*. 2018;68–69:435–51.
115. Guiot J, Moermans C, Henket M, Corhay JL, Louis R. Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung*. 2017;195(3):273–80.
116. Organ LA, Duggan AR, Oballa E, Taggart SC, Simpson JK, Kang AR, et al. Biomarkers of collagen synthesis predict progression in the PROFILE idiopathic pulmonary fibrosis cohort. *Respir Res*. 2019;20(1):148.
117. Hasegawa M. Biomarkers in systemic sclerosis: Their potential to predict clinical courses. *J Dermatol*. 2016;43(1):29–38.
118. Mansour SG, Puthumana J, Coca SG, Gentry M, Parikh CR. Biomarkers for the detection of renal fibrosis and prediction of renal outcomes: a systematic review. *BMC Nephrol*. 2017;18(1):1–13.
119. Papatirou M, Genovese F, Klinkhammer BM, Kunter U, Nielsen SH, Karsdal MA, et al. Serum and urine markers of collagen degradation reflect renal fibrosis in experimental kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(7):1112–21.
120. Kok HM, Falke LL, Goldschmeding R, Nguyen TQ. Targeting CTGF, EGF and PDGF pathways to prevent progression of kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(12):700–11.
121. Tatler AL. Recent advances in the non-invasive assessment of fibrosis using biomarkers. *Curr Opin Pharmacol*. 2019;49:110–5.
122. Aspe Unanue L, González Hermosa MR, Gardeazabal García J. Scleroderma (systemic sclerosis). *Piel*. 2010;25(5):252–66.
123. Harari S, Caminati A. IPF: New insight on pathogenesis and treatment. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2010;65(5):537–53.
124. Nastase M V., Zeng-Brouwers J, Wygrecka M, Schaefer L. Targeting renal fibrosis: Mechanisms and drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;129:295–307.
125. Domínguez M, Colmenero J, Bataller R. Treatment of liver fibrosis. *Gastroenterol Hepatol*. 2009;32(9):627–32.
126. Montero-Martínez C. Nuevos tratamientos en la fibrosis pulmonar idiopática. *Arch Bronconeumol*. 2006;42(1):1–2.
127. Allinovi M, De Chiara L, Angelotti ML, Becherucci F, Romagnani P. Anti-fibrotic treatments: A review of clinical evidence. *Matrix Biol*. 2018;68–69(2017):333–54.
128. Rice LM, Padilla CM, McLaughlin SR, Mathes A, Ziemek J, Goummih S, et al. Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. *J Clin Invest*. 2015;125(7):2795–807.
129. Richeldi L, Costabel U, Selman M, Kim DS, Hansell DM, G.Nicholson A, et al. Efficacy of a

- Tyrosine Kinase Inhibitor in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med.* 2011;365:1079–87.
130. Udalova I, Monaco C, Nanchahal J, Feldmann M. Anti-TNF Therapy. *Microbiol Spectr.* 2016;4(4):1–11.
131. De Lecea L, Criado JR, Prospero-García Ó, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE, et al. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature.* 1996;381(6579):242–5.
132. de Lecea L. Cortistatin-Functions in the central nervous system. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;286(1–2):88–95.
133. Spier AD, De Lecea L. Cortistatin: A member of the somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions. *Brain Res Rev.* 2000;33(2–3):228–41.
134. Papotti M, Tarabra E, Allia E, Bozzalla-Cassione F, Broglio F, Deghenghi R, et al. Presence of cortistatin in the human pancreas. *J Endocrinol Invest.* 2003;26(8):15–8.
135. De Lecea L, Ruiz-Lozano P, Danielson PE, Peelle-Kirley J, Foye PE, Frankel WN, et al. Cloning, mRNA expression, and chromosomal mapping of mouse and human preprocortistatin. *Genomics.* 1997;42(3):499–506.
136. Ejeskär K, Abel F, Sjöberg RM, Bäckström J, Kogner P, Martinsson T. Fine mapping of the human preprocortistatin gene (CORT) to neuroblastoma consensus deletion region 1p36.3→p36.2, but absence of mutations in primary tumors. *Cytogenet Cell Genet.* 2000;89(1–2):62–6.
137. Gonzalez-Rey E, Pedreño M, Delgado-Maroto V, Souza-Moreira L, Delgado M. Lulling immunity, pain, and stress to sleep with cortistatin. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1351(1):89–98.
138. De Lecea L, Castaño JP. Cortistatin: Not just another somatostatin analog. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006;2(7):356–7.
139. Patel YC. General Aspects of the Biology and Function of Somatostatin. In: *Somatostatin. Basic and Clinical Aspects of Neuroscience*, vol 4. C.Weil, Muller EE, Thorner M., editors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1992. 1–16 p.
140. Gonzalez-Rey E, Delgado M. Emergence of cortistatin as a new immunomodulatory factor with therapeutic potential in immune disorders. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;286(1–2):135–40.
141. Dalm VA, Van Hagen PM, De Krijger RR, Kros JM, Van Koetsveld PM, Van Der Lely AJ, et al. Distribution pattern of somatostatin and cortistatin mRNA in human central and peripheral tissues. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;60(5):625–9.
142. Córdoba-Chacón J, Gahete MD, Pozo-Salas AI, Martínez-Fuentes AJ, De Lecea L, Gracia-Navarro F, et al. Cortistatin is not a somatostatin analogue but stimulates prolactin release and inhibits GH and ACTH in a gender-dependent fashion: Potential role of ghrelin. *Endocrinology.* 2011;152(12):4800–12.
143. Liu Y, Zhou YB, Zhang GG, Cai Y, Duan XH, Teng X, et al. Cortistatin attenuates vascular calcification in rats. *Regul Pept.* 2010;159(1–3):35–43.
144. Deghenghi R, Papotti M, Ghigo E, Muccioli G. Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *J Endocrinol Invest.* 2001;24(1):RC1–3.
145. Robas N, Mead E, Fidock M. MrgX2 Is a High Potency Cortistatin Receptor Expressed in Dorsal Root Ganglion. *J Biol Chem.* 2003;278(45):44400–4.

Referencias

146. Siehler S, Nunn C, Hannon J, Feuerbach D, Hoyer D. Pharmacological profile of somatostatin and cortistatin receptors. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;286(1–2):26–34.
147. Mear Y, Enjalbert A, Thirion S. GHS-R1a constitutive activity and its physiological relevance. *Front Neurosci.* 2013;7(87):1–7.
148. Gonzalez-Rey E, Delgado M. Anti-inflammatory neuropeptide receptors: new therapeutic targets for immune disorders? *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(9):482–91.
149. Van Hagen PM, Dalm VA, Staal F, Hofland LJ. The role of cortistatin in the human immune system. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;286(1–2):141–7.
150. Delgado M, Gonzalez-Rey E. Role of Cortistatin in the Stressed Immune System. *Front Horm Res.* 2017;48:110–20.
151. Souza-Moreira L, Morell M, Delgado-Maroto V, Pedreno M, Martinez-Escudero L, Caro M, et al. Paradoxical Effect of Cortistatin Treatment and Its Deficiency on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol.* 2013;191(5):2144–54.
152. Gonzalez-Rey E, Varela N, Sheibanie AF, Chorny A, Ganea D, Delgado M. Cortistatin, an antiinflammatory peptide with therapeutic action in inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:4228–33.
153. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Robledo G, Delgado M. Cortistatin, a new antiinflammatory peptide with therapeutic effect on lethal endotoxemia. *J Exp Med.* 2006;203(3):563–71.
154. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Del Moral RG, Varela N, Delgado M. Therapeutic effect of cortistatin on experimental arthritis by downregulating inflammatory and Th1 responses. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(5):582–8.
155. Delgado-Maroto V, Falo CP, Forte-Lago I, Adan N, Morell M, Maganto-Garcia E, et al. The neuropeptide cortistatin attenuates experimental autoimmune myocarditis via inhibition of cardiomyogenic T cell-driven inflammatory responses. *Br J Pharmacol.* 2017;174(3):267–80.
156. Barriga M, Benitez R, Ferraz-de-Paula V, Garcia-Frutos M, Caro M, Robledo G, et al. Protective role of cortistatin in pulmonary inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol.* 2021;doi: 10.1111/bph.15615.
157. Qiu C, Li J, Luo D, Chen X, Qu R, Liu T, et al. Cortistatin protects against inflammatory airway diseases through curbing CCL2 and antagonizing NF- κ B signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;531(4):595–601.
158. Borie R, Fabre A, Prost F, Marchal-Somme J, Lebtahi R, Marchand-Adam S, et al. Activation of somatostatin receptors attenuates pulmonary fibrosis. *Thorax.* 2008;63(3):251–8.
159. Egger C, Gérard C, Vidotto N, Accart N, Cannet C, Dunbar A, et al. Lung volume quantified by MRI reflects extracellular-matrix deposition and altered pulmonary function in bleomycin models of fibrosis effects of SOM230. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014;306:1064–77.
160. Tracy TF, Tector AJ, Goerke ME, Kitchen S, Lagunoff D. Somatostatin Analogue (Octreotide) Inhibits Bile Duct Epithelial Cell Proliferation and Fibrosis After Extrahepatic Biliary Obstruction. *Am J Pathol.* 1993;143(6):1574–8.
161. Wang J, Wang L, Song G, Han B. The mechanism through which octreotide inhibits hepatic stellate cell activity. *Mol Med Rep.* 2013;7(5):1559–64.
162. Zhang C, Liu XQ, Sun HN, Meng XM, Bao YW, Zhang HP, et al. Octreotide attenuates hepatic

- fibrosis and hepatic stellate cells proliferation and activation by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway, c-Myc and cyclin D1. *Int Immunopharmacol.* 2018;63:183–90.
163. Ota Y, Kawaguchi Y, Takagi K, Ichida H, Gono T, Hanaoka M, et al. Ghrelin attenuates collagen production in lesional fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Clin Immunol.* 2013;147(2):71–8.
 164. Koca SS, Ozgen M, Sarikaya M, Dagli F, Ustundag B, Isik a. Ghrelin prevents the development of dermal fibrosis in bleomycin-induced scleroderma. *Clin Exp Dermatol.* 2014;39(2):176–81.
 165. Moreno M, Chaves JF, Sancho-Bru P, Ramalho F, Ramalho LN, Mansego ML, et al. Ghrelin attenuates hepatocellular injury and liver fibrogenesis in rodents and influences fibrosis progression in humans. *Hepatology.* 2010;51(3):974–85.
 166. Antoniu SA. Somatostatin analogs for idiopathic pulmonary fibrosis therapy. *Expert Opin Investig Drugs.* 2008;17(7):1137–40.
 167. Duran-Prado M, Morell M, Delgado-Maroto V, Castaño JP, Aneiros-Fernandez J, De Lecea L, et al. Cortistatin inhibits migration and proliferation of human vascular smooth muscle cells and decreases neointimal formation on carotid artery ligation. *Circ Res.* 2013;112(11):1444–55.
 168. Li M, Yan S, Fisher WE, Chen C, Yao Q. New roles of a neuropeptide cortistatin in the immune system and cancer. *World J Surg.* 2005;29(3):354–6.
 169. Hernández C, Simó R. Strategies for blocking angiogenesis in diabetic retinopathy: From basic science to clinical practice. *Expert Opin Investig Drugs.* 2007;16(8):1209–26.
 170. Delgado-Maroto V, Benitez R, Forte-Lago I, Morell M, Maganto-Garcia E, Souza-Moreira L, et al. Cortistatin reduces atherosclerosis in hyperlipidemic ApoE-deficient mice and the formation of foam cells. *Sci Rep.* 2017;7:46444.
 171. Krötzsch E. Farmacotoxicidad en la vehiculización de principios activos en la enfermedad de Parkinson. *Investig en Discapac.* 2015;4(2):86–90.
 172. González-Fernández A, Peleteiro Olmedo M, Lozano Fernández T, Simón Vázquez R, Díaz Freitas B. Nanotecnología y sistema inmunitario. *Nuevas Perspect en Inmunoter.* 2012;25:21–33.
 173. Villegas MR, Baeza A, Usategui A, Ortiz-Romero PL, Pablos JL, Vallet-Regí M. Collagenase nanocapsules: An approach to fibrosis treatment. *Acta Biomater.* 2018;74:430–8.
 174. Surendran SP, Thomas RG, Moon MJ, Jeong YY. Nanoparticles for the treatment of liver fibrosis. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:6997–7006.
 175. Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther.* 1998;80(1):35–47.
 176. Rodríguez Sandoval AS, Salazar Montes AM, Armendáriz-Borunda J. Vectores virales en terapia génica. Ventajas de los vectores adenoasociados. *Rev Gastroenterol Mex.* 2005;70(2):192–202.
 177. Despanie J, Dhandhukia JP, Hamm-álvarez SF, Andrew J, Angeles L, Angeles L. Elastin-Like Polypeptides: Therapeutic Applications for an Emerging Class of Nanomedicines. 2018;93–108.
 178. Adams G, Vessillier S, Dreja H, Chernajovsky Y. Targeting cytokines to inflammation sites. *Nat Biotechnol.* 2003;21(11):1314–20.
 179. Vessillier S, Adams G, Montero-Melendez T, Jones R, Seed M, Perretti M, et al. Molecular engineering of short half-life small peptides (VIP, alphaMSH and gammaMSH) fused to latency-associated peptide results in improved anti-inflammatory therapeutics. *Ann Rheum Dis.*

- 2012;71(1):143–9.
180. Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y. New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot.* 1966;19(5):200–9.
 181. Liu T, Gonzalez De Los Santos F, Phan SH. The Bleomycin Model of Pulmonary Fibrosis. In: Rittié L, editor. *Fibrosis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* Springer Science+Business Media LLC; 2017. p. 27–42.
 182. Avouac J. Mouse Model of Experimental Dermal Fibrosis: The Bleomycin-Induced Dermal Fibrosis. In: Shiozawa S, editor. *Arthritis Research: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* New York: Springer Science+Business Media New York; 2014. p. 91–8.
 183. Allanore Y, Simms R, Distler O, Trojanowska M, Pope J, Denton CP, et al. Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1(1):15002.
 184. Cissell DD, Link JM, Hu JC, Athanasiou KA. A Modified Hydroxyproline Assay Based on Hydrochloric Acid in Ehrlich’s Solution Accurately Measures Tissue Collagen Content. *Tissue Eng - Part C Methods.* 2017;23(4):243–50.
 185. Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP, et al. *Assay Guidance Manual.* Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, editors. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
 186. Soto Sedano JC, López Carrascal CE. RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad.* 2012;16(2):101–13.
 187. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008;26(10):1135–45.
 188. Metzker ML. Sequencing technologies the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):31–46.
 189. Andrés-León E, Núñez-Torres R, Rojas AM. miARma-Seq: A comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis. *Sci Rep.* 2016;6:1–7.
 190. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. [Internet]. 2010. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
 191. Li H. Seqtk: a fast and lightweight tool for processing FASTA or FASTQ sequences. Git hub, MIT. 2013;
 192. Kim D, Langmead B SS. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods.* 2015;12:357–360.
 193. Liao Y, Smyth GK SW. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014;30:923–930.
 194. Nikolayeva O, Robinson M. edgeR for differential RNA-seq and ChIP-seq analysis: an application to stem cell biology. *Methods Mol Biol.* 2014;1150:45–79.
 195. Robinson M, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 2010;11:R25.
 196. Reeb P, Bramardi S, Steibel J. Assessing Dissimilarity Measures for Sample-Based Hierarchical Clustering of RNA Sequencing Data Using Plasmode Datasets. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132310.
 197. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W SG. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:e47–e47.

Referencias

198. Yu G, Wang L-G, Han Y HQ-Y. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS*. 2012;16:284.
199. Phoenix Pharmaceuticals INC. General Protocol for Peptide Enzyme Immunoassay. 2017. 1–16 p.
200. Bergmann JH, Li J, Eckersley-maslin MA, Rigo F, Freier SM, Spector DL. Regulation of the ESC transcriptome by nuclear long noncoding RNAs. *Genome Res*. 2015;1–11.
201. Dehghanian F, Bovio PP, Hojati Z, Vogel T. ZFP982 confers mouse embryonic stem cell characteristics by regulating expression of Nanog, Zfp42 and Dppa3. *bioRxiv*. 2020;doi:10.1101/2020.06.03.131847.
202. Anand N, Murthy S, Amann G, Wernick M, Porter LA, Cukier IH, et al. Gene encoding protein elongation factor EEF1A2 is a putative oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet*. 2002;31(3):301–5.
203. Park SW, Persaud SD, Ogokeh S, Meyers TA, Townsend D, Wei L-N. CRABP1 protects the heart from isoproterenol-induced acute and chronic remodeling. *J Endocrinol*. 2018;236(3):151–65.
204. Tabib T, Morse C, Wang T, Chen W, Lafyatis R. SFRP2/DPP4 and FMO1/LSP1 Define Major Fibroblast Populations in Human Skin. *J Invest Dermatol*. 2018;138(4):802–10.
205. Kotsiou OS, Gourgoulianis KI, Zarogiannis SG. IL-33/ST2 axis in organ fibrosis. *Front Immunol*. 2018;(9):2432.
206. Garbern JC, Williams J, Kristl AC, Malick A, Rachmin I, Gaeta B, et al. Dysregulation of IL-33/ST2 signaling and myocardial periarteriolar fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2019;128:179–86.
207. Vianello E, Dozio E, Tacchini L, Frati L, Corsi Romanelli MM. ST2/IL-33 signaling in cardiac fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2019;116:105619.
208. Nadella S, Ciofoaia V, Cao H, Kallakury B, Tucker RD, Smith JP. Cholecystokinin Receptor Antagonist Therapy Decreases Inflammation and Fibrosis in Chronic Pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2020;65(5):1376–84.
209. Yi HS, Lee YS, Byun JS, Seo W, Jeong JM, Park O, et al. Alcohol dehydrogenase III exacerbates liver fibrosis by enhancing stellate cell activation and suppressing natural killer cells in mice. *Hepatology*. 2014;60(3):1044–53.
210. Carino A, Biagioli M, Marchianò S, Fiorucci C, Zampella A, Monti MC, et al. Ursodeoxycholic acid is a GPBAR1 agonist and resets liver/intestinal FXR signaling in a model of diet-induced dysbiosis and NASH. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(10):1422–37.
211. Martínez-Castillo M, Rosique-Oramas D, Medina-Avila Z, Pérez-Hernández JL, Higuera-De la Tijera F, Santana-Vargas D, et al. Differential production of insulin-like growth factor-binding proteins in liver fibrosis progression. *Mol Cell Biochem*. 2020;469(1–2):65–75.
212. Guiot J, Bondue B, Henket M, Corhay JL, Louis R. Raised serum levels of IGFBP-1 and IGFBP-2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med*. 2016;16(1):1–7.
213. Guiot J, Henket M, Corhay JL, Moermans C, Louis R. Sputum biomarkers in IPF: Evidence for raised gene expression and protein level of IGFBP-2, IL-8 and MMP-7. *PLoS One*. 2017;12(2):1–12.
214. Wang M, Gong Q, Zhang J, Chen L, Zhang Z, Lu L, et al. Characterization of gene expression profiles in HBV-related liver fibrosis patients and identification of ITGBL1 as a key regulator of fibrogenesis. *Sci Rep*. 2017;7:43446.

Referencias

215. Xu MY, Qu Y, Li ZH, Li F, Xiao CY, Lu LG. A 6 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis B. *Front Biosci - Landmark*. 2016;21(3):479–86.
216. Liu Y, Geng YH, Yang H, Yang H, Zhou YT, Zhang HQ, et al. Extracellular ATP drives breast cancer cell migration and metastasis via S100A4 production by cancer cells and fibroblasts. *Cancer Lett*. 2018;430:1–10.
217. Sato F, Kohsaka A, Takahashi K, Otao S, Kitada Y, Iwasaki Y, et al. Smad3 and Bmal1 regulate p21 and S100A4 expression in myocardial stromal fibroblasts via TNF- α . *Histochem Cell Biol*. 2017;148(6):617–24.
218. Qian LJ, Hong J, Zhang YM, Zhu ML, Wang XC, Zhang YJ, et al. Downregulation of S100A4 Alleviates Cardiac Fibrosis via Wnt/ β -Catenin Pathway in Mice. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(6):2551–60.
219. Chen L, Li J, Zhang J, Dai C, Liu X, Wang J, et al. S100A4 promotes liver fibrosis via activation of hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 2015;62(1):156–64.
220. Li Y, Bao J, Bian Y, Erben U, Wang P, Song K, et al. S100A4+ macrophages are necessary for pulmonary fibrosis by activating lung fibroblasts. *Front Immunol*. 2018;9(AUG):1–15.
221. Zhang W, Ohno S, Steer B, Klee S, Staab-Weijnitz CA, Wagner D, et al. S100a4 is secreted by alternatively activated alveolar macrophages and promotes activation of lung fibroblasts in pulmonary fibrosis. *Front Immunol*. 2018;9:1216.
222. Opdam FJM, Echard A, Croes HJE, van den Hurk JAJM, van de Vorstenbosch RA, Ginsel LA, et al. The small GTPase Rab6B, a novel Rab6 subfamily member, is cell-type specifically expressed and localised to the Golgi apparatus. *J Cell Sci*. 2000;113(15):2725–35.
223. Akbar M, McLean M, Garcia-Melchor E, Crowe LAN, McMillan P, Fazzi UG, et al. Fibroblast activation and inflammation in frozen shoulder. *PLoS One*. 2019;14(4):e0215301.
224. Miyashita T, Tajima H, Gabata R, Okazaki M, Shimbashi H, Ohbatake Y, et al. Impact of extravasated platelet activation and podoplanin-positive cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer stroma. *Anticancer Res*. 2019;39(10):5565–72.
225. Krishnan H, Rayes J, Miyashita T, Ishii G, Retzbach EP, Sheehan SA, et al. Podoplanin: An emerging cancer biomarker and therapeutic target. *Cancer Sci*. 2018;109(5):1292–9.
226. Wcisło-Dziadecka D, Gola J, Grabarek B, Mazurek U, Brzezińska-Wcisło L, Kucharz EJ. Effect of adalimumab on the expression of genes encoding TNF- α signal paths in skin fibroblasts in vitro. *Postep Dermatologii i Alergol*. 2018;35(4):413–22.
227. Chen X, Wu Y, Diao Z, Han X, Li D, Ruan X, et al. C1q/tumor necrosis factor-related protein-3 improves renal fibrosis via inhibiting notch signaling pathways. *J Cell Physiol*. 2019;234(12):22352–64.
228. Hofmann C, Chen N, Obermeier F, Paul G, Büchler C, Kopp A, et al. C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3) is secreted by visceral adipose tissue and exerts antiinflammatory and antifibrotic effects in primary human colonic fibroblasts. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(12):2462–71.
229. Cheng C, Yu S, Kong R, Yuan Q, Ma Y, Yang W, et al. CTRP3 attenuates hepatic stellate cell activation through transforming growth factor- β /Smad signaling pathway. *Biomed Pharmacother*. 2017;89:1387–91.
230. Bai WW, Tang ZY, Shan TC, Jing XJ, Li P, Qin WD, et al. Up-regulation of paired-related

Referencias

- homeobox 2 promotes cardiac fibrosis in mice following myocardial infarction by targeting of Wnt5a. *J Cell Mol Med.* 2020;24(3):2319–29.
231. Li X, Zhao D, Guo Z, Li T, Qili M, Xu B, et al. Overexpression of SerpinE2/protease nexin-1 Contribute to Pathological Cardiac Fibrosis via increasing Collagen Deposition. *Sci Rep.* 2016;6:37635.
232. Vidal R, Wagner JUG, Braeuning C, Fischer C, Patrick R, Tombor L, et al. Transcriptional heterogeneity of fibroblasts is a hallmark of the aging heart. *JCI Insight.* 2019;4(22):1–17.
233. Li X, Wang G, Qili M, Liang H, Li T, Xiaoqiang E, et al. Aspirin Reduces Cardiac Interstitial Fibrosis by Inhibiting Erk1/2-Serpine2 and P-Akt Signalling Pathways. *Cell Physiol Biochem.* 2018;45(5):1955–65.
234. Beech DJ, Kalli AC. Force Sensing by Piezo Channels in Cardiovascular Health and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(11):2228–39.
235. Srinivasan L, Page G, Kirpalani H, Murray JC, Das A, Higgins RD, et al. Genome-wide association study of sepsis in extremely premature infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2017;102(5):F439–45.
236. Takahashi D, Suzuki H, Kakei Y, Yamakoshi K, Minami Y, Komori T, et al. Expression of Ror2 associated with fibrosis of the submandibular gland. *Cell Struct Funct.* 2017;42(2):159–67.
237. Li C, Smith SM, Peinado N, Gao F, Li W, Lee MK, et al. WNT5a-ROR Signaling Is Essential for Alveologenesis. *Cells.* 2020;9(2):384.
238. Hoek RM, De Launay D, Kop EN, Yilmaz-Elis AS, Lin F, Reedquist KA, et al. Deletion of either CD55 or CD97 ameliorates arthritis in mouse models. *Arthritis Rheum.* 2010;62(4):1036–42.
239. Cocuzzi ET, Bardensteyn D, Stavitsky A, Sudarraj N, Medof ME. Upregulation of DAF (CD55) on orbital fibroblasts by cytokines. Differential effects of TNF- β and TNF- α . *Curr Eye Res.* 2001;23(2):86–92.
240. Radeke MJ, Radeke CM, Shih YH, Hu J, Bok D, Johnson L V., et al. Restoration of mesenchymal retinal pigmented epithelial cells by TGF β pathway inhibitors: Implications for age-related macular degeneration. *Genome Med.* 2015;7(1):1–19.
241. Bai J, Lo A, Gladding PA, Stiles MK, Fedorov V V., Zhao J. In silico investigation of the mechanisms underlying atrial fibrillation due to impaired Pitx2. *PLoS Comput Biol.* 2020;16(2):e1007678.
242. Kao YH, Chung CC, Cheng WL, Lkhagva B, Chen YJ. Pitx2c inhibition increases atrial fibroblast activity: Implications in atrial arrhythmogenesis. *Eur J Clin Invest.* 2019;49(10):e13160.
243. Gao L, Wang L you, Liu Z qiang, Jiang D, Wu S yong, Guo Y qian, et al. TNAP inhibition attenuates cardiac fibrosis induced by myocardial infarction through deactivating TGF- β 1/Smads and activating P53 signaling pathways. *Cell Death Dis.* 2020;11(1):44.
244. Arnò B, Gallì F, Roostalu U, Aldeiri BM, Miyake T, Albertini A, et al. TNAP limits TGF- β -dependent cardiac and skeletal muscle fibrosis by inactivating the SMAD2/3 transcription factors. *Co Biol.* 2019;132:jcs234948.
245. Anuradha Krishnan, Li X, Kao WW-Y, Viker K, Butters K, Masuoka H, et al. Lumican, an extracellular matrix proteoglycan, is a novel requisite for hepatic fibrosis. *Lab Invest.* 2012;92(12):1712–25.

246. Liu XJ, Kong FZ, Wang YH, Zheng JH, Wan WD, Deng CL, et al. Lumican Accelerates Wound Healing by Enhancing $\alpha 2\beta 1$ Integrin-Mediated Fibroblast Contractility. *PLoS One*. 2013;8(6):e67124.
247. Pillinga D, Vakilb V, Coxa N, Gomera RH. TNF- α -stimulated fibroblasts secrete lumican to promote fibrocyte differentiation. *PNAS*. 2015;112(38):11929–34.
248. Takeuchi JK, Lou X, Alexander JM, Sugizaki H, Delgado-OlguÃ- N P, Holloway AK, et al. Chromatin remodelling complex dosage modulates transcription factor function in heart development. *Nat Commun*. 2011;2:187.
249. Muzio M, Polentarutti N, Sironi M, Poli G, De Gioia L, Introna M, et al. Cloning and characterization of a new isoform of the interleukin 1 receptor antagonist. *J Exp Med*. 1995;182(2):623–8.
250. Antoine M, Tag CG, Wirz W, Borkham-Kamphorst E, Sawitza I, Gressner AM, et al. Upregulation of pleiotrophin expression in rat hepatic stellate cells by PDGF and hypoxia: Implications for its role in experimental biliary liver fibrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;337(4):1153–64.
251. Perez-Pinera P, Chang Y, Deuel TF. Pleiotrophin, a multifunctional tumor promoter through induction of tumor angiogenesis, remodeling of the tumor microenvironment and activation of stromal fibroblasts. *Cell Cycle*. 2007;6(23):2877–83.
252. Zhang Q, Tao K, Huang W, Tian Y, Liu X. Elevated expression of pleiotrophin in human hypertrophic scars. *J Mol Histol*. 2013;44(1):91–6.
253. Tacke F, Zimmermann HW, Trautwein C, Schnabl B. CXCL5 plasma levels decrease in patients with chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(3):523–9.
254. Keane MP, Belperio JA, Burdick MD, Lynch JP, Fishbein MC, Strieter RM. ENA-78 is an important angiogenic factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;164(12):2239–42.
255. Fischer M, Harvima IT, Carvalho RFS, Möller C, Naukkarinen A, Enblad G, et al. Mast cell CD30 ligand is upregulated in cutaneous inflammation and mediates degranulation-independent chemokine secretion. *J Clin Invest*. 2006;116(10):2748–56.
256. King TE, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2011;378(9807):1949–61.
257. Gross T, Gary H. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2001;345(7):517–25.
258. Ye T, Liu R. Effect of Octreotide on Pancreatic Fibrosis of High-Fat Diet Induced Obesity in Rats. *Gastroenterology*. 2017;152(5):S895.
259. Chatterjee S, Vrolix G, Depoortere I, Peeters T, Van Marck E. The therapeutic effect of the neuropeptide hormone somatostatin on *Schistosoma mansoni* caused liver fibrosis. *BMC Infect Dis*. 2005;5:45.
260. Chen H, Liu Y, Gui Q, Zhu X, Zeng L, Meng J, et al. Ghrelin attenuates myocardial fibrosis after acute myocardial infarction via inhibiting endothelial-to mesenchymal transition in rat model. *Peptides*. 2019;111:118–26.
261. Oyucu Orhan S, Tektemur A, Gözel N, Özercan İH, Yolbaş S, Yildirim A, et al. Octreotide ameliorates dermal fibrosis in bleomycin-induced scleroderma. *Turkish J Med Sci*. 2018;48(4):886–91.

Referencias

262. Ling L, Yang M, Ding W, Gu Y. Ghrelin attenuates UUO-induced renal fibrosis via attenuation of Nlrp3 inflammasome and endoplasmic reticulum stress. *Am J Transl Res*. 2019;11(1):131–41.
263. Borie R, Fabre A, Prost F, Marchal-Somme J, Lebtahi R, Marchand-Adam S, et al. Activation of somatostatin receptors attenuates pulmonary fibrosis. *Thorax*. 2008;63(3):251–8.
264. Chorny A, Delgado M. Neuropeptides Rescue Mice from Lethal Sepsis by Down-regulating Secretion of the Late-Acting Inflammatory Mediator High Mobility Group Box 1. *Am J Pathol*. 2008 May;172(5):1297–302.
265. Prasse A, Zissel G, Lützen N, Schupp J, Schmiedlin R, Gonzalez-Rey E, et al. Inhaled vasoactive intestinal peptide exerts immunoregulatory effects in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(4):540–8.
266. Scavone C, Brusco S, Bertini M, Sportiello L, Rafaniello C, Zoccoli A, et al. Current pharmacological treatments for COVID-19: What's next? *Br J Pharmacol*. 2020;177(21):4813–24.
267. Dalm VA, Van Hagen PM, Van Koetsveld PM, Achilefu S, Houtsmuller AB, Pols DHJ, et al. Expression of somatostatin, cortistatin, and somatostatin receptors in human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285(2):E344–53.
268. Markovics A, Szőke É, Sándor K, Börzsei R, Bagoly T, Kemény Á, et al. Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of cortistatin-14 and somatostatin-14 in distinct in vitro and in vivo model systems. *J Mol Neurosci*. 2012;46(1):40–50.
269. Wang Y, Zhang X, Gao L, Li J, Chen W, Chi J, et al. Cortistatin exerts antiproliferation and antimigration effects in vascular smooth muscle cells stimulated by Ang II through suppressing ERK1/2, p38 MAPK, JNK and ERK5 signaling pathways. *Ann Transl Med*. 2019;7(20):561–561.
270. Tug T, Kara H, Karaoglu A, Karatas F, Turgut NH, Ayan E, et al. The effect of octreotide, an analog of somatostatin, on bleomycin-induced interstitial pulmonary fibrosis in rats. *Drug Chem Toxicol*. 2013;36(2):181–6.
271. Grottoli S, Gasco V, Broglio F, Baldelli R, Ragazzoni F, Gallenca F, et al. Cortistatin-17 and somatostatin-14 display the same effects on growth hormone, prolactin, and insulin secretion in patients with acromegaly or prolactinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(4):1595–9.
272. Giordano R, Picu A, Bonelli L, Broglio F, Prodam F, Grottoli S, et al. The activation of somatostatinergetic receptors by either somatostatin-14 or cortistatin-17 often inhibits ACTH hypersecretion in patients with Cushing's disease. *Eur J Endocrinol*. 2007;157(4):393–8.
273. Bossini-Castillo L, Villanueva-Martin G, Kerick M, Acosta-Herrera M, López-Isac E, Simeón CP, et al. Genomic Risk Score impact on susceptibility to systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2021;80(1):118–27.
274. Beretta L, Barturen G, Vigone B, Bellocchi C, Hunzelmann N, De Langhe E, et al. Genome-wide whole blood transcriptome profiling in a large European cohort of systemic sclerosis patients. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(9):1218–26.
275. Benitez R, Caro M, León EA, O'Valle F, Delgado M. Cortistatin regulates fibrosis and myofibroblast activation in experimental hepatotoxic- and cholestatic-induced liver injury. *Authorea*. 2021;doi:10.22541/au.162449679.99250848/v1.
276. Jordan VK, Zaveri HP, Scott DA. 1p36 deletion syndrome: An update. *Appl Clin Genet*. 2015;8:189–200.

Referencias

277. Sleijfer S. Bleomycin-induced pneumonitis. *Chest*. 2001;120(2):617–24.
278. Kawai K, Akaza H. Bleomycin-induced pulmonary toxicity in chemotherapy for testicular cancer. *Expert Opin Drug Saf*. 2003;2(6):587–96.
279. Avendaño C, Menéndez JC. Anticancer Drugs Acting via Radical Species, Photosensitizers and Photodynamic Therapy of Cancer. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. Elsevier Science; 2008. 93–138 p.
280. J.K. Aronson, editor. Bleomycin. In: *Meyler's Side Effects of Drugs The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions*. 16th ed. Elsevier Science; 2016. p. 1005–6.
281. Nisini R, Poerio N, Mariotti S, De Santis F, Fraziano M. The multirole of liposomes in therapy and prevention of infectious diseases. *Front Immunol*. 2018;9:155.
282. Rol Á, Todorovski T, Martin-Malpartida P, Escolà A, Gonzalez-Rey E, Aragón E, et al. Structure-based design of a Cortistatin analog with improved immunoregulatory activity against inflammatory bowel disease (IBD). *Nat Commun*. 2019;12(1):1869.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del proceso de fibrosis	7
Figura 2. Células de las que proceden los miofibroblastos.....	10
Figura 3. Proceso de transdiferenciación del fibroblasto a miofibroblasto.....	11
Figura 4. Maduración de TGF β desde la forma pro-TGF β hasta la forma de TGF β latente	14
Figura 5. Vías de señalización de TGF β	15
Figura 6. Enfermedades fibróticas más comunes	25
Figura 7. Daño alveolar en la fibrosis pulmonar	26
Figura 8. Representación esquemática de los patrones básicos de fibrosis pulmonar	27
Figura 9. Representación de la fibrosis cutánea	29
Figura 10. Representación de la transformación de un corazón sano en uno fibrótico.....	33
Figura 11. Comparación entre la estructura secundaria de Cortistatina y Somatostatina de ratón	40
Figura 12. Receptores de Cortistatina.....	41
Figura 13. Papel inmunorregulador de Cortistatina.....	42
Figura 14. Efecto de Cortistatina en artritis reumatoide y miocarditis	43
Figura 15. Efecto del tratamiento con Cortistatina de ratones con ALI	44
Figura 16. Presencia de Cortistatina en células relacionadas con fibrosis y sus efectos sobre la proliferación y la migración de las mismas.....	47
Figura 17. Efecto de Cortistatina en macrófagos.....	48
Figura 18. Conformaciones de la construcción de la citoquina latente	51
Figura 19. Modelo de esclerodermia inducido por Bleomicina.....	58
Figura 20. Modelo de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina.....	59
Figura 21. Procedimiento quirúrgico para la extracción del BAL.....	60
Figura 22. Tinción Tricrómico de Masson de un corte transversal de piel de ratón.....	63
Figura 23. Imagen comparativa de los diferentes grados de lesión en cortes de pulmón de ratón con la tinción Tricrómico de Masson.....	64
Figura 24. Tinción Rojo Sirio-Ácido Pírico de un corte transversal de piel de ratón	65
Figura 25. Principio del ensayo de la hidroxiprolina.....	70
Figura 26. Reducción de Resazurina a Resofurina	79
Figura 27. Oxidación de la Luciferina por medio de la enzima Luciferasa	80
Figura 28. Aplicación del macro <i>MRI Wound Healing Tool</i> a una imagen de la herida de un cultivo celular	81
Figura 29. Modelo experimental del transcriptoma de fibroblastos de pulmón	82
Figura 30. Fase de generación de <i>clusters</i> de ADN mediante la tecnología <i>Solexa/Illumina</i>	83
Figura 31. Fase de secuenciación por síntesis mediante la tecnología <i>Solexa/Illumina</i>	84
Figura 32. Modelo de esclerodermia inducido por Bleomicina y tratamiento con Cortistatina	86
Figura 33. Modelo de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina y tratamientos con Cortistatina	87
Figura 34. Esquema representativo de la molécula de Cortistatina latente	88
Figura 35. Representación esquemática del plásmido pCMV6-XL4 (6486 pb).....	89
Figura 36. Digestión del plásmido pCMV6-XL4 y obtención del fragmento SPLAP clonado.....	90
Figura 37. Representación esquemática del plásmido pGEM-T (3831 pb) con el fragmento SPLAP incorporado.....	92
Figura 38. Reacción por la que la β -galactosidasa metaboliza la molécula X-gal generando 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo	93
Figura 39. Digestión del plásmido pGEM-T-SPLAP y obtención del fragmento SPLAP	94
Figura 40. Representación esquemática del plásmido pcDNA3.1+ (6212 pb) con el fragmento SPLAP incorporado.....	95
Figura 41. Representación esquemática de los plásmidos pcDNA3.1+SPLAPCST29r (6308 pb), pcDNA3.1+SPLAPL1L1CST29r (6347 pb) y pcDNA3.1+SPLAPL1MMPL2CST29r (6308 pb).....	96

Índice de figuras

Figura 42. Digestión de los plásmidos pcDNA3.1+SPLAP, pcDNA3.1+SPLAPCST29r, pcDNA3.1+SPLAPL1L2CST29r y pcDNA3.1+SPLAPL1MMPL2CST29r.....	97
Figura 43. Representación de la estructura supuesta para las distintas proteínas recombinantes	98
Figura 44. Esquema del proceso de obtención de las diferentes moléculas de Cortistatina latente.....	99
Figura 45. Modelo de esclerodermia inducido por Bleomicina y tratamiento con Cortistatina latente	102
Figura 46. Modelo de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina y tratamiento con Cortistatina latente	102
Figura 47. En situaciones de fibrosis la expresión de Cortistatina y sus receptores se ve alterada	106
Figura 48. La deficiencia en Cortistatina aumenta la susceptibilidad frente a Bleomicina	107
Figura 49. La deficiencia en Cortistatina incrementa la pérdida de peso y la mortalidad en ratones con fibrosis pulmonar.....	108
Figura 50. La deficiencia en Cortistatina exagera la respuesta inflamatoria en animales con fibrosis pulmonar.....	109
Figura 51. Los ratones deficientes en Cortistatina muestran un proceso fibrótico exacerbado en el pulmón	111
Figura 52. La falta de Cortistatina predispone a los animales con esclerodermia a sufrir un proceso fibrótico exacerbado.....	113
Figura 53. La deficiencia en Cortistatina exagera la fibrosis pulmonar en ratones con esclerodermia ..	114
Figura 54. Los fibroblastos pulmonares aislados presentan una activación basal profibrótica	116
Figura 55. La falta de Cortistatina favorece un aumento de la expresión de CTGF en fibroblastos pulmonares	117
Figura 56. La falta de Cortistatina aumenta la translocación nuclear de SMAD 2/3 y AKT.....	118
Figura 57. Los fibroblastos pulmonares deficientes en Cortistatina muestran un incremento en la fosforilación/activación de AKT, p38 y ERK 1/2	119
Figura 58. La carencia en Cortistatina predispone a los fibroblastos pulmonares a presentar un crecimiento más lento	120
Figura 59. La falta de Cortistatina afecta a la capacidad de migración de los fibroblastos	120
Figura 60. El tratamiento con Cortistatina disminuye la expresión de marcadores profibróticos por parte de los fibroblastos pulmonares.....	121
Figura 61. El estudio inicial de los cultivos de fibroblastos verifica su genotipo y agrupación	122
Figura 62. Los fibroblastos CST ^{+/+} y CST ^{-/-} muestran una expresión génica diferencial.....	125
Figura 63. Análisis de enriquecimiento funcional de los genes diferencialmente expresados en cultivos de fibroblastos CST ^{+/+} y CST ^{-/-}	126
Figura 64. El tratamiento protector con Cortistatina mantiene la supervivencia y el peso de los ratones con fibrosis pulmonar.....	127
Figura 65. El tratamiento protector con Cortistatina reduce la respuesta inflamatoria en animales con fibrosis pulmonar.....	128
Figura 66. El tratamiento con Cortistatina siguiendo un régimen terapéutico favorece la supervivencia de los ratones con fibrosis pulmonar	129
Figura 67. El tratamiento con Cortistatina siguiendo un régimen terapéutico reduce la progresión de la fibrosis pulmonar.....	130
Figura 68. El tratamiento con Cortistatina reduce la fibrosis dérmica y pulmonar de los ratones con esclerodermia.....	131
Figura 69. El tratamiento con Cortistatina de ratones CST ^{+/-} con fibrosis pulmonar les permite adquirir un fenotipo más resistente frente a la fibrosis	133
Figura 70. El bloqueo de los receptores de Somatostatina y Grelina impide la acción antifibrótica de Cortistatina	134
Figura 71. Secreción de Cortistatina latente	135
Figura 72. El tratamiento con Cortistatina latente de ratones con esclerodermia presenta elevados efectos terapéuticos.....	136
Figura 73. El tratamiento con Cortistatina latente es eficaz si la molécula tiene su estructura completa .	137
Figura 74. Cortistatina juega un papel doble en inflamación y fibrosis a nivel tisular	142
Figura 75. Cortistatina endógena regula la activación de los fibroblastos y el proceso fibrótico	145

Figura 76. Resumen del efecto de Cortistatina en los procesos de inflamación y fibrosis pulmonar 147

ANEXO DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos usados en la citometría de flujo

Se indica el anticuerpo, el fluorocromo acoplado y su longitud de onda (absorción máxima-emisión), y el tipo celular que reconoce. Todos los anticuerpos fueron obtenidos de la casa comercial BD Bioscience y empleados a una concentración de 4-5 µg/ml.

Anticuerpos	Fluorocromo	Absorción-emisión	Tipo celular
Anti-CD45	Ficoeritrina	650-660 nm	Población leucocitaria
Anti-CD3	Alofococianina	650-660 nm	Linfocitos T
Anti-CD64	FITC	494-520 nm	Macrófagos
anti-Ly6G	FITC	494-520 nm	Neutrófilos

Tabla 2. Anticuerpos usados en la inmunofluorescencia indirecta de αSMA sobre cortes de parafina

Se indica el anticuerpo, la casa comercial junto con la referencia asignada en el catálogo de la misma y la dilución empleada. Para el anticuerpo secundario se indica también el fluoróforo acoplado.

	Anticuerpos	Casa comercial	Dilución usada
Primario	<i>Mouse anti-αSMA</i>	Sigma-Aldrich A5228	1:1000
Secundario	<i>Goat anti-Mouse, Alexa Fluor 568</i> (Absorbancia:578 nm; Emisión:602 nm)	Thermo Fisher A11004	1:1000

Tabla 3. Primers de ratón utilizados para realizar las PCR cuantitativas de muestras de tejido y de cultivos celulares

Se indican los *primers* de Cortistatina, de sus receptores y de los marcadores relacionados con los procesos de fibrosis. Ambos *primers* (*Forward* y *Reverse*) se presentan en sentido 5' → 3'. RPLPO se empleó como normalizador. Todos los *primers* se obtuvieron de la casa comercial Sigma-Aldrich.

Gen	<i>Forward Primer</i>	<i>Reverse Primer</i>
CST	GCCTTCTGACTTTCTTGCC	GAAAGCTCCCCGCTGATTGA
SSTR1	TGCCCTTTCTGGTCACTTCC	AGCGGTCCACACTAAGCACA
SSTR2A	CCCATCCTGTACGCCTTCTT	GTCTCATTGAGCCGGGATTT
SSTR2B	TGATCCTCACCTATGCCAACA	CTGCCTTGACCAAGCAAAGA
SSTR3	GCCTTCTTCGGCCTCTACTT	GAATGCGACGTGATGGTCTT

SSTR4	AGGCTCGTGCTAATGGTGGT	GGATGAGGGACACATGGTTG
SSTR5	ACCCCTGCTCTATGGCTTT	GCTCTATGGCATCTGCATCCT
GHSR	TCAGGGACCAGAACCACAAA	CCAGCAGAGGATGAAAGCAA
αSMA	CAGGGAGTAATGGTTGGAAT	TCTCAAACATAATCTGGGT
CTGF	AGAACTGTGTACGGAGCGTG	GTGCACCATCTTTGGCAGTG
Col1a2	TCTCCTGGAAATGTTGGCCCATCT	AATCCGATGTTGCCAGCTTCACCT;
RPLPO	TGCACTCTCGCTTTCTGGAG	CTGACTTGGTTGCTTTGGCG

Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados en los *Western Blots* de proteínas de cultivos de fibroblastos

Se indica el anticuerpo, la casa comercial, la dilución usada y el peso molecular. Para las proteínas CTGF, α SMA y Col1a1 se empleó como proteína normalizadora α Tubulina. Para las quinasas fosforiladas se empleó como normalizador la misma quinasas sin fosforilar.

Anticuerpos primarios	Casa comercial	Dilución	Peso Molecular (KDa)
<i>Rabbit anti-CTGF</i>	abcam ab6992	1:1000	Dos bandas: 37-38 y 42-44
<i>Rabbit anti-αSMA</i>	Cell Signaling #19245	1:1000	42
<i>Rabbit anti-Col1a1</i>	Cell Signaling #84336	1:1000	220
<i>Mouse anti-αTubulin</i>	Sigma-Aldrich T9026	1:8000	50
<i>Rabbit anti-Phospho-Akt</i>	Cell Signaling #4056	1:1000	60
<i>Mouse anti-Akt</i>	Cell Signaling #2920	1:1000	60
<i>Mouse anti-Phospho-p38</i>	Cell Signaling #9216	1:1000	43
<i>Rabbit anti-p38</i>	Cell Signaling #9212	1:1000	43
<i>Mouse anti-Phospho-p44/42 (Erk1/2)</i>	Cell Signaling #9106	1:1000	Dos bandas: 42 y 44
<i>Rabbit anti-p44/42 (Erk1/2)</i>	Cell Signaling #4695	1:1000	Dos bandas: 42 y 44

Tabla 5. Anticuerpos secundarios empleados en los *Western Blots* de proteínas de cultivos de fibroblastos

Se indica el anticuerpo, el fluoróforo acoplado del espectro de infrarrojo cercano y la casa comercial. Para visualizar las proteínas de interés (CTGF, α SMA, Col1a1 y las quinasas fosforiladas) se emplearon anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos verdes (*IRDye 800CW*). Para las proteínas normalizadoras (α Tubulina y las quinasas no fosforiladas) se emplearon los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos rojos (*IRDye 680RD*).

Anticuerpos secundarios	Fluoróforos del espectro infrarrojo cercano	Casa comercial LI-COR Biosciences
<i>Goat anti-Rabbit</i>	<i>IRDye 800CW</i> - Verde	926-32211
<i>Goat anti-Mouse</i>	<i>IRDye 800CW</i> - Verde	926-32210
<i>Goat anti-Rabbit</i>	<i>IRDye 680RD</i> - Rojo	926-68071
<i>Goat anti-Mouse</i>	<i>IRDye 680RD</i> - Rojo	926-68070

Tabla 6. Anticuerpos usados en la inmunofluorescencia indirecta de cultivos

Se indica el anticuerpo, la casa comercial junto con la referencia asignada en el catálogo de la misma y la dilución empleada.

ANTICUERPOS PRIMARIOS		
Anticuerpos	Casa comercial	Dilución usada
<i>Rabbit anti-CTGF</i>	abcam ab6992	1:200
<i>Mouse anti-αSMA</i>	Sigma-Aldrich A5228	1:200
<i>Rabbit anti-Col1a1</i>	Cell Signaling #84336	1:200
<i>Rabbit anti-SMAD 2/3</i>	Cell Signaling #5678	1:200
<i>Rabbit anti-Akt</i>	Cell Signaling #9272	1:200
ANTICUERPOS SECUNDARIOS		
Anticuerpos	Casa comercial	Dilución usada
<i>Donkey anti-Rabbit, Alexa Fluor 488</i> (Absorbancia:496 nm; Emisión:521 nm)	Thermo Fisher A21206	1:1000
<i>Goat anti-Mouse, Alexa Fluor 488</i> (Absorbancia:496 nm; Emisión:521 nm)	Thermo Fisher A11029	1:1000

Tabla 7. Primers empleados en la validación del transcriptoma

Se indica el *primer* y su secuencia. Ambos *primers* (*Forward* y *Reverse*) se presentan en sentido 5'→3'. Todos los *primers* se obtuvieron de la casa comercial Sigma-Aldrich.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
<i>tnfsf8</i>	AGTCATGGGCCTACCTCAA	ATCAGGTTCCCGTCCTGGTA
<i>lum</i>	TGGGGTACCTGGAAACTCGT	TCCAAGCGCAGATGCTTGAT
<i>alpl</i>	GGCTACACACTTAGGGGGACCTCCA	AGCTTCGGTGACATTGGGCCGGTT
<i>ptn</i>	CCGGCAGGGTGTAGTTGAG	TGCTGATATTGCTGGGACGA
<i>cxcl5</i>	GCATTTCTGTTGCTGTTACGCTG	CCTCCTTCTGGTTTTTTCAGTTTAGC
<i>ef1a2</i>	CACCGTCAATAGGTGGACCC	GTAGATGAGGTGGCCTGTCCG
<i>il1r1</i>	ATGAGACGAAGGAGCGCCAA	TTCCAGACCCAGGACGAT
<i>adh7</i>	GAAGAGTGAACCGTGCCTCA	CAACTCTCCACAACCCCA

Tabla 8. Primers empleados para la amplificación de SPLAP

Se indica el *primer* y su secuencia. La parte de la secuencia que aparece en **negrita** en el *forward primer* se corresponde con el sitio de reconocimiento de *HindIII*; la parte en **negrita** del *reverse primer* se corresponde con el sitio de reconocimiento de *EcoRI*.

Primers	Secuencia
Forward	AAGCTT ATGCCGCCCTCCGGGCTGCGG
Reverse	GAATTC GCCTTTGCAGATGCTGGGCCCTCTCCA

Tabla 9. Primers empleados para la secuenciación de SPLAP

Se indica el *primer* y su secuencia

Primers	Secuencia
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	ATTTAGGTGACTATAG

Tabla 10. ADN de doble cadena empleados para la obtención del resto de plásmidos a partir del plásmido parental

Se indica el plásmido correspondiente y su secuencia (*forward* y *reverse*) de doble cadena correspondientes. En negrita y subrayado se indica el sitio de corte de la enzima de restricción *EcoRI*. Los dsDNA se obtuvieron liofilizados (Metabion) y se resuspendieron en *buffer* annealing de dsDNA 1X (60 mM KCl, 6 mM HEPES (Sigma-Aldrich) pH 7,5 y 0,2 mM MgCl₂) hasta una concentración de 50 µM.

Plásmido pcDNA3.1+SPLAPCST29	
Forward Primer	TCTGCAAAGC <u>GAATTC</u> CCAGGAAAGACCACCCCTCCAGCAGCCCCACACCGGGATAAAA AGCCCTGCAAGAACTTCTTCTGGAAAACCTTCTCCTCGTGCAAGTAG <u>GAATTC</u> TGCAGATATC
Reverse Primer	GATATCTGCAG <u>GAATTC</u> CTACTTGCACGAGGAGAAGGTTTTCCAGAAGAAGTTCTTGCAGG GCTTTTTATCCCGGTGTGGGGGCTGCTGGAGGGGTGGTCTTTCCTG <u>GAATTC</u> GCTTTGCAGATATC
Plásmido pcDNA3.1+SPLAPL1L2CST29	
Forward Primer	TCTGCAAAGC <u>GAATTC</u> GGGGGAGGCGGATCCGGGGGAGGGGGCTCAGCGGCCGCCAGGA AAGACCACCCCTCCAGCAGCCCCACACCGGGATAAAAAGCCCTGCAAGAACTTCTTCTGG AAAACCTTCTCCTCGTGCAAGTAG <u>GAATTC</u> TGCAGATATC
Reverse Primer	GATATCTGCAG <u>GAATTC</u> CTACTTGCACGAGGAGAAGGTTTTCCAGAAGAAGTTCTTGCAGG GCTTTTTATCCCGGTGTGGGGGCTGCTGGAGGGGTGGTCTTTCCTGGGCGGCCGCTGAGCC CCCTCCCCGGATCCGCTCCCC <u>GAATTC</u> GCTTTGCAGATATC
Plásmido pcDNA3.1+SPLAPL1 MMPL2CST29	
Forward Primer	TCTGCAAAGC <u>GAATTC</u> GGGGGAGGCGGATCCCCGCTCGGGCTTTGGGCGGGGGAGGGGG CTCAGCGGCCGCCAGGAAAGACCACCCCTCCAGCAGCCCCACACCGGGATAAAAAGCCC TGCAAGAACTTCTTCTGGAAAACCTTCTCCTCGTGCAAGTAG <u>GAATTC</u> TGCAGATATC
Reverse Primer	GATATCTGCAG <u>GAATTC</u> CTACTTGCACGAGGAGAAGGTTTTCCAGAAGAAGTTCTTGCAGG GCTTTTTATCCCGGTGTGGGGGCTGCTGGAGGGGTGGTCTTTCCTGGGCGGCCGCTGAGCC CCCTCCCCGGATCCGCTCCCC <u>GAATTC</u> GCTTTGCAGATATC

Tabla 11. RPKM de los genes expresados diferencialmente en el experimento de ARNseq

Se indica el gen y el RPKM obtenido para cada réplica de cada genotipo. Se han incluido todos los genes expresados diferencialmente de forma significativa (FFD<0,05), excepto aquellos de función desconocida.

Gen	Fibroblastos CST +/+			Fibroblastos CST -/-		
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep1	Rep2	Rep3
<i>platr16</i>	2,425	1,031	2,527	0,081	0,095	0,000
<i>zfp982</i>	0,241	0,712	1,168	0,036	0,000	0,038
<i>eef1a2</i>	1,118	0,329	2,141	0,103	0,000	0,137
<i>crabp1</i>	9,458	2,175	23,556	0,936	0,393	1,285
<i>zfp984</i>	1,190	1,754	3,244	0,313	0,130	0,197
<i>morc1</i>	2,968	0,413	2,057	0,033	0,058	0,239
<i>il1rl1</i>	21,234	2,431	14,357	5,624	0,970	1,803

<i>cck</i>	68,697	35,948	17,096	12,616	10,735	4,916
<i>adh7</i>	1,388	1,135	0,872	0,156	0,183	0,302
<i>igfbp2</i>	1991,933	585,594	789,582	35,132	394,633	208,263
<i>itgbl1</i>	9,985	3,830	9,154	3,855	1,835	2,451
<i>s100a4</i>	1754,879	660,446	1022,949	301,468	238,165	427,506
<i>rab6b</i>	2,719	2,625	2,707	0,501	1,079	0,581
<i>pdpn</i>	77,904	74,746	131,176	11,422	43,762	15,540
<i>tnfrsf1b</i>	14,705	12,254	14,814	5,548	3,174	5,566
<i>c1qtnf3</i>	18,079	11,183	11,966	1,699	5,553	3,427
<i>prrx2</i>	34,325	18,299	34,545	3,364	13,387	10,018
<i>serpine2</i>	4,584	7,691	6,538	3,203	14,400	12,109
<i>piezo2</i>	1,970	2,853	2,229	1,462	5,593	7,776
<i>ror1</i>	3,835	3,157	4,043	6,161	4,556	21,093
<i>cd55</i>	1,957	1,361	1,839	11,923	2,783	11,259
<i>gdf6</i>	2,384	2,399	3,823	16,899	7,558	19,167
<i>pitx2</i>	0,354	0,409	0,552	1,418	0,694	4,084
<i>alpl</i>	0,163	0,371	0,575	0,213	0,720	4,758
<i>lum</i>	0,732	2,011	3,551	9,924	5,878	26,789
<i>arsl</i>	0,281	0,230	0,195	0,306	0,509	4,197
<i>tbx20</i>	0,015	0,047	0,184	0,022	0,500	1,151
<i>il1rn</i>	0,022	0,304	0,283	1,657	0,422	4,636
<i>ptn</i>	0,209	0,508	1,131	0,609	1,176	19,203
<i>olfr1033</i>	0,028	0,058	0,054	0,516	0,059	2,285
<i>cxcl5</i>	0,866	0,234	1,960	0,432	0,915	54,017
<i>tnfsf8</i>	0,047	0,098	0,167	1,859	0,149	9,042