

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL, PRODUCCION ANIMAL,  
BROMATOLOGIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

PROGRAMA DE DOCTORADO:  
**CLÍNICA E INVESTIGACIÓN TERAPÉUTICA**



**CONTROL DE LA RESPUESTA INMUNO-  
INFLAMATORIA EN PULMÓN POR RECEPTORES LXR**

Memoria para optar al grado de DOCTOR presentada por

**Irene Hernández Hernández**

Irene Hernández Hernández

Fdo.: El Doctorando

Dr. Antonio Castrillo Viguera

Fdo.: El Director

Dr. Carlos Tabraue Tarbay

Fdo.: El Codirector

Dr. Félix López Blanco

Fdo.: El Codirector

Las Palmas de Gran Canaria, a                      de                      de 2014.



**Facultad de Medicina. Centro de Ciencias de la Salud**

**Universidad de Las Palmas de Gran Canaria**

El trabajo experimental de la presente memoria fue desarrollado por Dña. Irene Hernández Hernández en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología de la Facultad Medicina, Centro de Ciencias de la Salud, en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) y en la Unidad Asociada del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Agencia Estatal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Este trabajo en su conjunto ha sido desarrollado gracias a las ayudas públicas siguientes: Beca FPI, para formación de personal investigador BES-2009-012191, los proyectos de investigación SAF2008-00057 (Ministerio de Educación y Ciencia, MEC) y SAF20011-23270 (Ministerio de Ciencia e Innovación, MICINN). Asimismo, han contribuido otros proyectos como PI2007/031, de la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información; 67/05 de FUNCIS y RAPHYME CAM S2010/BMD-2350 de la Comunidad Autónoma de Madrid.





A Paco, Luisi y  
Marina

A Paco



# AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer de manera especial y sincera a Antonio Castrillo la oportunidad que me ha brindado de trabajar y aprender a su lado. A quien debo mi formación investigadora. Muchas gracias por el apoyo en los momentos de frustración, ya sabemos que eso con un buen corte....

A Félix López y Carlos Tabraue por los consejos y propuestas realizadas a lo largo de esta tesis. Y por la revisión del texto final, infinitos agradecimientos.

A Ángel Baldan, por acogerme en su laboratorio y hacerme sentir como en casa al otro lado del océano, muchas gracias por tus enseñanzas.

A mis queridísimos compañeros, que después de tantas horas compartidas, se han convertido en amigos. Muchas gracias, porque el día a día hubiese sido muy diferente sin ustedes. A mis niñas, por los *Skypes* "labos del mundo", gracias por estar ahí, para lo personal y lo laboral. Gracias especialmente a Merci, sin ti no sé qué sería de todos nosotros.

A mis amigos en Las Palmas, gracias niñas por ser soporte logístico de esta tesis, y por estar ahí para lo que sea. A mis amigos en Tenerife, con quien fue un verdadero placer estudiar la carrera y compartir todo tipo de vivencias.

A mi gran familia, siempre pendiente e interesada por el desarrollo de esta tesis. Por sus ánimos y, por qué no, por las fiestas. A Toñi, por estar siempre tan cerca.

A mi hermana Marina, por ser, además, amiga. Y por diseñar una portada maravillosa para esta tesis, gracias Marinita.

Sin duda, el mayor agradecimiento es el que siento hacia mis padres, gracias por los años de esfuerzo y sacrificio para que pudiésemos estudiar, ambas, lejos de ustedes. Por enseñarnos ser libres sin olvidar donde están las raíces. Muchas gracias.

A Paco, por ser mi compañero, mi apoyo... mi amor. Gracias por tus ánimos, y por tus paciencia, sabes que sin ti, y además de verdad, esta tesis no hubiese sido posible.



# ÍNDICE



## ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>73</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>107</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>123</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>127</b>

## Índice Detallado

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
1. FISIOLÓGÍA PULMONAR .....	9
1.1. ETAPAS DE LA MORFOGÉNESIS PULMONAR .....	9
1.2. MICROAMBIENTE ALVEOLAR .....	11
1.2.1. Tipos celulares .....	12
1.2.2. El surfactante pulmonar .....	13
2. SISTEMA INMUNITARIO .....	24
2.1. INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA .....	24
2.2. MECANISMOS DE DEFENSA PULMONAR.....	26
2.3. EL MACRÓFAGO ALVEOLAR.....	28
3. RECEPTORES NUCLEARES .....	30
3.1. SUPERFAMILIA DE LOS RECEPTORES NUCLEARES .....	30
3.2. ESTRUCTURA Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE RECEPTORES NUCLEARES.....	31
4. RECEPTORES X HEPÁTICOS (LIVER X RECEPTORS, LXR) .....	34
4.1. LXR: ISOFORMAS, LIGANDOS Y DISTRIBUCIÓN .....	34
4.2. LXR EN EL METABOLISMO LIPÍDICO .....	35
4.3. LXR INFLAMACIÓN E INMUNIDAD.....	37
4.4. LXR EN EL PULMÓN. ....	41
<b>OBJETIVOS</b> .....	43
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	47
1. MODELOS EXPERIMENTALES.....	49
1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	49
1.2 CULTIVO CELULARES.....	49
1.2.1 Cultivo primario de las poblaciones celulares derivadas del lavado broncoalveolar (broncoalveolar lavage, BAL) .....	50
1.2.2 Cultivo primario de pneumocitos de rata (RT2P).....	50
1.2.3 Cultivo primario de pneumocitos de ratón (MT2P) .....	53
1.2.4 Cultivo primario de macrófagos peritoneales de ratón .....	55
1.2.5 Cultivo de la línea celular MLE-12 .....	56
1.3 MODELO DE INDUCCIÓN DE LIPIDOSIS EN MACRÓFAGOS PERITONEALES Y CÉLULAS MLE-12.....	56



1.4	MODELO DE TRASPLANTES DE MÉDULA ÓSEA .....	57
2.	TÉCNICAS HISTOLÓGICAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA .....	59
2.1	RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS .....	59
2.2	OBTENCIÓN DE CRIOSECCIONES .....	59
2.3	TINCIONES .....	59
3.	TÉCNICA HISTOLÓGICA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA .....	60
4.	CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS .....	61
4.1	INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS PARTIR DE EXTRACTOS CELULARES: WESTERN-BLOT (WB) .....	61
4.1.1	Obtención de proteínas totales. ....	61
4.1.2	Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) .....	61
4.1.3	Transferencia e inmunodetección.....	62
4.2	INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS EN CULTIVO: INMUNOCITOQUÍMICA (ICQ) .....	62
4.3	INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN TEJIDOS .....	63
4.3.1	Inmunofluorescencia en tejidos congelados (IF) .....	63
4.3.2	Inmunohistoquímica en tejidos congelados (IHQ).....	64
5.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....	65
5.1	EXTRACCIÓN DE RNA.....	65
5.2	RT-QPCR (REVERSE TRANSCRIPTION QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION).....	65
6.	EVALUACIÓN DEL METABOLISMO LIPÍDICO EN PULMÓN .....	66
6.1	EVALUACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA DE LA ACUMULACIÓN LIPÍDICA DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES EN CULTIVO.....	66
6.2	DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES LIPÍDICAS DEL PULMÓN MEDIANTE CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA DE ALTA EFICIENCIA .....	67
7.	EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS CELULAR MEDIANTE TÉCNICA DE TÚNEL .....	68
8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	69
➤	ANEXO .....	70
	<b>RESULTADOS</b> .....	73
1.	LOS PULMONES DE ANIMALES LXR $\alpha\beta$ -/- DESARROLLAN INFLAMACIÓN Y LIPIDOSIS .....	75
1.1.	Acumulación celular y lipídica progresiva en los pulmones LXR $\alpha\beta$ -/-.....	75
i.	Análisis histológico de pulmones de animales WT, LXR $\alpha$ -/-, LXR $\beta$ -/-, LXR $\alpha\beta$ -/- .....	75
ii.	Estudio de la actividad transcripcional de LXR en pulmón total .....	80

iii. Expresión de genes relacionados con la inflamación y el metabolismo del líquido surfactante .....	81
1.2. Diferente composición celular del lavado broncoalveolar en animales LXR $\alpha\beta$ -/- .....	83
i. Recuento celular WT vs. DKO .....	83
ii. Presencia de macrófagos espumosos y cristales en el BAL de animales LXR $\alpha\beta$ -/- .....	84
1.3. Caracterización del perfil lipídico pulmonar.....	86
i. En pulmón total .....	86
ii. En Fluido del Lavado Broncoalveolar (BALF).....	87
iii. Expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico .....	87
2. TRASPLANTES DE MÉDULA ÓSEA EN RATONES WT Y LXR $\alpha\beta$ -/- .....	91
2.1. Reconstitución de los macrófagos alveolares en trasplantes de médula ósea en animales WT y LXR $\alpha\beta$ -/- .....	91
3. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LXR EN CULTIVOS DE PNEUMOCITOS.....	96
3.1. ACTIVIDAD LXR EN PNEUMOCITOS TIPO II, MLE-12.....	96
3.1.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LXR EN CÉLULAS MLE-12 .....	96
3.1.2. EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LOS AGONISTAS DE LXR EN CULTIVO DE MLE-12 .....	98
4. ACTIVIDAD DE LXR EN CULTIVOS CELULARES EN PRESENCIA DE FLUIDO BRONCOALVEOLAR.....	99
4.1. MODELO IN VITRO DE INDUCCIÓN DE LIPIDOSIS.....	99
4.1.1. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL BALF EN CULTIVO DE MACRÓFAGOS PERITONEALES.....	100
4.1.2. LA ACTIVIDAD DE LXR REGULA LA UTILIZACIÓN DEL SURFACTANTE NATURAL (BALF) EN CULTIVOS DE CÉLULAS MLE-12.....	101
5. DEFECTO EN EL METABOLISMO DEL MATERIAL SURFACTANTE EN LOS PNEUMOCITOS TIPO II DE ANIMALES LXR $\alpha\beta$ -/- .....	103
5.1. ESTUDIO DE PNEUMOCITOS PRIMARIOS .....	103
5.1.1. LXR SE ENCUENTRA REGULADO EN PNEUMOCITOS PRIMARIOS DE RATA.....	103
5.1.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE PNEUMOCITOS PRIMARIOS TIPO II DE RATONES WT Y LXR $\alpha\beta$ -/- .....	104
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>107</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>123</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>127</b>

# **ABREVIATURAS**



---

**ABREVIATURAS**

<b>22-OH</b>	22- hidroxicolesterol
<b>9cRA</b>	Ácido 9-cis-retinoico
<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>ABCA</b>	Familia de transportadores de membrana de unión a ATP tipo "Cassette"
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>ACAT</b>	Acetil-CoA acetiltransferasa
<b>ACC</b>	Acetil CoA carboxilasa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AF</b>	Dominio de función activadora
<b>AIM</b>	Inhibidor de la apoptosis en macrófagos
<b>AP</b>	Proteína activadora
<b>APO</b>	Apolipoproteína
<b>ARN</b>	Acido ribonucleico
<b>AT</b>	Timocitos apoptóticos
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BAL</b>	Lavado Broncoalveolar
<b>BALF</b>	Fluido del Lavado broncoalveolar
<b>BALT</b>	Tejidos linfoides asociados a bronquios
<b>Bcl</b>	<i>Apoptosis inhibitory protein</i>
<b>BHT</b>	Butilhidroxitolueno
<b>BMT</b>	<i>Bone marrow transfer</i>
<b>BSA</b>	Albumina de suero bovino
<b>C/EBP<math>\alpha</math></b>	<i>CCAAT-enhancer-binding protein family of transcription factors</i>
<b>CL</b>	Cuerpos lamelares
<b>CMV</b>	Cuerpos multivesiculares
<b>Cyp7a1</b>	Citocromo P450, familia 7, subfamilia A, polipéptido 1
<b>DAB</b>	Diaminobencidina
<b>DAGs</b>	Diacilgliceroles
<b>DAPI</b>	4,6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
<b>DBD</b>	<i>DNA Binding Domain</i>
<b>DMA</b>	Dimetil acetales
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DNAasa</b>	Deoxiribonucleasa
<b>DPPC</b>	Dipalmitoilfosfatidilcolina
<b>DR</b>	Repeticiones directas
<b>EDTA</b>	Etilendiamino tetraacetato sódico
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EPOC</b>	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
<b>FAME</b>	Metil esteres de ácidos grasos
<b>FAS</b>	Sintasa de ácidos grasos
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal
<b>FGF y</b>	<i>Fibroblast growth factor</i>
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína

---

---

<b>FOXA</b>	Forkhead box receptors family members
<b>FXR</b>	Receptores X de farnesoides
<b>GATA</b>	<i>GATA family of zinc finger transcription factor</i>
<b>GFP</b>	Proteína fluorescente verde
<b>GLUT 4</b>	Transportador de glucosa-4
<b>GM-CSF</b>	Factor de maduración de macrófagos
<b>GuSCN</b>	<i>Guanidinium isothiocyanate</i>
<b>GPAT</b>	Glycerol-3-fosfato aciltransferasa
<b>HBSS</b>	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
<b>HDAC3</b>	Histona deacetilasa-3
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>HMGCR</b>	3- hidroxil-3 metilglutaril-CoA reductasa
<b>HPTLC</b>	Cromatografía en capa fina de alta eficacia
<b>HREs</b>	Elementos de respuesta hormonales
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>HSP</b>	<i>Heat Shock Proteins proteínas de choque térmico</i>
<b>HUFA</b>	Ácidos grasos altamente insaturados
<b>ICQ</b>	Inmunocitoquímica
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia en tejidos congelados
<b>IgA</b>	Inmunoglobulinas tipo A
<b>IgE</b>	Inmunoglobulinas tipo E
<b>IgG</b>	Inmunoglobulinas tipo G
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica en tejidos congelados
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>iNOS</b>	Sintasa de óxido nítrico inducible
<b>ITS</b>	Insulina, transferrina, Sodio-selenito
<b>LBD</b>	<i>Ligand Binding Domain</i>
<b>LCAT</b>	Lecitina-colesterol aciltransferasa
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad circulantes
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>LDLR</b>	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
<b>lisoPC</b>	Lisofosfatidilcolina
<b>LM</b>	Listeria monocytogenes
<b>LPCAT</b>	Lisofosfatidil aciltransferasas
<b>LPCAT-1</b>	Lisofosfatidilacetiltransferasa- 1
<b>LPL</b>	Lipoproteína lipasa
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido bacteriano
<b>LXR</b>	Receptores X hepáticos
<b>MALT</b>	Tejidos linfoides asociados a mucosas
<b>MCP</b>	Proteína quimioatrayente de monocitos
<b>MER</b>	Receptor de células apoptóticas de la familia de las tirosina kinasas
<b>MHC</b>	Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad
<b>MIP</b>	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
<b>MLE -12</b>	<i>Murine lung epithelial-12 cell line</i>
<b>MMP-9</b>	Metalopeptidasa de matriz

---

---

<b>MØp</b>	Macrófagos peritoneales
<b>MT</b>	Mielina tubular
<b>MT2P</b>	Mouse type II pneumocytes
<b>NCoR</b>	<i>Nuclear-receptor co-repressor</i>
<b>NEBs</b>	<i>Neuroendocrine bodies</i>
<b>Nedd4-2</b>	<i>E3 ubiquitin-protein ligase</i>
<b>NF-1</b>	<i>Nuclear factor-1</i>
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear kappa de células B
<b>NK</b>	Célula Natural Killer
<b>NO</b>	Oxido Nítrico
<b>PA</b>	Ácido fosfatídico
<b>PAMPs</b>	<i>Pathogen-associated Molecular Patterns</i>
<b>PAS</b>	Tinción del Ácido Peryódico de Schiff
<b>PAS-D</b>	Tinción del Ácido Peryódico de Schiff- Diastasa
<b>PBS</b>	Tampon fosfato salino
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina
<b>PFA</b>	Paraformaldehido
<b>PG</b>	Fosfatidilglicerol
<b>PI</b>	Fosfatidilinositol
<b>PI</b>	Índice de peroxidabilidad
<b>PKC</b>	Proteína kinasa C
<b>PLPT</b>	Proteína transportadora de fosfolipidos
<b>PNEC</b>	<i>Pulmonary neuroendocrine cells</i>
<b>POD1.</b>	<i>Basic helix-loop hélix transcription factor</i>
<b>PPAR</b>	Receptores activados por proliferadores peroxisomales
<b>PRDX-6</b>	Peroxiredoxina 6
<b>PRRs</b>	Receptores de reconocimiento de patógenos
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>PtdSer</b>	Fosfatidil serina
<b>PUFA</b>	Ácidos grasos poliinsaturados
<b>RARs</b>	Retinoica cid receptos
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo celular desarrollado en Roswell Park Memorial Institute
<b>RSV</b>	Virus Sincitial Respiratorio
<b>RT2P</b>	<i>Rat type II pneumocytes</i>
<b>RT-qPCR</b>	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo Real
<b>RXR</b>	Receptores X de retinoides
<b>RXR<sub>s</sub></b>	Receptores X del ácido retinoico
<b>SCD-1</b>	<i>Stearoyl CoA desaturase-1</i>
<b>SDRA</b>	Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
<b>SLE</b>	Lupus eritematoso

---

<b>SM</b>	Esfingomiélinea
<b>SMAD3</b>	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 3</i>
<b>SMRT</b>	<i>Silencing mediator of retinoid acid and thyroid-hormone receptors</i>
<b>SP-A</b>	Proteína surfactante A
<b>SP-B</b>	Proteína surfactante B
<b>SP-C</b>	Proteína surfactante C
<b>SP-D</b>	Proteína surfactante A
<b>SPP</b>	Fosfoproteína secretada
<b>SRC</b>	<i>Steroid receptor co-activator</i>
<b>SRD</b>	Síndrome de distrés respiratoria
<b>SREBP-1c</b>	Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides 1c
<b>STAT</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
<b>SULT2B1</b>	Sulfotransferasa de oxysteroides
<b>TBS</b>	Tris-HCl, 50 mM pH 7.4, NaCl 200 mM
<b>TBS-T</b>	TBS con el detergente Tween-20 al 0,1 %
<b>TGF- <math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante- $\beta$
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Factor transformante $\alpha$
<b>THP-1</b>	<i>Human acute monocytic leukemia cell line</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll like receptors</i>
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TPA</b>	12-O-tetradecanoylforbol-13-acetato
<b>TTF1</b>	<i>Thyroid transcription factor</i>
<b>TUNEL</b>	Tdt- Mediated dUTP Nick End Labelling
<b>UI</b>	Índice de insaturación
<b>UTP</b>	Uracil trifosfato
<b>WB</b>	<i>WESTERN-BLOT</i>
<b>WT</b>	<i>Wildtype</i> (tipo salvaje)



# **INTRODUCCIÓN**



---

## INTRODUCCIÓN

### 1. FISIOLÓGÍA PULMONAR

La respiración es el proceso fisiológico, esencial para la vida, mediante el cual nuestro organismo capta el oxígeno que necesita para sus funciones metabólicas y desecha el dióxido de carbono.

El aparato respiratorio es el encargado de permitir este intercambio gaseoso entre el aire y la sangre en los mamíferos. Se compone de cavidad nasal, faringe, laringe y tráquea, la cual se ramifica en bronquios, bronquiolos y conductos alveolares hasta llegar a los sacos alveolares, donde se encuentran los alvéolos. Las primeras 16 ramificaciones, hasta los bronquiolos, forman la zona de conducción de las vías respiratorias. La 17ª y 19ª generación constituye la zona de transición. Ésta da paso de la 20ª a la 23ª generación (ductos y sacos alveolares) que forman la zona de intercambio gaseoso (Lorenz, 1966) . Esta última, la zona respiratoria, es donde se encuentran los alvéolos. Constituyen la unidad funcional de intercambio respiratorio junto con los capilares. Se trata, por tanto, de un complejo sistema de túbulos ramificados, revestidos de epitelio, en estrecho contacto con conductos vasculares y linfáticos.

La formación de los pulmones ocurre relativamente tarde en la evolución y representan la singular solución a la supervivencia terrestre de los vertebrados. Su morfogénesis depende de la interacción de complicadas redes de genes y factores de transcripción. Esta complejidad se evidencia en el hecho de que es un órgano derivado de las tres hojas blastodérmicas; ectodermo, endodermo y mesodermo de los que a su vez se diferencian una gran variabilidad de tipos celulares (Maeda, Davé, & Whitsett, 2007).

Este sistema se desarrolla en la vida prenatal y postnatal, existiendo amplias diferencias en las fechas y duración de eventos específicos entre especies. En el caso del ratón podemos diferenciar 5 etapas.

#### 1.1. ETAPAS DE LA MORFOGÉNESIS PULMONAR

Las etapas del desarrollo embrionario del ratón fueron descritas en el clásico estudio de Karl Theiler en 1989. En base a estos estadios, más recientemente, los avances en biología celular y molecular han hecho posible una descripción más exhaustiva y detallada de la morfogénesis pulmonar (Maeda et al., 2007). Estas son:

**1.-Embrionaria, E9-11.5.** Los eventos iniciales ocurren en el estadio E8.5-9.5 (Figura 1A) donde las células progenitoras de la tráquea (Tr) y el pulmón (Lu) surgen desde la porción ventral del intestino anterior. En el estadio E9.5 los brotes primarios de los primordios de la tráquea y los pulmones comienzan su formación. En E10 estos primordios se elongan mientras la tráquea comienza a separarse del esófago primitivo (Es). En E10.5 los brotes secundarios aparecen a partir de los primarios (inserto Figura 1A). En este estadio el factor de transcripción TTF1 (thyroid transcription factor) tiene una principal relevancia ya que marca el lugar de donde surgen los primordios pulmonares. Además, otros factores como los de la familia FOXA, FGF y receptores del ácido retinoico (RARs) juegan un papel importante en la morfogénesis temprana del pulmón.

**2.-Pseudoglandular, E11.5-16.5.** El epitelio sufre sucesivas ramificaciones, formándose el patrón proximal y distal que conformará el árbol bronquial. (Flechas 1, 2, 3, que representan los brotes primarios, secundarios y terciarios, respectivamente). Durante este periodo también se formarán las glándulas (Figura 1B, derecha, H&E del E15.5), además de la subdivisión de los lóbulos que serán revestidos de células mesoteliales de la pleura. Los ratones tienen un lóbulo izquierdo (LLu) y cuatro derechos (RLu). Comienza la vasculogénesis, la inervación, la diferenciación y migración de células musculares lisas y, además, aparece el cartílago en la parte ventral. Estos últimos eventos se derivan del compartimento mesodérmico en el que los factores de transcripción más importantes identificados incluyen FOXF1, FOXM1B y POD1.

**3.-Canalicular, E16.5-17.5.** El principal evento consiste en la diferenciación de los diferentes tipos celulares del epitelio pulmonar; tráquea y bronquios se constituyen en un epitelio pseudoestratificado compuesto por células basales, células de Clara (secretoras) y células ciliadas; bronquiolos y sacos alveolares se componen de un epitelio columnar simple con células primarias secretoras (Clara) y ciliadas. También, se diferencian las células neuroendocrinas (PNEC, *pulmonary neuroendocrine cells*), a veces en grupo (NEBs, *neuroendocrine bodies*) que secretan algunos péptidos como la serotonina, bombesina y calcitonina. Se organiza la vascularización, los acinos pulmonares y se incrementa la vascularización. Los principales factores de transcripción que dirigen esta fase son TTF-1, NF-1, GATA-6, y otros.

**4.-Sacular, E17.5- PN5.** El periodo sacular-alveolar representa una etapa especialmente vulnerable en el desarrollo de los mamíferos, y marca la transición de los pulmones llenos de líquido a llenos de aire, paso determinante en la supervivencia en el momento

del nacimiento. En los últimos días prenatales, en los túbulos epiteliales distales se diferencian los pneumocitos tipo I y tipo II (Figura 1C) que se expanden para formar sáculos (Flechas), la región de intercambio gaseoso primitiva (Figura 1C, E18, H&E, panel derecho). Comienza la síntesis de material surfactante. Justo antes del nacimiento, estos alvéolos primigenios (sáculos) se dilatan, los pneumocitos tipo I se alargan y se aproximan a los vasos sanguíneos, de manera que el intercambio gaseoso se facilita. En el momento del nacimiento la resistencia vascular cae, la sangre pulmonar fluye, el fluido del interior de los sáculos se reabsorbe y el material surfactante es secretado a su interior con la primera inspiración, reduciendo la tensión superficial y previniendo el colapso alveolar una vez que éstos se han llenado de aire. Factores de transcripción principales en la maduración perinatal del pulmón son TTF1, C/EBP $\alpha$ , FOXA2, y la expresión del receptor de Glucocorticoides.

**5.-Alveolar, PN5-28.** Crecimiento y septación del alvéolo, maduración del sistema vascular pulmonar. Factores de transcripción implicados, GATA-6, TTF-1, RARs y SMAD3.

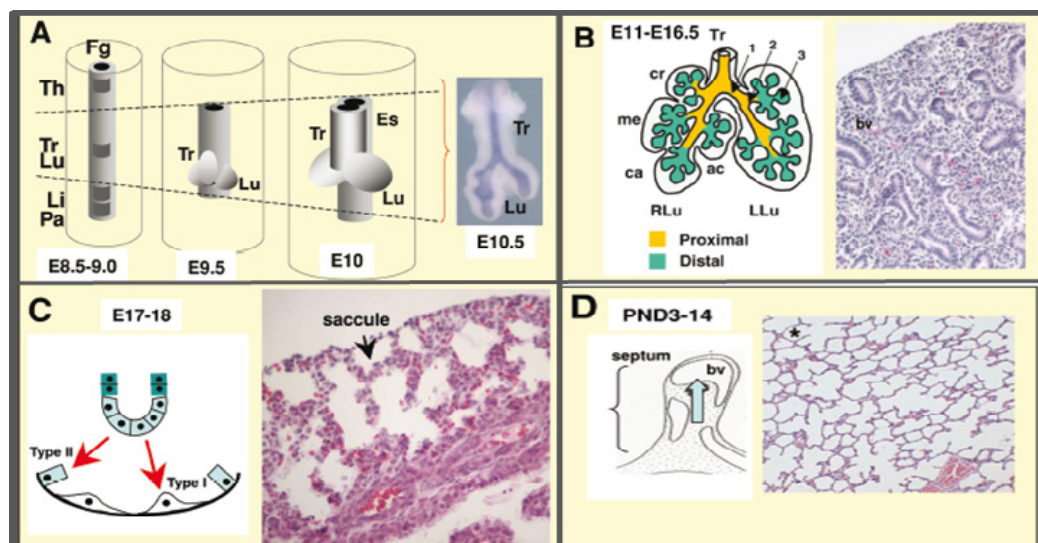


Figura 1. Desarrollo del sistema respiratorio en el ratón. (Cardoso & Kotton, 2008)

## 1.2. MICROAMBIENTE ALVEOLAR

Una vez hayan madurado los pulmones, la barrera hematogaseosa quedará conformada por el grosor de las extensiones citoplasmáticas de los pneumocitos tipo I, la lámina basal y el endotelio. Esta barrera es de unas 0,44  $\mu\text{m}$  de espesor en el caso del ratón (Maina & West, 2005). El alvéolo, en su conjunto, quedará constituido por el epitelio alveolar, con sus dos tipos celulares,

pneumocitos tipo I y tipo II y por macrófagos alveolares que realizarán funciones relacionadas con la inmunidad innata, así como en el metabolismo del surfactante.

### 1.2.1. Tipos celulares

- **Pneumocitos tipo I.** Representan el 8% del total de células del epitelio alveolar pero constituyen el 90-95% de su superficie. Esto se debe a que son células planas con largas prolongaciones citoplasmáticas, cuya función principal es formar parte de la delgada barrera hematogaseosa. De esta manera, permiten el intercambio gaseoso por difusión pasiva. Los pneumocitos tipo I podrían tener un papel importante en el mantenimiento del fluido alveolar ya que expresan canales iónicos y acuaporina y, además, forman entre ellos uniones ocluyentes evitando que se escape el líquido tisular al espacio alveolar. Otra característica importante es que tienen pocos orgánulos y por lo tanto baja actividad metabólica. Además no se dividen, siendo los pneumocitos tipo II quienes dan lugar a los tipo I (Herzog, Brody, Colby, Mason, & Williams, 2008).
- **Pneumocitos tipo II.** Son mucho más numerosos que los del tipo I pero sólo recubren el 5-10% de superficie del epitelio alveolar. Claramente polarizados y con morfología secretora, forma cúbica y microvellosidades en su parte apical, están localizados en las esquinas de los alvéolos (Maina & West, 2005). Su principal función es la síntesis y reciclaje del material surfactante (su composición y metabolismo se detalla más adelante), que es empaquetado en sus orgánulos característicos, los cuerpos lamelares (CL) y cuerpos multivesiculares (CM). También, tienen un papel importante en el transporte de fluidos gracias a la acción de sus canales apicales de iones  $\text{Na}^+$  y la ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  basolateral (Matthay et al., 2000). Además, desempeñan un papel en la inmunidad innata, fabricando las proteínas surfactantes SP-A y SP-D, opsoninas que regulan funciones inflamatorias, y produciendo citoquinas y factores de crecimiento que afectan a las células inmunes (O'Brien, Standiford, Christensen, Wilcoxon, & Paine, 1998; Zissel et al., 2000).
- **Macrófagos alveolares.** Son las principales células presentadoras de antígeno de los pulmones, y juegan un papel principal regulando la respuesta inmune innata frente a patógenos y alérgenos. También, son importantes en el catabolismo del material surfactante, degradándolo y manteniendo constantes los niveles y calidad de surfactante en el alvéolo.

- 
- **Fibroblastos intersticiales.** Involucrados en el mantenimiento estructural del alvéolo ya que se encargan de secretar las proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno y elastina, entre otros.
  - **Células dendríticas.** Son células del sistema inmune que se encuentran en estado inmaduro en los tejidos. En el caso del tejido pulmonar, las células dendríticas fagocitan los antígenos que llegan por vía respiratoria. Este fenómeno promueve su maduración y migración a los ganglios cercanos por vía linfática donde interactúan con los linfocitos T. En este sentido, cada uno de los subtipos de células dendríticas estimula de manera diferente los linfocitos CD4 y CD8. Son células fundamentales en el establecimiento de la respuesta inmune innata así como en la inmunidad adquirida.

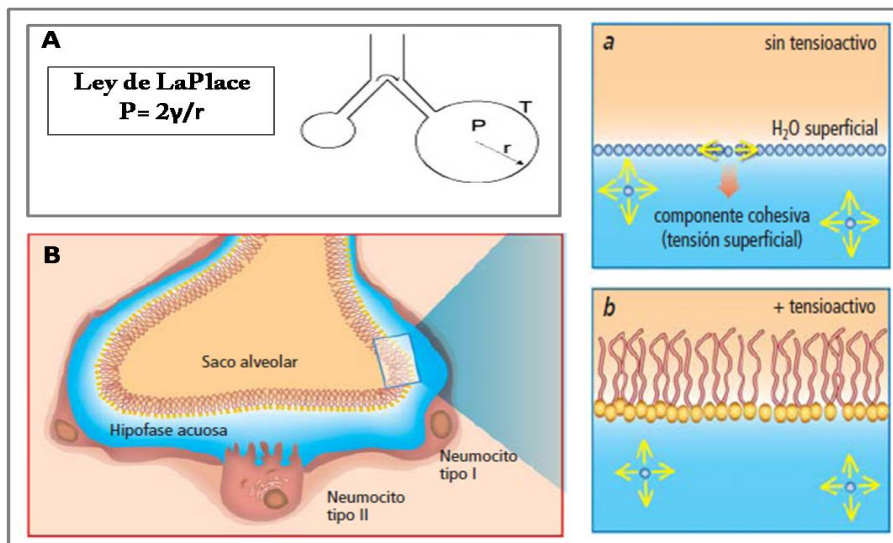
### 1.2.2. El surfactante pulmonar

El surfactante pulmonar, producido en los pneumocitos tipo II, es un complejo lipoproteico cuya función principal es disminuir la tensión superficial en la interfase aire-líquido de los alvéolos. De esta manera, evita el colapso que se produciría sin su presencia durante la espiración. También, tiene un importante papel en la defensa inmune innata del pulmón frente a patógenos y un efecto anti edematoso, ya que contribuye a evitar que el líquido intersticial penetre en el espacio alveolar.

#### - Funciones del surfactante pulmonar

La función principal del surfactante pulmonar consiste en mantener la estabilidad alveolar a volúmenes pulmonares bajos (Van Golde, Batenburg, & Robertson, 1988). La tensión superficial es la fuerza que tiende a reducir al mínimo el área que ocupa una superficie líquida. Las fuerzas cohesivas entre moléculas dentro de un líquido están compartidas con todos los átomos vecinos. Las de la superficie no tienen átomos por encima y presentan fuerzas atractivas más fuertes sobre sus vecinas (Figura 2, a). Esto hace que la superficie del líquido tienda a contraerse al área mínima permitida, haciendo necesario aplicar un trabajo para ensanchar dicha superficie. Si suponemos a los alvéolos como cavidades esféricas, se puede aplicar la Ley de LaPlace, según la cual la presión (P) que soporta el alvéolo debida a la tensión superficial ( $\gamma$ ) es directamente proporcional a ésta e inversamente proporcional al radio del alvéolo (r). En ausencia de surfactante, las diferencias de presión entre los alvéolos mayores y los menores producirían el colapso de éstos últimos durante la espiración, es decir, los menores se vaciarían en el interior de los mayores (Figura 2.A). Por lo

tanto, el surfactante es una sustancia tensoactiva que disminuye la presión superficial en la interfase aire-líquido del alvéolo (Figura 2, b).



**Figura 2. Ley de Laplace y el surfactante pulmonar:** El alvéolo pequeño tiende a vaciarse en el interior del grande en ausencia de surfactante (A). El surfactante se interpone en la interfase aire-líquido de los alvéolos (B). Sin tensoactivo (surfactante), la presión superficial sería mayor y no permitiría las sucesivas inspiraciones y espiraciones (a). Con tensoactivo esta presión disminuye permitiendo la respiración (b) (Jesus Perez-Gil, 2010).

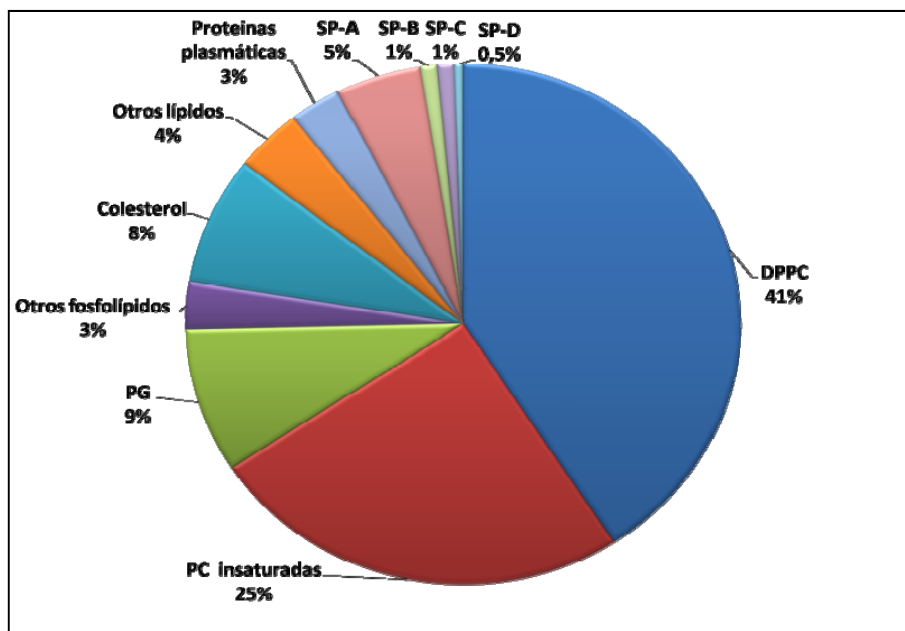
El surfactante es responsable, también, de impedir el edema pulmonar, es decir, tiene un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del líquido alveolar (Ganter, Ganter, Jakob, & Takala, 2006). En condiciones normales siempre existe un pequeño flujo de líquido de plasma al intersticio, aunque la mayoría de esta filtración es eliminada por el sistema linfático. Si por alguna patología, el surfactante se encuentra dañado, aumenta la presión superficial del pulmón y, como consecuencia, aumentaría la presión hidrostática de los capilares, produciéndose un aumento en la permeabilidad vascular al intersticio y al espacio alveolar (Günther et al., 2001).

Otra función importante del surfactante es la defensa frente a patógenos. El epitelio alveolar constituye la mayor superficie de contacto del organismo con su entorno y con ello una exposición continua a entidades patógenas. El surfactante pulmonar es la primera barrera defensiva con la que se encuentran, impidiendo su adhesión al epitelio alveolar. También, establece sistemas de inmunidad innata, siendo SP-A y SP-D, proteínas componentes del surfactante, capaces de unirse a la superficie de microorganismos, promover la fagocitosis por parte de macrófagos o inducir la producción de citoquinas por parte de los neumocitos tipo II (estas funciones se detallan más adelante) (Crouch & Wright, 2001).



## - Composición y síntesis del surfactante pulmonar

Su composición consiste en, aproximadamente, un 90% de lípidos y un 10% de proteínas (Figura 3).



**Figura 3. Composición del surfactante pulmonar.** DPPC, dipalmitoilfosfatidilcolina; PC, fosfatidilcolina; PG, fosfatidilglicerol. SP-A,B,C y D, proteínas surfactantes A,B,C y D.

### Fracción lipídica

El contenido lipídico está principalmente constituido por fosfolípidos, mayoritariamente por la especie disaturada de la fosfatidilcolina (PC), la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Sus dos cadenas acilo saturadas confieren a la monocapa, formada en la superficie interfacial, un alto grado de empaquetamiento capaz de evitar las altas presiones que suponen los ciclos respiratorios de inspiración-espriación (J Pérez-Gil & Keough, 1998; Veldhuizen Ruud, Nag Kaushik, Orgeig Sandra, 1998). El segundo fosfolípido más abundante es el PG (10% del total de la fracción lipídica), cuya enzima limitante es la fosfatidilglicerolfosfato sintasa, que transforma el CDP-diacilglicerol a fosfatidilglicerol fosfato (Batenburg, 1992).

No todo el surfactante está constituido por lípidos saturados. También existen menores cantidades de otros fosfolípidos insaturados: PC, fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) y esfingomielina (SM). Esta distribución de PC monoinsaturadas, aún con algunas pequeñas variaciones, está bien conservada entre los mamíferos. Son necesarias en los procesos de adsorción y extensión de las monocapas (Postle,

Heeley, & Wilton, 2001). Nos encontramos con que el surfactante contiene cantidades casi equimolares de fosfolípidos disaturados e insaturados que hace posible la coexistencia de microdominios ordenados y fluidos necesarios para el correcto funcionamiento del surfactante.

Además, también hay lípidos neutros, en su mayoría colesterol, cuya función no está del todo clara, aunque se cree que probablemente confieren fluidez a las, altamente empaquetadas, monocapas ricas en DPPC. Los lípidos minoritarios como lisofosfatidilcolina, PE o PA (ácido fosfatídico) podrían inducir las estructuras curvas en la mielina tubular (Veldhuizen & Haagsman, 2000).

La síntesis de los fosfolípidos del surfactante ocurre en el RE de los pneumocitos tipo II, es la denominada síntesis “de novo”. El sustrato para ello es la glucosa circulante en adultos y el glicerol en el periodo neonatal. Se requiere de la síntesis de ácido fosfatídico para la generación de todos los glicerofosfolípidos. El diacilglicerol generado es transformado por enzimas para generar compuestos con diversas cabezas polares PC, PG o PI (Batenburg, 1992). Los ácidos grasos provienen de la circulación en su forma libre o como triacilgliceroles en lipoproteínas y también pueden ser liberados de la hidrólisis de fosfolípidos cuando son recuperados desde el alvéolo (Batenburg & Haagsman, 1998). En cuanto al colesterol, principal lípido neutro del surfactante, se ha visto que, al menos el 80%, proviene de las lipoproteínas de baja densidad circulantes (LDL) y de alta densidad (HDL). Se ha demostrado la presencia de receptores para LDL o HDL en los pneumocitos tipo II (Voyno-Yasenetskaya, Dobbs, Erickson, & Hamilton, 1993). La biosíntesis de colesterol por parte del pneumocito tipo II depende del nivel de estas lipoproteínas en sangre.

Es importante resaltar que existe otra vía de producción de fosfolípidos, la del “remodelamiento vía lysoPC”. En este proceso, la DPPC sufre dos modificaciones enzimáticas sucesivas; la primera, una desacilación (pierde uno de sus dos ácidos palmíticos) convirtiéndose eventualmente en lysoPC, y en la siguiente lo recupera por acción de otra enzima, volviendo de nuevo a generarse la DPPC.

Esta vía constituye el 75% de la DPPC en los pneumocitos tipo II. En la desacilación de la PC suele actuar una fosfolipasa A2 dependiente de calcio (Filgueiras & Possmayer, 1990). La peroxiredoxina 6 (PRDX-6), calcio independiente, puede contribuir en este proceso de desacilación (J. W. Chen, Dodia, Feinstein, Jain, & Fisher, 2000) (Fisher & Dodia, 2001). Las enzimas encargadas de la reacilación forman parte de la familia de las lisofosfatidilcolina aciltransferasas, por ejemplo la LPCAT-1 (Nakanishi et al., 2006).

---

## Fracción proteica

El surfactante pulmonar contiene 4 proteínas características, denominadas proteínas surfactantes (SP), agrupadas en dos sub-familias. (Figura 4)

### i. SP-B y SP-C

Son hidrofóbicas y constan de polipéptidos catiónicos de tamaño reducido. Se asocian, junto con los lípidos del surfactante, a la interfase aire-líquido alveolar y determinan las propiedades biofísicas de los lípidos del surfactante.

La SP-B es una proteína hidrofóbica con carga neta positiva, teniendo cada monómero del homodímero unos 9 KDa, 79 aminoácidos y 6 cisteínas que forman puentes disulfuro intramoleculares (Johansson & Curstedt, 1997). Es sintetizada, en el interior de los pneumocitos tipo II, como una pro-proteína soluble que es procesada hasta convertirse en un pequeño péptido asociado a lípidos, a través de la vía secretora distal, es decir, para ser secretada en el espacio alveolar. Este procesamiento ocurre en los cuerpos multivesiculares (CMV) y en los cuerpos lamelares (CL) a través de la acción de enzimas como Napsin A, Cathepsin H y Pepsinógeno C (Brasch et al., 2004) (Foster, Aktar, Kopf, Zhang, & Guttentag, 2004)(Brasch et al., 2004) (Ueno et al., 2004). La SP-B madura facilita la organización de las membranas surfactantes en el interior de los cuerpos lamelares, promoviendo los contactos membrana-membrana, perturbando el empaquetamiento de los lípidos y la fusión de membranas (Serrano & Pérez-Gil, 2006). La mutación o deficiencia del gen de la SP-B produce el Síndrome de distrés respiratorio en recién nacidos (SRD, Síndrome de distrés respiratoria en bebés) (Whitsett, Wert, & Weaver, 2010). Los ratones SP-B<sup>-/-</sup> mueren al nacer, debido a un fallo por atelectasia. Además, no se observan las estructuras de mielina tubular y los pneumocitos tipo II presentan cuerpos lamelares incompletos. En cuanto a la expresión del resto de proteínas del surfactante, se ha observado que el contenido de los mRNA (ácido ribonucleico mensajero) de SP-A y SP-C permanece inalterado en ratones SP-B<sup>-/-</sup>. Sin embargo, se detecta una forma aberrante de la pro-SP-C (proforma de la proteína SP-C) de 8,5 KDa, si bien los niveles de su forma procesada se encuentran muy disminuida(Clark et al., 1995).

La SP-C, a diferencia de la SP-B, que también es sintetizada por las células de Clara, es producida únicamente por los pneumocitos tipo II. Inicialmente es una pro-proteína de 21 KDa (pro-SP-C) que sufre modificaciones postraduccionales hasta convertirse en una proteína integral de membrana madura (4,2 KDa) a través de la vía secretora distal, al igual que ocurre con la SP-B,

dirigiéndose a través de CMV y CL. También, en el caso de la SP-C se ha visto que las enzimas Napsin A y Cathepsin H están implicadas en esta maduración (Brasch et al., 2002), lo que sugiere que ambas proteínas comparten la misma maquinaria enzimática para su maduración. Una de las modificaciones postraduccionales, ampliamente estudiada, es la palmitoilación de dos cisteínas 5 y 6 en el extremo N-terminal, que confieren mayor grado de hidrofobicidad a la proteína y cuya función sigue siendo estudiada. La pérdida de estos dos residuos, covalentemente unidos, conlleva una disminución de la estabilidad mecánica de la película surfactante, la extensión de los fosfolípidos desde el reservorio en la hipofase (delgada capa acuosa, entre la película surfactante y el epitelio alveolar) y la compresibilidad en los ciclos de inspiración-espирación (ten Brinke, van Golde, & Batenburg, 2002). La SP-C, proteína integral de membrana, será internalizada desde la membrana del CMV hacia pequeñas vesículas lumbinales, en su interior, mediante Nedd4-2 quien ubiquitina a la pro-SP-C (Conkright et al., 2010).

La deficiencia o disrupción del locus de SP-C (*Sftpc*) en ratones no tiene efectos en la síntesis, tráfico o empaquetamiento del surfactante en los pneumocitos tipo II. Estos ratones presentan cuerpos lamelares, mielina tubular y surfactante normal. Los ratones SP-C<sup>-/-</sup> viven, posiblemente, porque SP-B es suficiente para la función surfactante in vivo. Sin embargo, esta deficiencia está asociada con el desarrollo de enfermedades crónicas pulmonares en humanos (Amin et al., 2001) y con una mayor severidad en la inflamación producida por la infección por el Virus Sincicial Respiratorio (RSV) en ratones SP-C<sup>-/-</sup> (Glasser et al., 2009). Además estudios recientes relacionan a la proteína SP-C con una nueva función inmunológica, ya que los animales SP-C<sup>-/-</sup> presentan menor índice de fagocitosis, por parte de los macrófagos, cuando éstos son evaluados frente a *P. aeruginosa* fluorescentes (Glasser et al., 2008).

### ii. SP-A y SP-D

Estas proteínas son hidrofílicas y pertenecen al grupo de las colectinas. Son sintetizadas por los pneumocitos tipo II y las células de Clara y participan en la defensa innata del pulmón y en el metabolismo del surfactante. Presentan dominios estructurales similares a las hélices triples del colágeno y dominios globulares (dependientes de Calcio) con actividad lectina, es decir, con capacidad para reconocer y unirse a ciertas cadenas oligosacáridicas, formando oligómeros de gran tamaño.

La SP-A es la proteína mayoritaria en el surfactante, representando aproximadamente el 5%. Su estructura consiste en un dodecámero cruciforme de aproximadamente 750 KDa cuyos monómeros de 36 KDa se asocian entre sí formando trímeros y, éstos a su vez, se ensamblan

---

hexagonalmente mediante la asociación lateral de hélices de colágeno. El conjunto se estabiliza mediante la formación de puentes disulfuro en la región N- terminal (Haagsman et al., 1989). Se localiza en pequeñas vesículas cerca de la membrana plasmática apical, en CMV y en algunos CL en el interior de la célula. Una vez secretado el surfactante, ya en el alvéolo, se encuentra asociada a la mielina tubular (Brasch et al., 2002), localizándose, concretamente, en las esquinas del enrejado que ésta forma (Voorhout et al., 1991).

La SP-A no promueve por sí sola la adsorción de fosfolípidos a la interfase aire- líquido, pero sí la incrementa (Yu & Possmayer, 1998), y, además, favorece la inserción selectiva de DPPC en la monocapa interfacial (Veldhuizen & Haagsman, 2000).

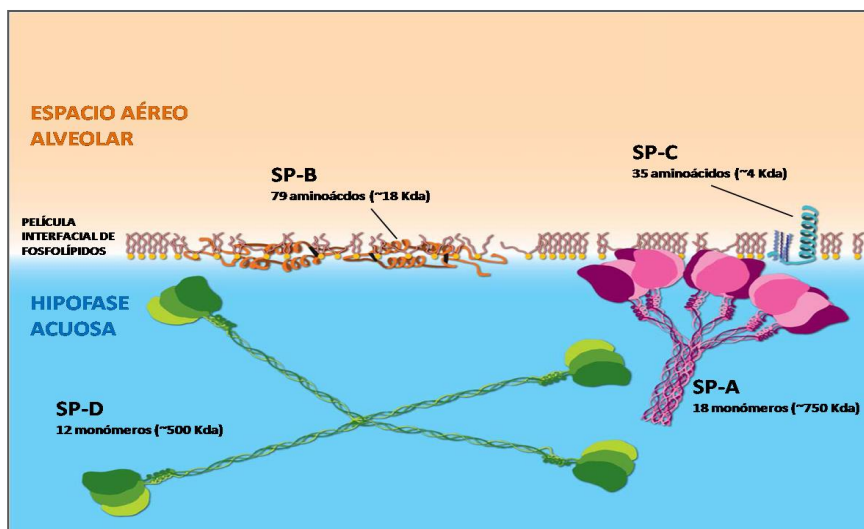
La delección de la SP-A, en ratones, SP-A<sup>-/-</sup>, no tiene efectos importantes en la homeostasis del surfactante (M Ikegami et al., 1998; M Ikegami, Korfhagen, Bruno, Whitsett, & Jobe, 1997). Sin embargo, no se detecta en los alvéolos de estos ratones mielina tubular (Korfhagen et al., 1996). Lo que podría explicar la mayor susceptibilidad que presentan estos ratones a las infecciones bacterianas o virales (Korfhagen, LeVine, & Whitsett, 1998).

La SP-D es un dodecámero cruciforme de aproximadamente 600 KDa. Está constituida por la asociación de cuatro trímeros a través de la región N-terminal, siendo cada monómero del trímero de 43 KDa. (Crouch, 1998). No se encuentra asociada a CL, sino que es secretada independientemente.

SP-D, al igual que SP-A, presenta funciones en la inmunidad innata (detallado en el siguiente apartado), presentando también, importantes funciones en el metabolismo surfactante. Un ejemplo de esto se observa en ratones SP-D<sup>-/-</sup>, que nacen aparentemente sanos, pero comienzan a acumular lípidos surfactantes, SP-A y SP-B en el espacio alveolar progresivamente. A las 8 semanas de vida, la cantidad de surfactante es 8 veces mayor en comparación con los animales control (wild-type, WT). También, presentan una gran acumulación de macrófagos alveolares, muchos de los cuales, son multinucleados y de apariencia espumosa (*foamy macrophages*). Los pneumocitos tipo II presentan hiperplasia y CL gigantes, pero a pesar de todo, no parece que presenten cambios detectables en la actividad del surfactante, en la función postnatal o a la supervivencia (Botas et al., 1998). También se ha visto que estos ratones SP-D<sup>-/-</sup> presentan menor capacidad de recaptación del surfactante por parte del pneumocito tipo II (Machiko Ikegami, Na, Korfhagen, & Whitsett, 2005).

**Función inmunológica de SP-A y SP-D.**

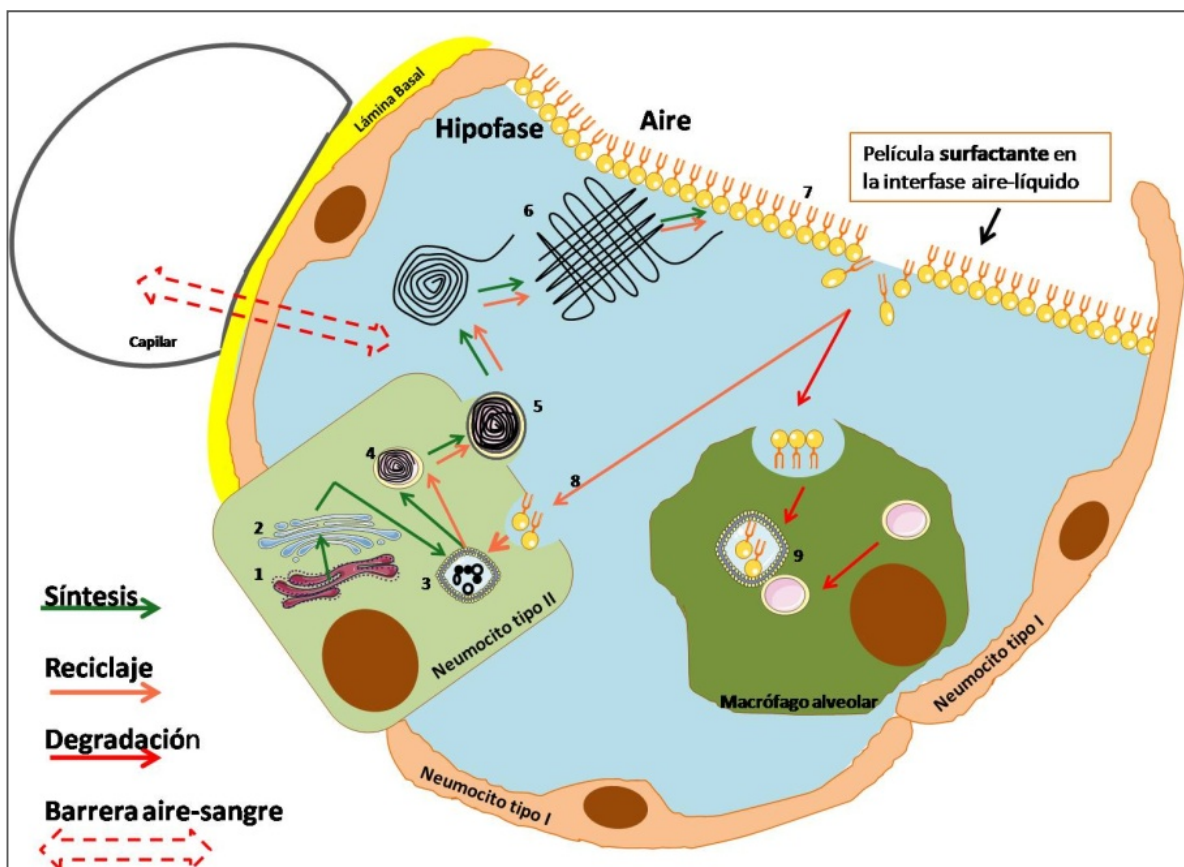
Ambas proteínas se unen a estructuras que expresan gran cantidad de microorganismos por sus dominios lectina. Son capaces de interactuar con manosa, glucosa L-fucosa y otros sacáridos (Kabha et al., 1997; Lim, Wang, Holmskov, Hoppe, & Reid, 1994). Ambas proteínas interactúan con lípidos, SP-A con DPPC (Haagsman, Sargeant, Hauschka, Benson, & Hawgood, 1990; Kuroki & Akino, 1991), el núcleo (core) del LPS (Kalina, Blau, Riklis, & Kravtsov, 1995; Van Iwaarden et al., 1994), y varios glucolípidos y glucoesfingolípidos (Kuroki, Gasa, Ogasawara, Makita, & Akino, 1992; Momoeda et al., 1996). SP-D interactúa con el inositol y motivos lipídico del PI (Ogasawara, Kuroki, & Akino, 1992) y con glucosil-ceramida (Kuroki, Gasa, Ogasawara, Shiratori, et al., 1992). SP-A y SP-D tienen la capacidad de modular múltiples funciones de los leucocitos, por ejemplo, SP-A es capaz de incrementar la fagocitosis de bacterias por parte de macrófagos alveolares (Crouch, 1998a; Wright, 1997), aunque también se han descrito casos de inhibición de la fagocitosis de *M. tuberculosis* (Ferguson, Voelker, McCormack, & Schlesinger, 1999). Además, la SP-A es capaz de inducir la quimiotaxis de los macrófagos (Tino & Wright, 1999), de afectar su producción de citoquinas (Borron et al., 2000; Hickling, Sim, & Malhotra, 1998) e incrementar su producción de Óxido Nítrico (NO) (Blau, Riklis, Van Iwaarden, McCormack, & Kalina, 1997). Por su parte, SP-D tiene menor capacidad de actuar como opsonina, si se compara con la SP-A, aunque sí se ha descrito que tiene la capacidad de inducir la agregación de muchos patógenos, por ejemplo el virus Influenza A (partículas IAV) (Hartshorn et al., 1994, 1997), algunas bacterias (Hartshorn et al., 1998) y partículas de levaduras (Schelenz, Malhotra, Sim, Holmskov, & Bancroft, 1995). La aglutinación masiva de microorganismos contribuye activamente en la defensa innata promoviendo la limpieza mucociliar de las vías aéreas y la internalización por células fagocíticas. SP-D es capaz de activar la quimiotaxis de macrófagos al igual que SP-A (Tino & Wright, 1999).



**Figura 4. Proteínas surfactantes.** SP-A, B, C y D, sintetizadas por los pneumocitos tipo II. SP-A,B y D también por las células de Clara (Jesus Perez-Gil, 2010).

## - Empaquetamiento y ensamblaje

El surfactante es sintetizado por los pneumocitos tipo II, a través de la ruta secretora. Este material lipoproteico es sintetizado en el retículo endoplasmático (RE), vía vesicular pasa al aparato de Golgi y los cuerpos multivesiculares (CMV). Finalmente, se almacena en los cuerpos lamelares (CL). En estos orgánulos vesiculares se almacena el surfactante antes de ser secretado mediante exocitosis a la subfase acuosa (hipofase). Una vez en el exterior celular, el surfactante se reorganiza formando una estructura típica, la mielina tubular (MT) y se adsorbe a la interfase formando una película. El surfactante puede ser reciclado por los pneumocitos tipo II y degradado por éstos o por los macrófagos alveolares (Wright & Dobbs, 1991) (Figura 5)



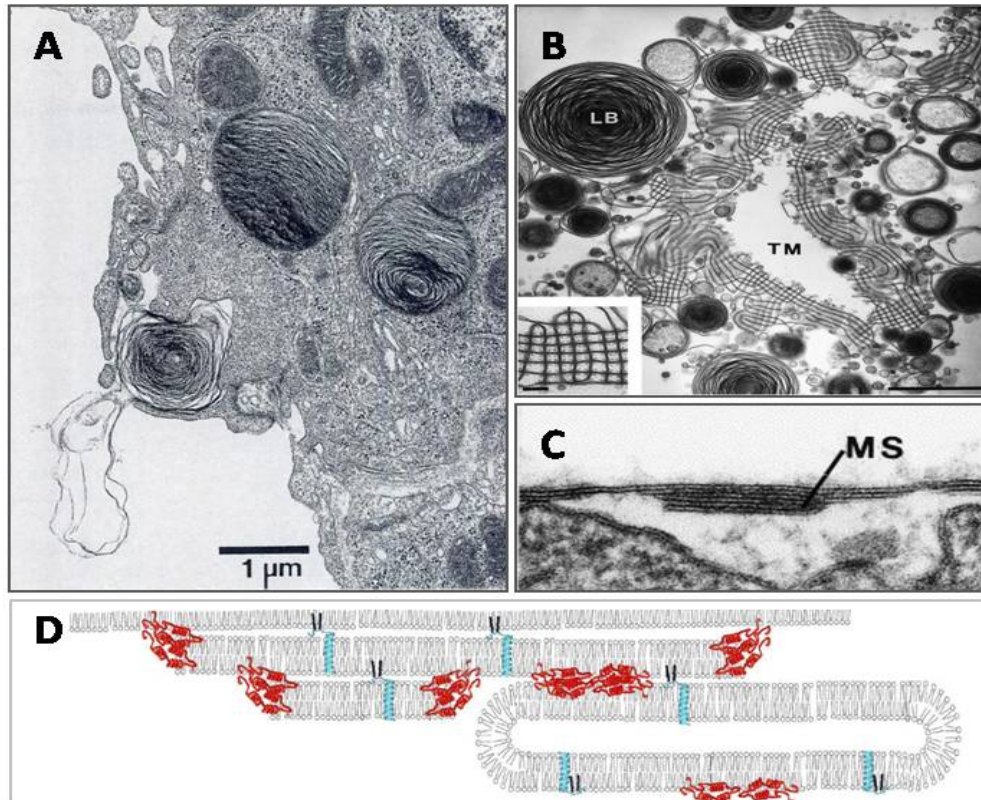
**Figura 5. Metabolismo del surfactante pulmonar.** 1- Retículo Endoplasmático. 2-Aparato de Golgi. 3-Cuerpos Multivesiculares. 4- Cuerpos Lamelares. 5- Exocitosis del contenido de los Cuerpos Lamelares. 6- Mielina Tubular. 7- Adsorción del material surfactante a la superficie interfacial formando una monocapa. 8- Reciclaje del surfactante. 9-Degradación por acción de los lisosomas en el interior de los macrófagos alveolares.

A excepción de la SP-D, los componentes del surfactante se almacenan en los cuerpos lamelares, vesículas exclusivas de los pneumocitos tipo II, en el interior de las cuales, se encuentra el surfactante altamente empaquetado en bicapas lipídicas dispuestas concéntricamente (Weaver, Na, & Stahlman, 2002). La SP-A es secretada de forma constitutiva, encontrándose el 7-8% en los cuerpos lamelares, lo que es debido a su recaptación unida al material surfactante (Kazuhiro Osanai et al., 2006). El transporte de los lípidos puede ocurrir por tres vías principales que incluyen el transporte vesicular, transporte no vesicular y la difusión en lugares de contacto entre membranas (van Meer, Voelker, & Feigenson, 2008). El transporte vesicular juega un papel muy importante en el tráfico de nuevas proteínas surfactantes, vía RE, Golgi y CL. También, es muy importante en el reciclaje desde el espacio alveolar, vía endocítica. Ambas rutas, la secretora y la endocítica convergen en CMV o endosomas tardíos. La membrana interna de los CMVs está enriquecida en colesterol y ácido lisofosfatídico, lo que hace que, probablemente, el reciclaje vía endocítica sea una fuente de colesterol, además de DPPC y PG. Sin embargo, existen muchas evidencias de que DPPC y PG son transportados por otras vías no vesiculares (Osanai, Mason, & Voelker, 2001), lo que se comprueba por la existencia de un transportador ABC, concretamente ABCA3, localizado en las membranas de los CL (Mulugeta et al., 2002). La disrupción del locus *Abca3*, ratones *Abca3*<sup>-/-</sup>, da lugar a pneumocitos tipo II sin CL (Cheong et al., 2007) y ausencia de surfactante, en concreto una reducción dramática del PG y PC que contienen ácido palmítico (Ban et al., 2007). En consecuencia, ocurre un fallo respiratorio que produce la muerte de las crías 1 hora después de nacer (Fitzgerald et al., 2007). Todo esto sugiere que ABCA3 es esencial en el transporte de PC y PG al interior de los CL. La forma en que el PC y el PG lleguen desde el RE a la membrana del CL para ser transportados hacia su interior, mediante ABCA3, podría ser por proteínas que transfieren fosfolípidos (*phospholipids transfer proteins*) o vía difusión en zonas de contacto entre membranas (van Meer et al., 2008).

#### - **Secreción y adsorción a la subfase acuosa**

El contenido de los CL es secretado por exocitosis a la hipofase (figura 6, A), siendo aquí donde las altamente empaquetada capas lipídicas se reorganizan dando lugar a la mielina tubular, formando una estructura de red de membranas interconectadas (Figura 6, B). Este cambio se produce, probablemente, por cambios en el pH, hidratación y concentración de calcio (Dietl & Haller, 2005). Bajo la monocapa interfacial permanecen asociadas múltiples capas de surfactante que actúan como reservorio, facilitando el mantenimiento y reciclaje de la película tensoactiva (Schürch, Green, & Bachofen, 1998) (Figura 6, C). Las proteínas SP-B y SP-C facilitan la adsorción del DPPC a la película desde la red de mielina tubular (Figura 6, D).





**Figura 6. Imágenes de microscopía electrónica de un pneumocito tipo II** en la que se observan los cuerpos Lamelares en su citoplasma, y uno de ellos en el proceso de exocitosis del surfactante(A) (Haven, Rooney, Young, & Mendelson, 1994) de la Mielina Tubular (TM) en formación a partir de los cuerpos Lamelares (LB) (Goerke, 1998) (B) y de las estructuras multilamelares asociadas a la interfase que sirven de reservorio (Schürch et al., 1998) (C). Modelo que representa las estructuras multilamelares del reservorio donde SP-B (Rojo) podría ser importante para asegurar un rápido flujo de lípidos entre las diferentes capas y SP-C (azul) cuya palmitoilación podría ayudar a mantener unidas las diferentes capas en los ciclos de compresión y expansión (Jesús Pérez-Gil, 2008)

#### - Degradación y reciclaje

Justo antes y después del nacimiento, en ratones, la ruta biosintética es la principal fuente de surfactante. Pero a medida que los pulmones maduran es la ruta del reciclaje la que toma el principal protagonismo. En un animal adulto el 70-80% del surfactante vuelve a los pneumocitos tipo II, a través de la vía endocítica, convergiendo con la ruta biosintética en los CL (Jesús Pérez-Gil & Weaver, 2010). En menor proporción, se produce degradación en los lisosomas hasta generar precursores que serán incorporados en la síntesis de novo. El 20-30% restante es endocitado y degradado por los macrófagos alveolares. La deficiencia en este catabolismo realizado por parte de los macrófagos alveolares pone de manifiesto su importancia. Por ejemplo, en ratones GM-CSF<sup>-/-</sup> (carentes del factor de maduración de macrófagos GM-CSF) afecta profundamente a esta función, dando lugar a la acumulación de surfactante y, en consecuencia, a la patología conocida como proteinosis alveolar (Trapnell & Whitsett, 2002).

- **Regulación de la síntesis y secreción del surfactante**

La biosíntesis del surfactante está bajo control hormonal múltiple desde antes del nacimiento. Glucocorticoides, prolactina, hormonas tiroideas, insulina y catecolaminas, algunos factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) y otros factores que controlan la formación de AMP-cíclico también regulan la síntesis (Mendelson & Boggaram, 1991).

El principal estímulo para la secreción de surfactante es el proceso respiratorio en sí. En una inspiración profunda, durante la expansión de los espacios alveolares, se produce una salida masiva de surfactante (Rooney, 2001). In vitro, se han descrito multitud de agentes fisiológicos y farmacológicos que estimulan la secreción de PC, o la inhiben, en pneumocitos tipo II aislados. Son (“denominados globalmente como”) secretagogos (capaces de inducir la secreción de surfactante por parte de pneumocitos tipo II) capaces de activar receptores en la superficie celular o que penetran en la célula y activan diversas vías de señalización intracelular. Por ejemplo, agonistas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, purinérgicos (ATP y UTP), forskolina y la toxina colérica que directa o indirectamente, activan a la Adenilato ciclasa (AC) incrementando el AMP-cíclico intracelular. Agentes como el TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) o diacilgliceroles permeables a la célula (DAGs) que, directamente activan a la proteína quinasa C (PKC) o Ionóforos (Iomicina) que promueven el flujo de  $Ca^{2+}$  al interior celular (Chander & Fisher, 1990; Gobran, Xu, & Rooney, 1998; Mason & Voelker, 1998; Wright & Dobbs, 1991).

## **2. SISTEMA INMUNITARIO**

### **2.1. INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA**

Desde etapas muy tempranas de la evolución los seres vivos tuvieron que desarrollar mecanismos para diferenciar lo extraño de lo propio, para reconocer miembros de su propia especie, desarrollar defensas contra el medio ambiente y contra otros organismos rivales. Éstos son, probablemente, los motivos por los cuales evolucionó el sistema inmune. En el caso de los vertebrados se considera sistema inmune al conjunto de órganos, tejidos, células y proteínas que nos protegen de cualquier materia ajena a nuestro organismo y, en consecuencia, nos defiende de las infecciones frente a patógenos, como virus, bacterias, hongos y parásitos. También nos protege de tumores y es el responsable de las alergias, a las que podríamos considerar como un defecto o una reacción inmune mal controlada.

Funcionalmente, el sistema inmunitario de los mamíferos presenta dos tipos de respuestas o mecanismos de acción, la inmunidad innata y la adaptativa. Aunque se establezca esta diferenciación, del sistema inmune, funcionan conjuntamente y se potencian mutuamente.

El mecanismo de inmunidad innata, presente desde muy pronto en la evolución, incluye las barreras naturales, es decir, aquellas que constituyen el límite exterior del cuerpo y son capaces de detener a los microorganismos, por ejemplo, la piel, la lisozima (en la mayoría de las secreciones externas), el sistema mucociliar de la tráquea, el pH ácido del estómago, piel y vagina, la poliamina prostática del semen y las bacterias del intestino, piel y vagina. Si los organismos patógenos son capaces de atravesar estas barreras, se activan los mecanismos de defensa en forma de células fagocíticas, como macrófagos y neutrófilos, que ingieren y destruyen el material extraño. De este modo, esta respuesta innata en mamíferos está en gran parte mediada por células epiteliales, neutrófilos, macrófagos, células NK, células dendríticas, citoquinas y factores del complemento y se caracteriza por ser inespecífica, de vida corta y desencadenada por receptores expresados en esas células. Éstos últimos se denominan receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs, Pattern Recognition Receptors), por ejemplo los TLR (Toll like receptors) (encargados de reconocer los “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs, *Pathogen-associated Molecular Patterns*), como lipopolisacárido bacteriano (LPS), carbohidratos, RNA vírico de doble cadena, estructuras moleculares que están presentes, y frecuentemente, en grandes grupos de microorganismos, pero no están en el hospedador. El reconocimiento de estas estructuras permite al sistema inmunitario distinguir agentes infecciosos extraños de agentes propios no infecciosos.

A lo largo de la evolución, los microorganismos patógenos que afectan a los vertebrados también han ido adaptándose a las nuevas estructuras, mecanismos y funciones de los organismos superiores. Esta circunstancia ha hecho que muchos de estos microorganismos sean capaces de atravesar los sistemas de defensa. El resultado de esta interacción ha sido el desarrollo, por parte de los vertebrados, de una respuesta sostenida y específica denominada inmunidad adaptativa.

Se trata de una respuesta más lenta y específica, porque las moléculas blanco (diana) de su acción son antígenos específicos presentes en patógenos. Mientras que el sistema inmunitario innato responde a estructuras que comparten distintos grupos de microbios, el sistema inmunitario adaptativo reconoce elementos moleculares que son específicos de cada patógeno. Esta respuesta inmune adaptativa se desarrolla a lo largo de la vida de un individuo al enfrentarse a antígenos, se demora en el tiempo y proporciona una especificidad mayor y memoria inmunológica (Banchereau et al., 2000). La respuesta inmune adaptativa, sin embargo, no puede

ser iniciada sin la intervención de las células del sistema innato. Los tipos celulares centrales en la respuesta adaptativa son los linfocitos B y T. La principal función de los linfocitos B es la producción y secreción de anticuerpos, capaces de bloquear o neutralizar directamente al antígeno que reconocen, reclutar células efectoras (como macrófagos, neutrófilos, células NK, etc.). Los linfocitos T reconocen al antígeno a través de su receptor TCR. Reconocen péptidos asociados a receptores de membrana (MHC, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad) presentes en las células propias. Cuando el linfocito T virgen reconoce a su antígeno es estimulado a proliferar y diferenciarse. Esta diferenciación puede dar lugar a tres tipos de células efectoras: Linfocitos T CD4+ o linfocitos T helper (coadyuvantes), Linfocitos T CD8+ o linfocito T citotóxico y Linfocitos T CD8+ supresores o reguladores.

## 2.2. MECANISMOS DE DEFENSA PULMONAR

Las vías aéreas son la mayor superficie de contacto del organismo con el exterior, con su entorno (500m<sup>2</sup>, aproximadamente, en un ser humano), por lo que el pulmón está constantemente expuesto a agentes patógenos que pueden llegar por inhalación de partículas, aerosoles y gases. Si bien, pueden llegar también, aunque con escasa frecuencia, por vía hematógena o vía transtorácica.

Los agentes patógenos se pueden clasificar en diversas categorías:

- Agentes infecciosos: virus, bacterias, hongos, parásitos.
- Gases tóxicos, irritantes o cancerígenos: humo de tabaco, anhídrido sulfuroso, ozono, óxidos nitrosos, CO, oxígeno en altas concentraciones.
- Partículas inorgánicas: sílice, asbestos, carbón, hierro, etc.
- Partículas orgánicas: pólenes, esporas de hongos, enzimas.
- Drogas: utilizadas por vía local (aerosoles, gotas nasales) o sistémica.
- Secreciones: secreción bucofaríngea, gástrica.
- Cuerpos extraños: alimentos, piezas dentales, etc.
- Radiaciones: radioterapia, radiaciones ambientales.

A pesar de todo, el aparato respiratorio posee eficientes sistemas de limpieza y acondicionamiento del aire, así como mecanismos de defensa capaces de eliminar los agentes extraños. Es de especial importancia, en este contexto, la eficiencia del sistema inmune innato.

Para que los mecanismos defensivos del pulmón funcionen eficientemente es necesario que el aire que llega a las vías aéreas inferiores esté caliente y húmedo. Es la nariz la responsable de calentar a 37°C el aire inspirado y de retener las partículas de mayor tamaño. En la tráquea y grandes bronquios pueden ser estimulados los receptores de irritación y producir la tos. Los agentes que sobrepasen estas barreras pueden ser eliminados por el transporte mucociliar, por lo que la sustancia surfactante que recubre el epitelio de las vías se mueve gracias al batir coordinado de sus cilios en dirección al exterior. Además de esta función mecánica, las secreciones respiratorias contienen lisozima, que actúa sobre la pared de las bacterias (especialmente Gram positivas); Interferón, que sirve como mediador en la actividad antiviral, entre otras funciones; Factores del Complemento que median en el proceso inflamatorio produciendo daño en las membranas celulares u opsonizando microorganismos y facilitando su fagocitosis y proteínas específicas de la sustancia surfactante, ya mencionadas, SPA y SPD con amplias funciones inmunológicas. Se encuentran, además, enzimas antioxidantes y antiproteasas que neutralizan los mediadores liberados por fagocitos, limitando su acción.

A nivel celular y formando parte de los mecanismos innatos, como ya se mencionó, los polimorfonucleares, que normalmente se encuentran en los capilares pulmonares, son atraídos en el caso de producirse un fenómeno inflamatorio a través de quimiotaxis. Segregan sustancias para la resolución de la infección y/o inflamación y suelen morir tras ejercer su función. Finalmente, los macrófagos, son los encargados de fagocitar estas células muertas, patógenos y todo el detritus celular, tienen otras funciones importantes, como presentar antígenos a los linfocitos y son capaces de iniciar, modular y ejecutar la respuesta inmune local, aunque esto se explicará con mayor detalle en el siguiente apartado.

El aparato respiratorio posee también sistemas de defensa específicos, por ejemplo, los tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT, Mucose-associated lymphoid tissue). En este caso, BALT (Bronchus-associated lymphoid tissue), es un tipo de agrupación de células linfoides sin organización o estructura, asociada a la mucosa de las vías respiratorias que contienen linfocitos B y T (Bienenstock & Befus, 1980). Estas asociaciones de células linfoides se encuentran bien situadas para encontrarse con antígenos que atraviesen la mucosa. Se consideran involucradas en la distribución y procesamiento de los antígenos entre el tejido pulmonar y los ganglios linfáticos del mediastino (especialmente, los cinco grupos a lo largo de la tráquea y aquéllos entre los pulmones y el diafragma) donde se lleva a cabo la respuesta inmunológica frente al antígeno. Las secreciones pulmonares también contienen inmunoglobulinas, siendo la más importante la IgA (presente a mayores concentraciones que las del plasma) que se secreta localmente. También

es importante la IgE, que media en reacciones de tipo alérgico, y la IgG con función de opsonización, aglutinando microorganismos y activadora del sistema del complemento.

### **2.3. EL MACRÓFAGO ALVEOLAR**

Todas las células del sistema inmunitario provienen de células madre pluripotenciales. La hematopoyesis, es decir, la formación y desarrollo de los glóbulos rojos, leucocitos, granulocitos y plaquetas, comienza en el saco vitelino embrionario en los primeros días de gestación. Después, se desarrolla el hígado fetal, a donde migran las células madre hematopoyéticas del saco vitelino para continuar la hematopoyesis. En el adulto, no existe, o es escasa, la actividad hematopoyética en el hígado y ésta es asumida por la médula ósea en humanos (en roedores, el bazo también ejerce de órgano hematopoyético).

Las células hematopoyéticas siguen dos líneas fundamentales de diferenciación: el linaje mieloide, que produce monocitos, eritrocitos y plaquetas, y el linfoide que produce linfocitos T, B y células asesinas naturales (NK: Natural Killer).

En el adulto, se pueden distinguir los macrófagos residentes, constitutivos de cada tejido, y los reclutados a los tejidos en situaciones de infección o inflamación, que proceden de la diferenciación de monocitos de la sangre y son extravasados desde los vasos sanguíneos. Existen diversos subtipos de macrófagos residentes con funciones especializadas, que difieren en fenotipo por la expresión de moléculas marcadoras específicas y, según el órgano en el que se encuentren, reciben distintos nombres (Gordon & Taylor, 2005), por ejemplo, las células de Kupffer en el hígado, la microglía del cerebro o el macrófago alveolar del pulmón quien será objeto de estudio en esta tesis.

El origen del macrófago alveolar sigue siendo motivo de amplio estudio, existiendo cierta controversia sobre el origen monocítico de los macrófagos tisulares. En este sentido, hay que diferenciar su origen, en condiciones inflamatorias, en estado estacionario y tras una transferencia de progenitores mieloides tras irradiación (bone marrow transplant, BMT). En el primer caso, está ampliamente descrito que los monocitos (clásicamente denominados monocitos CD11b/Ly6C<sup>hi</sup>) se infiltran en los tejidos y son los precursores de los macrófagos que se encuentran en condiciones patológicas, como la aterosclerosis o la enfermedad metabólica (Chawla et al., 2011). En el segundo caso, origen en estado estacionario, existen evidencias que apuntan a la independencia de los macrófagos tisulares de los monocitos procedentes de la médula ósea, por ejemplo, el macrófago primitivo embrionario se desarrolla antes que los

---

monocitos, o animales monocitopénicos que mantienen poblaciones normales de macrófagos tisulares (Sawyer, 1986; Takahashi, 2001). Apoyando estas hipótesis, aproximaciones más modernas sugieren que tras el trasplante de médula ósea de animales GMCSFR<sup>-/-</sup>(CD45.2<sup>+</sup>) en animales WT (CD45.1<sup>+</sup>), sometidos a dosis letal (para las poblaciones de la médula ósea) de radiación, los progenitores donantes no consiguen repoblar los pulmones receptores, posibilitando la proliferación local de los macrófagos WT residentes. Sin embargo, se demuestra cómo progenitores mieloides WT (CD45.1<sup>+</sup>), en las mismas condiciones de radiación, si logran repoblar pulmones WT (CD45.2<sup>+</sup>) (Hashimoto et al., 2013). En este sentido, se puede afirmar que el uso de progenitores mieloides con un defecto genético que afecta a su propia maduración, promueve en los potenciales tejidos “a repoblar”, la proliferación local de los macrófagos residentes. En otro estudio, previo a éste último, donde se realiza el trasplante WT→ GMCSFR<sup>-/-</sup> (Nishinakamura et al., 1996), comprueban, no sólo que el trasplante se realiza exitosamente sino que, en parte, la enfermedad pulmonar que presentan (Proteinosis Alveolar Pulmonar) mejora de manera notable. Por lo tanto, se puede postular que es posible el recambio de los macrófagos residentes de los tejidos, incluso en condiciones patológicas, mediante técnicas de irradiación y trasplante de progenitores mieloides concretos, y existen otras muchas investigaciones que lo avalan (Landsman & Jung, 2012; Landsman et al., 2007; Matute-Bello et al., 2004; Varol et al., 2009).

De lo que no hay duda, es que el macrófago alveolar es el centinela de la barrera alvéolo-sangre, constituyendo la línea de defensa celular contra los patógenos respiratorios. Es por ello, que es capaz de eliminar los pequeños microbios que son inspirados diariamente, mediante la secreción de metabolitos, lisozimas, péptidos antimicrobianos y a través del proceso de fagocitosis con la posterior muerte de este material fagocitado. Además, son capaces de regular la respuesta innata, ya que cuando se encuentran ante una gran cantidad de agentes extraños sintetizan y secretan una gran variedad de citoquinas (por ejemplo, interleukinas-1, -6 y factor de necrosis tumoral), quimioquinas (como interleukina-8) y metabolitos del ácido araquidónico (Haslett, 1999). Mediante estas señales célula-célula, los macrófagos alveolares inician la respuesta inflamatoria reclutando neutrófilos al espacio alveolar. Pero su papel no termina aquí, ya que el macrófago alveolar tiene un papel central en la resolución de la inflamación, siendo capaz de identificar a los neutrófilos apoptóticos en el lugar donde se ha producido la respuesta inflamatoria, y gracias a determinados cambios en su superficie los reconocen y fagocitan. Esta fagocitosis va acompañada de un cambio en el tipo de citoquinas que libera el macrófago, pasando de la secreción de las proinflamatorias a las antiinflamatorias, como el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) o la interleukina-10. Si existiera alguna anomalía en este

proceso, los neutrófilos apoptóticos liberarían su contenido celular (proteasas y otras enzimas potencialmente perjudiciales), en el interior de los alvéolos produciendo daño y perpetuando la inflamación. La eficiencia de esta retirada pone al macrófago al otro lado de la balanza inflamatoria, en su capacidad para resolverla (Knapp et al., 2003).

En definitiva, el macrófago alveolar cumple varias funciones fundamentales en el tejido pulmonar. Por un lado, forma parte del sistema inmunitario y constituye la primera defensa celular frente a antígenos extraños a lo largo de la superficie respiratoria. Su capacidad, tanto para iniciar como para resolver una respuesta inflamatoria, ha sido ampliamente estudiada. Por otro lado, el macrófago alveolar tiene una función central en el proceso respiratorio en sí, cataboliza el material surfactante que ya no puede ser reciclado por el pneumocito tipo II (Apartado 1.2.2., Degradación y reciclaje). Es decir, tiene una función central en el mantenimiento de la composición lipídica surfactante, lo que es fundamental para la correcta función ventilatoria pulmonar.

### **3. RECEPTORES NUCLEARES**

#### **3.1. SUPERFAMILIA DE LOS RECEPTORES NUCLEARES**

Los receptores nucleares son factores de transcripción dependientes de ligando, que regulan la expresión de genes que afectan a procesos tan diversos como la reproducción, el desarrollo o el metabolismo. Reconocen una variedad de ligandos, como hormonas lipofílicas, vitaminas o lípidos de la dieta, emitiendo una respuesta en forma de regulación de la expresión génica. (Chawla, Repa, Evans, & Mangelsdorf, 2001; Kliewer, 1999). Esta superfamilia está compuesta por 48 miembros en humanos, 21 en *Drosophila* y más de 270 en *Caenorhabditis elegans* (Castrillo & Tontonoz, 2004; Robinson-Rechavi & Laudet, 2003).

Los receptores nucleares se pueden subdividir en tres grupos, en función de sus ligandos endógenos: receptores de hormonas esteroideas, receptores “huérfanos” y receptores “huérfanos adoptados”. El primer grupo que se describió fue el de los receptores esteroideos clásicos, familia que incluye los receptores de estrógenos, progesterona, andrógenos o glucocorticoides. Posteriormente, se identificó un nuevo grupo de receptores nucleares, mediante clonaje por homología de secuencia con estos receptores clásicos, pero sus ligandos específicos no eran conocidos, por lo que fueron denominados receptores “huérfanos” (Mangelsdorf & Evans, 1995).



---

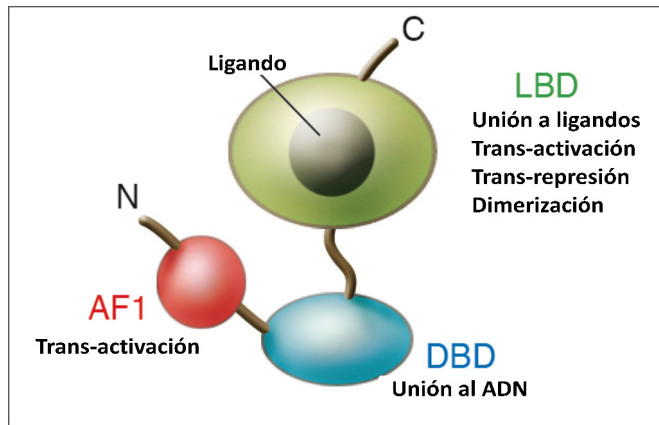
Finalmente, se identificaron algunos activadores endógenos, o ligandos, para estos receptores “huérfanos” y pasaron a llamarse receptores “huérfanos adoptados”. Dentro de este grupo nos encontramos con los receptores X de farnesoides o FXR (Farnesoid X Receptors), los receptores activados por proliferadores peroxisomales o PPAR (Peroxisome Proliferator-activated Receptors), los receptores X de retinoides o RXR (Retinoid x Receptors) y los receptores X hepáticos o LXR (Liver x Receptors). Todos ellos actúan formando heterodímeros con los receptores RXR.

En el caso de los receptores esteroideos, sus ligandos, las hormonas esteroideas, son producidas por tejidos endocrinos y vertidas a la circulación hasta alcanzar sus tejidos diana y ejercer su función. Pero no ocurre lo mismo en el caso de los receptores “huérfanos adoptados” cuyos ligandos son lípidos derivados de la dieta, concretamente metabolitos lipídicos que actúan de forma paracrina o autocrina, desencadenando rápidos cambios transcripcionales en respuesta a las alteraciones de la homeostasis lipídica de la propia célula. Normalmente, se promueve la expresión de genes involucrados en el almacenamiento, transporte y eliminación de estos lípidos. Es por ello, que los receptores “huérfanos adoptados” son considerados sensores endógenos lipídicos. Concretamente, los receptores LXR detectan colesterol, responden ante elevadas concentraciones de oxisteroles, transactivando la expresión de genes clásicos del transporte, catabolismo y eliminación del colesterol (Chawla et al., 2001).

### 3.2. ESTRUCTURA Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE RECEPTORES NUCLEARES

La familia de los receptores nucleares presentan una estructura altamente conservada y dividida en dominios funcionales: una región N-terminal que normalmente contiene una función independiente de la activación de ligando (Activation function-1 , AF-1), un dominio de unión al DNA (DNA Binding Domain, DBD) altamente conservado y que contiene dos dedos de Zn<sup>++</sup> y un extremo C-terminal de unión del ligando (Ligand Binding Domanin, LBD) capaz de acomodar pequeñas moléculas lipofílicas y con actividad dependiente de la unión del ligando (Activation function-2, AF-2) (Figura 7).

La zona reguladora AF-1 es muy variable entre los receptores nucleares y está implicada en la activación transcripcional. El dominio de unión al DNA (DBD) está altamente conservado y es el encargado de reconocer las secuencias específicas en los promotores de los genes diana que regula. Finalmente, en el dominio de unión a ligando (LBD) es donde se acomodan los ligandos, en un pequeño bolsillo hidrofóbico y cuya estructura varía de un miembro de la familia a otro, lo que determina las propiedades de unión a sus ligandos y, por tanto, la afinidad por el mismo. Este dominio también contribuye a la unión entre los monómeros que forman los dímeros.



**Figura 7. Estructura de los receptores nucleares.** Se muestra cada uno de los dominios en los que se dividen los receptores y sus principales funciones. (Modificado de Glass, 2006)

Los receptores nucleares presentan mecanismos de unión específica al DNA. Los receptores esteroideos son sintetizados en forma inactiva, se asocian en el citoplasma o en el núcleo con proteínas de choque térmico (HSP, Heat Shock Proteins) presentando así una baja ocupación de unión en los promotores de sus genes diana. Cuando se une la hormona esteroidea se promueve la disociación de este complejo y los receptores entran en el núcleo celular. Una vez en el núcleo, los receptores esteroideos se unen a elementos de respuesta hormonales (HREs, hormone response element) formando homodímeros. Estos elementos de respuesta consisten en dos secuencias palindrómicas, a cada una de las cuales se une un dominio de unión, DBD, de los monómeros que conforman el homodímero, de manera que cada miembro contacta con el DNA de manera simétrica.

En el caso de la mayoría de los receptores huérfanos adoptados, como PPARs y LXRs, se unen a sus elementos de respuesta, en regiones reguladoras próximas a los promotores de sus genes diana formando heterodímeros con receptores X del ácido retinoico (RXRs) (Chawla et al., 2001), y lo hacen en presencia o ausencia de sus ligandos. Los elementos de respuesta consisten en dos repeticiones directas (DR), es decir, dispuestas en el mismo sentido, de un hexámero tipo cuyo ejemplo más representativo es AGGTCA. Las secuencias en concreto y el espacio entre ellas determinarán qué heterodímeros se unirán a ellas (Umesono, Murakami, Thompson, & Evans, 1991), por ejemplo, el par RXR/PPAR se unirá preferentemente a repeticiones directas separadas una base (DR-1, mientras que el heterodímero RXR/LXR se unirá a repeticiones directas separadas cuatro pares de bases (DR-4) (Willy et al., 1995).

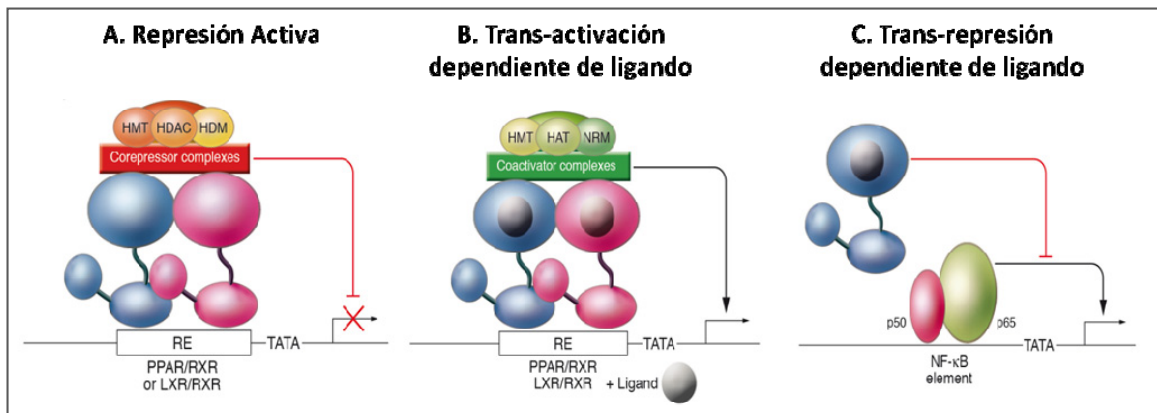
---

Los receptores nucleares pueden regular la expresión génica mediante varios mecanismos. Concretamente, en el caso de los receptores huérfanos adoptados: represión activa, trans-activación dependiente de ligando, y trans-represión dependiente de ligando. En el primer caso, la represión activa (Figura 8.A) la ejercen los heterodímeros en ausencia de ligando unidos a los elementos de respuesta de sus genes diana, y se debe a que son capaces de reclutar complejos co-represores, impidiendo el inicio de la transcripción. Estos complejos co-represores suelen estar constituidos por varios co-reguladores, entre los que se encuentran SMRT (silencing mediator of retinoid acid and thyroid-hormone receptors) y/o por NCoR (nuclear-receptor co-repressor).

Pero en presencia de sus ligandos específicos, la unión al receptor inducirá cambios estructurales que desplazarán al complejo co-represor facilitando la interacción con co-activadores, como por ejemplo, con la familia de proteínas de SRC (steroid receptor co-activator) o CBP/p300. Estos co-activadores interactúan con la región AF-2 del LBD y son requeridos, por ejemplo, para el reclutamiento de la RNA polimerasa II que iniciará la transcripción del gen diana, el remodelamiento del nucleosoma, la modificación de histonas (la acetilación de algunas de ellas) y el reclutamiento de factores de transcripción basales. Se produce, de este modo, la transactivación dependiente de ligando (Figura 8.B) (Glass, 2006).

La tercera forma que tienen estos receptores nucleares de modificar la expresión génica es mediante su capacidad de inhibir la actividad transcripcional de otros factores de transcripción, normalmente, mediante interacciones proteína-proteína (tethering), es decir, sin necesidad de que se unan al DNA (Glass & Saijo, 2010). Este fenómeno es conocido como “trans-represión” (Figura 8.C) es dependiente de ligando, y normalmente, se ejerce sobre factores de transcripción implicados en la inflamación, como NF- $\kappa$ B y AP-1. Un ejemplo de este tipo de mecanismo es el descrito en el laboratorio de Christophar Glass (Pascual et al. en 2005), quien demostró que PPAR $\gamma$  activado mediante ligando reprime la activación transcripcional de los genes de respuesta inflamatoria en macrófagos de ratón. El mecanismo consiste en la SUMOilación de PPAR $\gamma$  en su LBD, que lo “dirige” hacia el complejo co-represor, (NCoR)-histona deacetilasa-3 (HDAC3,) en los promotores de los genes inflamatorios. Esto previene el reclutamiento de la maquinaria del proteosoma que normalmente mediaría, en estas condiciones inflamatorias, el desplazamiento de los co-represores. Por lo tanto, NCoR permanece unido al promotor y no se inicia la transcripción del gen inflamatorio. En la misma línea, se describieron posteriormente, mecanismos alternativos de SUMOilación de PPAR $\gamma$  y LXRs, capaces de regular, negativamente, diferentes sets de genes pro-inflamatorios dependientes de la señalización a través de TLR (toll like receptors) (Ghisletti et

al., 2008), apoyando los estudios realizados con anterioridad (Joseph et al., 2003) en los que se describe la represión dependiente de LXR de genes inflamatorios en macrófagos activados.



**Figura 8. Mecanismos de activación y represión transcripcional de los receptores nucleares huérfanos adoptados.** (Modificado de Glass, 2006).

## 4. RECEPTORES X HEPÁTICOS (LIVER X RECEPTORS, LXR)

### 4.1. LXR: ISOFORMAS, LIGANDOS Y DISTRIBUCIÓN

Los receptores nucleares LXR (Liver X receptors) se presentan en dos isoformas, LXR $\alpha$  (NR1H3) y LXR $\beta$  (NR1H2) codificadas en diferentes cromosomas. Como ya se apuntó en el apartado anterior los receptores LXR se unen al DNA como heterodímeros obligados con los RXRs, y su actividad, la del heterodímero, puede ser regulada por los ligandos de cualquiera de ambos receptores (Willy & Mangelsdorf, 1997). Varias formas modificadas del colesterol, como 22-(R)-, 24-(S)-, 27-hidroxicolesterol y 24-(S)-, 25-epoxicolesterol son los ligandos naturales de LXR capaces de activar la transcripción de sus genes diana a concentraciones fisiológicas (Forman et al., 1997; Janowski, Willy et al., 1996; Lehmann et al., 1997). Además de estos ligandos clásicos, recientemente se ha descrito que altas concentraciones de D-glucosa y  $\beta$ -sitosterol son capaces de activar a LXR (Mitro et al., 2007; Plat, Nichols, & Mensink, 2005). Por otro lado, se han generado potentes ligandos sintéticos, como GW3965 (Glaxo Wellcome), el compuesto LG268 (Ligand Pharmaceuticals), y el compuesto T0901317 (Tularik). Los ligandos GW3965 y T0901317 son específicos de los receptores LXR, y el compuesto LG268 actúa como activador de los receptores RXR.

LXR $\alpha$  y LXR $\beta$  presentan una homología de más del 75% en sus secuencias, y tanto en su DBD como LBD en humanos y en ratones (Tontonoz & Mangelsdorf, 2003). Sin embargo, no se encuentran

---

distribuidas por igual. Mientras que LXR $\alpha$  predomina en tejidos como el hígado, tejido adiposo, intestino, riñón y macrófagos tisulares, LXR $\beta$  se encuentra en la mayoría de los tejidos analizados. (Repa & Mangelsdorf, 2000).

#### 4.2. LXR EN EL METABOLISMO LIPÍDICO

Los receptores LXR son importantes reguladores del metabolismo del colesterol en mamíferos. Este control es esencial ya que es un constituyente indispensable de las membranas biológicas, precursor de los ácidos biliares, vitaminas y hormonas esteroideas. Numerosos estudios evidencian la implicación de LXR en esta regulación en tres puntos: en la síntesis, absorción y el catabolismo.

La identificación inicial de los oxisteroles, como ligandos fisiológicos de LXR, supuso una primera aproximación al papel de estos receptores en el metabolismo de colesterol (Janowski et al., 1996; Lehmann et al., 1997). Esta hipótesis fue confirmada tras los resultados obtenidos en estudios realizados en ratones LXR $\alpha$ -/-, ya que, tras someterlos a una dieta rica en colesterol, éstos perdían la capacidad de catabolizarlo, es decir, de convertirlo en ácidos biliares. Esto tiene como consecuencia el acúmulo de ésteres de colesterol, aumentando así la probabilidad de fallo hepático. Esta observación permitió identificar al gen Cyp7a1 (citocromo P450, familia 7, subfamilia A, polipéptido 1), enzima limitante de la síntesis de ácidos biliares, como el primer gen diana de la regulación de LXR (Peet et al., 1998).

Estudios posteriores en ratones carentes de LXR y en ensayos in vitro con ligandos de LXR pusieron de manifiesto su implicación en el transporte reverso del colesterol, proceso mediante el cual el colesterol es transportado desde los tejidos periféricos en partículas de alta densidad HDL (high density lipoprotein) hacia el hígado, para su posterior excreción en forma de bilis. En este sentido, LXR regula la expresión de algunos genes implicados en este proceso en células periféricas, como los macrófagos (Castrillo & Tontonoz, 2004). En respuesta a la elevación del contenido del colesterol intracelular, LXR induce la expresión de transportadores, como ABCA1 (Repa, 2000; Venkateswaran et al., 2000) y ABCG1 (Venkateswaran et al., 2000) que promueven el flujo de colesterol hacia el exterior celular. También, promueve la expresión de las apolipoproteínas apoE y apoC, aceptoras extracelulares de colesterol (B. Laffitte et al., 2001; Mak et al., 2002), e induce, además, las enzimas de remodelamiento de lipoproteínas, PLTP (phospholipid transfer protein), LPL (lipoprotein lipase) o la CETP (phospholipid transfer protein) (Lehmann et al., 1997; Schultz et al., 2000).

LXR controla la expresión de otros dos miembros de la familia ABC (ATP binding cassette), ABCG5 y ABCG8, quienes en el hígado promueven la eliminación de colesterol hacia la bilis, y en el intestino son capaces, tras activación con ligando de LXR, de disminuir la absorción de colesterol por parte de las células intestinales (Repa et al., 2002).

Los receptores LXR juegan un papel importante en el metabolismo de los ácidos grasos. Ratones LXR $\alpha$ -/- presentan una deficiente expresión de SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein) (Repa, 2000b), FAS (fatty acid synthase) (Joseph, Laffitte, et al., 2002), SCD-1 (stearoyl CoA desaturase-1) (Repa & Mangelsdorf, 2000), y ACC (acetyl CoA carboxylase) (Peet et al., 1998). La administración de ligandos sintéticos, a ratones WT, eleva los triglicéridos en el plasma, en parte debido a la inducción de la vía lipogénica hepática. El principal regulador de esta vía lipogénica es SREBP-1c, así como FAS y PLPT, que son dianas directas de LXR. El incremento de los triglicéridos hepáticos, tras la activación de LXR, constituye uno de los principales obstáculos para el desarrollo de dianas terapéuticas basadas en ligandos específicos de LXR.

LXR también intervienen en el control de la expresión de genes implicados en el metabolismo de la glucosa. Existen trabajos que demuestran que el agonista de LXR T0901317 mejora la sensibilidad a la insulina en ratas resistentes a esta hormona (Cao et al., 2003). Laffitte y colaboradores mostraron que el agonista GW3965 mejora la tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con una dieta alta en grasa (Laffitte et al., 2003). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren una regulación coordinada de genes implicados en el metabolismo de la glucosa en varios tipos celulares. La activación de LXR en el hígado permite el aumento de expresión de glucoquinasas, y la disminución de la expresión de genes relacionados con la gluconeogénesis hepática. En el tejido adiposo, la activación de LXR permite la inducción transcripcional del transportador de glucosa sensible a la insulina GLUT 4 (glucose transporter type 4) (Dalen et al., 2003; Laffitte et al., 2003).

Algunos de los estudios mencionados anteriormente muestran que LXR regula la expresión de genes involucrados en el transporte reverso del colesterol, metabolismo de los ácidos biliares y la absorción intestinal del colesterol. Todos estos procesos son considerados anti-aterogénicos (aterosclerosis. endurecimiento de las arterias, que ocurre cuando se acumulan grasa, colesterol y otras sustancias en las paredes de las arterias y forman estructuras duras llamadas placas degenerando en el desarrollo de un estado inflamatorio crónico dentro de la pared arterial). Sin embargo, LXR es capaz de activar, también, la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, considerados factores de riesgo en la enfermedad cardiovascular. Los estudios de ganancia o pérdida de función, de LXR, indican que su activación tiene potentes efectos anti-aterogénicos.

---

Así, el tratamiento de ratones propensos a aterosclerosis Apoe<sup>-/-</sup> y LDLR<sup>-/-</sup> con un ligando sintético de LXR, disminuyó al 50%, el tamaño de la lesión ateromatosa (Joseph, McKilligin, et al., 2002). En este trabajo se observó cómo en muestras de aortas de ratones tratados con el ligando se indujo la expresión de ABCA1 y ABCG1, mientras que la expresión de genes inflamatorios se vio reprimida, lo que revela la existencia de un mecanismo dual anti-aterogénico beneficioso. Por el contrario, la pérdida de la expresión de los receptores LXR en progenitores hematopoyéticos en macrófagos, realizada mediante el trasplante de médula ósea de ratones LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>, en ratones Apoe<sup>-/-</sup> o LDLR<sup>-/-</sup>, se tradujo en un marcado incremento del tamaño de la lesión (Tangirala et al., 2002). El estudio llevado a cabo por Levin y colaboradores ha establecido que el tratamiento de ratones LDLR<sup>-/-</sup> con un agonista de LXR reduce el tamaño de las lesiones preexistentes, y esta reducción es dependiente de la actividad de LXR en macrófagos (Levin et al., 2005). Estos estudios confirman que LXR supone un importante mecanismo homeostático en el macrófago, que ayuda a proteger contra el exceso de colesterol, y apuntan a que LXR supone un blanco atractivo para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular. Estudios más recientes añaden a LXR otra implicación, consistente en que la activación dependiente de LXR promueve la degradación del receptor de LDL gracias a la regulación de Idol (inducible degrader of the LDLR), una enzima que ubiquitina el receptor LDLR (Receptor de LDL) induciendo su degradación por el proteosoma. De esta manera, cuando la célula se encuentra cargada de colesterol, la activación de LXR no sólo promueve su transporte reverso sino que impide que se siga cargando, evitando que nuevas lipoproteínas LDL sean detectadas (Zelcer et al., 2009).

### 4.3. LXR INFLAMACIÓN E INMUNIDAD

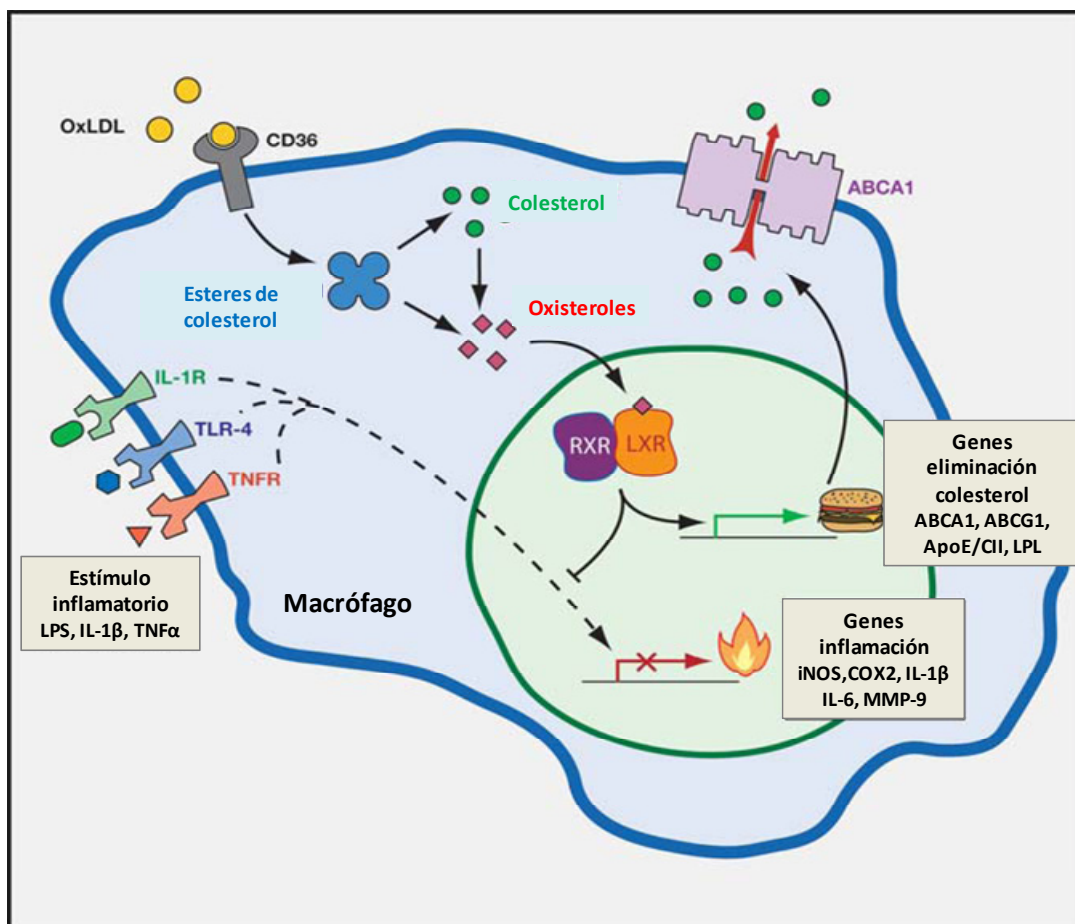
Algunos receptores nucleares, además de su papel en el desarrollo y el metabolismo, funcionan como moduladores de la respuesta inmune innata y adaptativa. Numerosos estudios apoyan a LXR como uno de ellos, concretamente en la modulación de la expresión de genes de respuesta inflamatoria en macrófagos (Figura 9). Como se mencionó en el apartado 3.2 los receptores LXR son capaces de ejercer mecanismos de trans-represión mediante los cuales, tras su activación, son capaces de inhibir la actividad transcripcional de otros factores de transcripción, generalmente, aquéllos implicados en la inflamación, como NF- $\kappa$ B, STAT y AP-1. En 2003 se describió, por primera vez, que la activación de LXR inhibía la expresión de genes inflamatorios en macrófagos (Joseph et al., 2003). En estos estudios se comprueba cómo, además de inducirse la expresión de genes involucrados en el transporte reverso del colesterol, LXR inhibe un set de genes inflamatorios tras la estimulación con LPS, TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$ . Ejemplos de algunos de estos genes son COX-2, iNOS, IL-6, IL- $\beta$ , MCP-1, MCP-3 y MMP-9 (Castrillo et al., 2003; Castrillo & Tontonoz, 2004; Joseph et al.,

2003). Esta represión de genes inflamatorios, además, se comprueba en ratones de genotipo salvaje (Wild Type, WT), LXR $\alpha$ -/- y LXR $\beta$ -/-, pero no en las células LXR $\alpha\beta$ -/-. Estos resultados indican que ambas isoformas de LXR poseen actividad anti-inflamatoria.

In vivo, también existen modelos que apoyan la capacidad antiinflamatoria de LXR. La estimulación vía intraperitoneal con LPS es uno de ellos, desencadenando una respuesta sistémica exacerbada en ratones LXR $\alpha\beta$ -/-, que se confirma mediante la determinación de los niveles de citoquinas y la expresión de genes inflamatorios en el hígado (Joseph et al., 2003). En el segundo modelo, se observó que los agonistas de LXR reducen de forma drástica la respuesta inflamatoria en modelos de inflamación cutánea inducida por TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), y en la dermatitis alérgica inducida por oxazolona (Fowler et al., 2003; Joseph et al., 2003). En otro modelo, se apreció que la administración del agonista sintético de LXR redujo la expresión de genes inflamatorios, como MMP- 9, en el contexto de la inflamación crónica ateromatosa en ratones hipercolesterolémicos apoE-/- y Ldlr-/- (Joseph et al., 2003; Terasaka et al., 2005). Más recientemente, se han llevado a cabo estudios sobre la implicación de LXR en el cerebro, concretamente sobre algunas características inflamatorias en la enfermedad de Alzheimer o la encefalitis experimental (Hindinger et al., 2006; Zelcer et al., 2007), mostrándose en todas ellas la capacidad anti-inflamatoria de LXR en el cerebro. Todas estas observaciones sugieren que los agonistas de LXR podrían ejercer estos efectos anti-aterogénicos, no sólo promoviendo la eliminación de colesterol, sino también actuando como limitantes de la producción de mediadores inflamatorios en la pared arterial, lo que podría ser útil para controlar el exceso de inflamación que tiene lugar en una gran variedad de enfermedades.

También, se han llevado a cabo ensayos en los que se pone a prueba la señalización dependiente de la activación o represión de LXR, para responder ante microorganismos. Los ratones que carecen de los receptores LXR son muy susceptibles al patógeno intracelular *Listeria monocytogenes* (LM) (Joseph et al., 2004) y, además, en ellos aumenta el porcentaje de macrófagos apoptóticos, poniendo de manifiesto que este hecho es uno de los responsables de esa susceptibilidad. Esta susceptibilidad se revierte cuando estos ratones son trasplantados con médula ósea de un animal control (WT). La supervivencia de los macrófagos en respuesta a la infección por LM se debe, al menos en parte, a la expresión de un gen antiapoptótico LXR $\alpha$ -dependiente AIM/Sp $\alpha$  (apoptosis inhibitor macrophage, Aim/Sp $\alpha$ ), considerado el primer gen diana selectivo de una isoforma de LXR (Miyazaki et al., 1999).

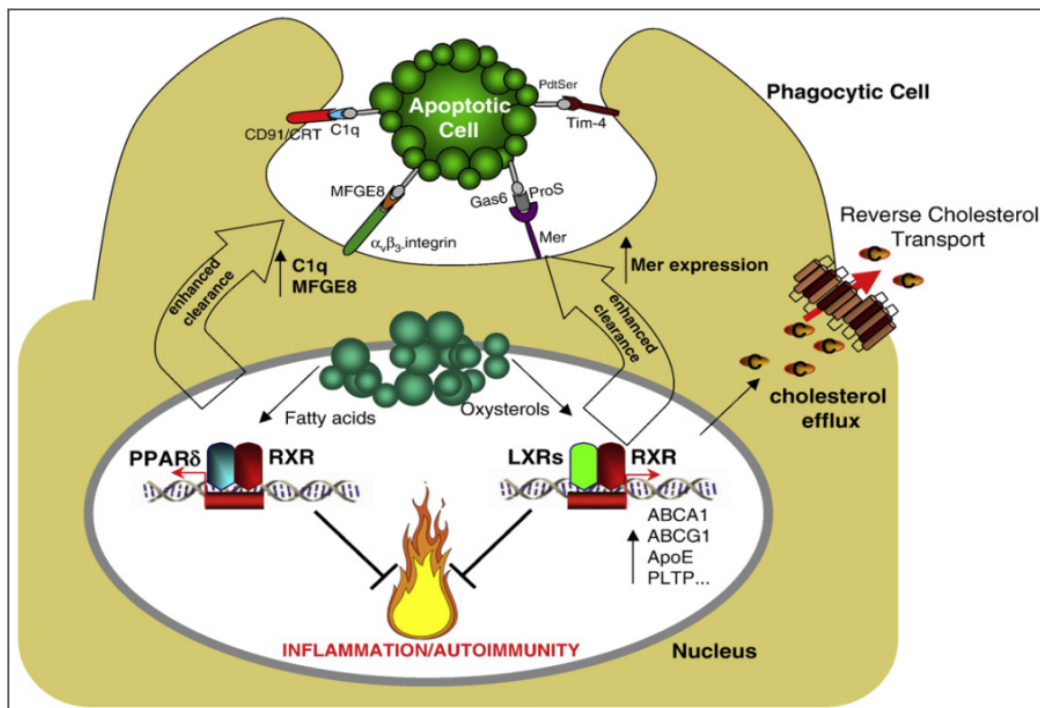




**Figura 9. Integración de las señales del metabolismo lipídico y de la respuesta inflamatoria mediadas por LXR.** La señalización dependiente de LXR conduce a la expresión de genes involucrados en la liberación de colesterol al exterior, así como la inhibición de la expresión de algunos genes de respuesta inflamatoria. Modificado de Castrillo & Tontonoz, 2004.

Los macrófagos tisulares tienen un papel fundamental en la retirada de células apoptóticas. Éstas producen las denominadas señales “find me” cuyo objetivo es reclutar macrófagos y otros fagocitos hacia los lugares donde se produce la muerte celular. Estas señales consisten, normalmente, en lípidos, cambios en los carbohidratos de su superficie (PS) o nucleótidos (ATP/UTP) (Elliott et al., 2009; Lauber et al., 2003; Lauber et al., 2004). Cuando los macrófagos las detectan, reconocen estas señales en la superficie de la célula apoptótica mediante una serie de receptores y/o moléculas puente para, finalmente, fagocitarlas. Como consecuencia, el contenido lipídico del macrófago aumenta tras la fagocitosis. Es por ello que, dada la importancia de los receptores LXR en el metabolismo lipídico y en la señalización inflamatoria, se han llevado a cabo estudios a este respecto en nuestro laboratorio en los últimos años (A-González et al., 2009). En este trabajo se muestra que la fagocitosis de células apoptóticas, por parte de macrófagos, se incrementa si se activa LXR con sus ligandos. Por ejemplo, los macrófagos  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  presentan menor capacidad fagocítica que los WT tras una inyección intraperitoneal de timocitos apoptóticos (ATs) y, además, la apoptosis forzosa de los timocitos corticales de ratones con

dexametasona provocó acumulación de grandes cantidades de timocitos no fagocitados en el timo de animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (A-González et al., 2009). La consecuencia, en este fenotipo  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ , con menor capacidad de fagocitar células apoptóticas, es que éstas se acumulan en los tejidos, como el bazo, el timo, pulmón y testículos. Esto provoca que en los tejidos se perpetúe el estado inflamatorio y, en consecuencia, se desarrolle un estado de inflamación crónica que puede derivar en una reacción sistémica autoinmune. Por lo tanto, LXR participa en la retirada efectiva de células apoptóticas así como en la inhibición de la producción de mediadores inflamatorios que son cruciales en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica.



**Figura 10. Contribución de LXR y PPAR  $\gamma$  a la fagocitosis de células apoptóticas por parte de macrófagos.** El procesamiento intracelular de la célula fagocitada libera esteroides naturales u oxidados y ácidos grasos capaces de activar a LXR y a PPAR $\gamma$ , respectivamente. El resultado de las cascadas de señalización de ambos NRs es una respuesta inmunosupresora en el macrófago que contribuye a evitar la inflamación y la autoinmunidad.

Por otro lado, los macrófagos presentan distintas características fenotípicas en diferentes tejidos, y de su correcta especialización dependen sus funciones específicas en cada compartimento dentro de los tejidos. El control de esta heterogeneidad, entre los macrófagos localizados en los diferentes tejidos, no está caracterizado por completo. Sin embargo, resultados en nuestro laboratorio muestran un nuevo papel de LXR en la diferenciación de los macrófagos de la zona marginal del bazo (A-González et al., 2013). Los análisis realizados demostraron que los animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  y  $LXR\alpha^{-/-}$  carecían, por completo, de zona marginal y, como consecuencia, presentan

---

una respuesta anormal a los antígenos provenientes de la sangre. Una de las herramientas utilizadas en este trabajo fue la realización de trasplantes de médula ósea, comprobándose de esta manera que médulas de animales WT y LXR $\beta$ -/- son capaces de regenerar parcialmente la zona marginal de bazo de animales LXR $\alpha$ -/- y LXR $\alpha\beta$ -/-. Además, para confirmar que esta regulación en el linaje hematopoyético es clave en el desarrollo de los macrófagos de la zona marginal, se generó una línea de ratones en las que estas células tienen deletado, exclusivamente, el gen que codifica para LXR $\alpha$ . La ausencia de LXR $\alpha$  en la línea hematopoyética de estos animales se tradujo en la ausencia de los macrófagos de la zona marginal. Estos resultados confirman que el desarrollo de los macrófagos de la zona marginal del bazo es LXR $\alpha$  dependiente (A-González et al., 2013).

#### **4.4. LXR EN EL PULMÓN.**

El papel de la señalización dependiente de LXR ha sido ampliamente estudiado desde hace varias décadas, desde el punto de vista de su implicación en el metabolismo lipídico, en el transporte reverso, la aterosclerosis o en la fisiología hepática.

Menos estudiado ha sido el papel de LXR en la fisiología pulmonar. Algunos estudios se han llevado a cabo tratando de dilucidar el papel de LXR en la respuesta inmune y/o inflamatoria en modelos in vitro e in vivo. En 2007, Birrell y colaboradores mostraron, por primera vez, la reducción de la producción de citoquinas (inducidas por LPS) en células THP-1 (Human acute monocytic leukemia cell line) y macrófagos pulmonares, usando dos agonistas diferentes de LXR, (GW3965 y T1317). Además, observaron una reducción, LXR-dependiente, en la neutrofilia inducida en ratas tras el estímulo inflamatorio con LPS. Similares resultados se han obtenido en otros laboratorios con respecto a la neutrofilia inducida por LPS y en otro modelo in vivo, esta vez en ratones, mediante la inoculación intratraqueal de *Klebsiella pneumoniae*, que se atenúa tratando con el ligando sintético T1317 (Smoak et al., 2008). Posteriormente, en 2009, en un modelo de infección con *Mycobacterium tuberculosis* se demostró cómo el tratamiento de los animales control (WT) con agonistas de LXR T0-901317 y GW3965 resultó en una disminución de la carga bacteriana, observándose además que la respuesta de los linfocitos T está muy afectada en los ratones LXR $\alpha\beta$ -/- (Korf et al., 2009). Estos modelos ponen de manifiesto el efecto inmunoprotector que tiene LXR, también, en el contexto pulmonar, posicionándolos como posibles candidatos terapéuticos en la lucha contra la infección pulmonar.

El estudio de la actividad de LXR en la fisiología pulmonar ha hecho posible atribuirle nuevas funciones antes no conocidas, como es su implicación en la producción de enzimas antioxidantes

(Gong et al., 2009). En este trabajo, se genera un ratón LXR $\alpha$  Knock-in (LXR $\alpha$ - KI) en el que se inserta el DNAc de LXR $\alpha$ , de manera que LXR $\alpha$  es expresado de manera constitutivamente activo. Estos estudios muestran cómo la activación de LXR en animales LXR $\alpha$ - KI o WT, tratados con agonistas, presentan una gran resistencia al daño inducido por LPS, disminuyendo la producción de especies reactivas del oxígeno (Gong et al., 2009). Este hallazgo tiene relevancia, ya que muchas enfermedades pulmonares se caracterizan por el desequilibrio en la respuesta inmune que deriva en estrés oxidativo, por ejemplo, en el Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA o ARDS, Acute Respiratory Distress Syndrome) o la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC o COPD, Chronic Obstructive Pulmonary Disease).

Otra aproximación, sobre la implicación de LXR en el pulmón, es el estudio de la delección de algunos de sus genes diana en el pulmón. En este sentido, se han generado ratones carentes de los genes de ABCG1 (ABCG1 $^{-/-}$ ) y ABCA1 (ABCA1 $^{-/-}$ ), ambos, transportadores de membrana de colesterol, que promueven su transporte al exterior celular. En el caso del fenotipo ABCG1 $^{-/-}$ , muestran una severa acumulación lipídica subpleural que se agrava con la edad, acompañada de macrófagos alveolares y pneumocitos tipo II, hipertróficos, que acumulan lípidos. También, presentan un incremento de los niveles de surfactante. (Baldán et al., 2006; Baldán et al., 2008). Todo esto pone de manifiesto la importancia de ABCG1 en la homeostasis lipídica y de la respuesta inmune del pulmón.

El animal ABCA1 $^{-/-}$  presenta características análogas a las que se dan en la enfermedad de Tangier (enfermedad producida en humanos por la mutación del gen ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1). Presentan ausencia total de lipoproteínas HDL y muy reducidas LDL y de la apolipoproteína B. En el pulmón presentan un fenotipo parecido al de los animales ABCG1 $^{-/-}$ , con una gran acumulación de macrófagos llenos de lípidos y pneumocitos tipo II hipertróficos (McNeish et al., 2000).

En resumen, los pulmones están siendo continuamente expuestos al ambiente, lo que significa que las vías respiratorias reciben a diario estímulos inflamatorios procedentes de partículas y microorganismos. Por este motivo, y dada la importancia de LXR en los procesos inmunitarios, es interesante investigar su papel en la fisiología pulmonar desde varios ángulos y empleando los ratones deficientes en las isoformas de LXR. Además, en el alvéolo, los pneumocitos tipo II y los macrófagos alveolares se encargan de mantener los procesos de síntesis, reciclaje y catabolismo del material surfactante, sustancia eminentemente lipídica, y potencial regulador de LXR. Es por ello, que en este trabajo se intentará profundizar en el papel de LXR en ambos procesos, en la respuesta inmunitaria y en el metabolismo del surfactante.

# **OBJETIVOS**



---

## OBJETIVOS

### Los objetivos propuestos en esta tesis doctoral son:

1. Estudiar el papel de los receptores LXR en la fisiología pulmonar. Para ello, realizamos un análisis ultraestructural del tejido pulmonar, identificando los principales tipos celulares afectados en el pulmón LXR $\alpha\beta$ -/- mediante técnicas histológicas e inmunológicas, así como bioquímico, caracterizando el perfil lipídico pulmonar.
2. Analizar la actividad de los receptores nucleares LXR en el tejido pulmonar y la posible regulación transcripcional, dependiente de LXR, de genes implicados, tanto en el metabolismo del material surfactante, como en el proceso inflamatorio.
3. Investigar a las poblaciones celulares derivadas del lavado broncoalveolar en los animales WT y LXR $\alpha\beta$ -/-, y en especial, la aportación del macrófago alveolar al fenotipo LXR $\alpha\beta$ -/-, mediante la transferencia de células mieloides, utilizando para ello trasplantes de médula ósea.
4. Establecer un modelo experimental que recree, *in vitro*, las condiciones ambientales de lipidosis en las que se encuentran los pneumocitos tipo II en el pulmón del animal LXR $\alpha\beta$ -/-, usando la línea celular inmortalizada MLE-12.
5. Caracterizar al pneumocito tipo II de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ -/-, a través de su aislamiento, purificación y análisis de la expresión génica.





# **MATERIAL Y MÉTODOS**



---

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. MODELOS EXPERIMENTALES

#### 1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon ratones pertenecientes a la estirpe C57BL6/Sv129, fondo mixto de diferentes genotipos:

- Ratones de genotipo salvaje (WT).
- Ratones *Knock-out* para LXR $\alpha$  (Lxr $\alpha$ -/-), modificados genéticamente de manera que carecen del gen Nr1h3, que codifica para la proteína LXR $\alpha$ .
- Ratones *Knock-out* para Lxr $\beta$  (Lxr $\beta$ -/-), modificados genéticamente de manera que carecen del gen Nr1h2, que codifica para la proteína Lxr $\beta$ .
- Ratones carentes de ambos genes (LXR $\alpha\beta$ -/-).

Estos ratones fueron proporcionados por David Mangelsdorf (U.Texas Southwestern, USA) (Peet et al., 1998).

- Ratones modificados genéticamente (MacGreen), en los que se ha insertado, en el extremo 5' del gen del receptor del factor de estimulación de colonias de macrófagos (Macrophage colony-stimulating factor, CSF-1) (Csflr), la secuencia para la expresión de la proteína fluorescente EGFP (enhanced green fluorescent protein) (Sasmono & Williams, 2012). El linaje mielóide derivado de la médula ósea expresará la proteína fluorescente verde EGFP.

Todos los ratones fueron alimentados con dieta estándar y mantenidos en condiciones libres de patógenos, en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). Los animales usados para experimentación fueron tratados de acuerdo a normas éticas de manipulación animal y supervisados por el Comité de Investigación de la ULPGC.

#### 1.2 CULTIVO CELULARES

Durante la realización de este trabajo se emplearon cultivos primarios de células derivadas de rata y ratón, así como líneas celulares murinas. La manipulación de ambas especies para la obtención de células primarias se llevó a cabo conforme a las normas del Comité de Ética y bienestar animal de la ULPGC.

### **1.2.1 Cultivo primario de las poblaciones celulares derivadas del lavado broncoalveolar (broncoalveolar lavage, BAL)**

Se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical, se expuso la tráquea, se realizó una pequeña incisión en ella y se canuló con un catéter (*BD Insyte I.V Catheter 22 GA*, BD). Se realizaron 5 lavados de 350  $\mu$ l con PBS-EDTA 0.01  $\mu$ M. El lavado recuperado se filtró (70  $\mu$ m, BD) y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Se resuspendió el pellet varias veces con PBS antes de volverlo a centrifugar, con el objetivo de eliminar los restos no celulares que se obtienen tras el BAL. Finalmente, se realizó el conteo excluyendo las células no viables con Tripán Blue.

#### **Citospin, Tinciones y Recuento celular.**

En algunos casos, se centrifugó con citospin (Shandon CytoSpin III Cytocentrifuge) (600 rpm, 2 minutos), un tipo de centrifugación que permite concentrar pequeñas cantidades de células (10<sup>5</sup> células/punto) en un área reducida en condiciones óptimas para la tinción, en este caso para realizar las tinciones de May-Grumwald Giemsa u Oil Red-O. En el primer caso, la tinción de May-Grumwald Giemsa resulta especialmente útil para la demostración de alteraciones en el número, proporción y morfología de células sanguíneas, en nuestro caso de las células de BAL. Brevemente, se fijaron las preparaciones de las células sobre un portaobjetos tras el citospin, con metanol durante 15 minutos, posteriormente se tiñó con May-Grumwald (Sigma) 5 minutos y con Giemsa (Sigma) 10 minutos. Posteriormente se trató con PBS pH 6.8 rápidamente, y se procedió a su deshidratación mediante el uso de sucesivos grados de acetona, finalmente se embebió 30 segundos en Xilol y se montó en DPX (Panreac). En otras ocasiones, se realizó la tinción de Oil Red-O, para la detección de células espumosas.

### **1.2.2 Cultivo primario de pneumocitos de rata (RT2P).**

La obtención de pneumocitos tipo II de rata (RT2P) se realizó siguiendo una versión adaptada del protocolo previamente establecido (Dobbs & González, 2002). El epitelio alveolar pulmonar recubre el 99% de la superficie interna de los pulmones y está constituido por dos tipos celulares, estructural y funcionalmente diferentes, los pneumocitos tipo I y el tipo II. Los tipo I son células alargadas, con citoplasmas muy delgados de unos 50-100  $\mu$ m y volúmenes de 3000  $\mu$ m<sup>3</sup> (Stone, Mercer, Gehr, Stockstill, & Crapo, 1992), comprenden sólo el 8% del total de las células pulmonares pero recubren el 95-98% de la superficie alveolar. Los pneumocitos tipo II son más pequeños y cuboidales, de unas 10  $\mu$ m de diámetro y aunque son aproximadamente el doble en número que los tipo I, sólo recubren el 2-5% de la superficie alveolar (Stone et al., 1992). Estos bajos porcentajes, unidos al hecho de que las uniones intercelulares en el epitelio alveolar son una de las más estrechas que se conocen (Schneeberger, 1978), hacen necesario el uso de dos

---

métodos combinados para el aislamiento de pneumocitos tipo II, la digestión enzimática y la selección celular. Una vez obtenida la suspensión celular de pneumocitos tipo II, es necesario cultivarlos de una manera específica, ya que tienden a transdiferenciarse a pneumocitos tipo I, perdiendo sus características funcionales típicas, en nuestro caso haciendo uso de una matriz extracelular (BD Matrigel), que simula la lámina basal que se encuentra bajo los epitelios.

### **Material y Soluciones de trabajo.**

- **Suero Fisiológico 0.9 g NaCl (Braun).**
- **Heparina:** 1% solución inyectable, 5000 U/5 ml (Hospira Prod .Farm. y Hosp, S.L.) 200µl.
- **Solución A:** HBSS 500 ml (*Hanks'Balanced Salt Solution*, Sigma), Gentamicina (Sigma) 1:1000.
- **Solución digestión enzimática:** 35 ml Solución A, 2 U/ml Dispasa (Gibco), 0.02 mg/ml DNAasa (*Deoxyribonuclease I from bovine pancreas*, Sigma).
- **Solución DNAasa:** 4 ml Solución A, 250 ug/ml DNAasa (Sigma).
- **Suero fetal bovino** (FBS, Fetal Bovine Serum Gold, PAA Laboratories GmbH): 5 ml.
- **Anestesia**, para rata de 300 g, aproximadamente:
  - o 0.75 ml Imalgene 1000 (ketamina clorhidrato 100 mg/ml, clorobutanol 5 mg/ml).
  - o 0.05 ml Domtor (Medetomidina clorhidrato 1 mg/ml).
- **Solución de IgG y recubrimiento.** Disolver IgG de ratón (*Mouse IgG, protein A purified-50mg, Ir-Ms-Gf*, Innovative Research, INC) a una concentración final de 500 ug/ml en 50 mM Tris, pH 9.5. Se filtra (0.22µm) y se añaden 5 ml a cada plato bacteriológico Petri (3), se incuba 3 horas a temperatura ambiente, y se realizan 5 lavados con solución A y uno final con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma). La finalidad de este recubrimiento ("IgG Panning") es que las IgG de ratón cubran el fondo del plato.
- **Medio de cultivo:** DMEM suplementado con 10% FBS.
- **Matriz extracelular:** BD Matrigel™ conservado a -20°C, se descongeló toda la noche a 4°C en la nevera. Se realizó una dilución 1:3 con DMED sin FBS, siempre en frío. Con el fin de obtener una consistencia final de gel sobre el plato de cultivo. Antes de añadirlo, se enfriaron las pipetas, puntas y platos de cultivos a usar ya que el gel polimeriza a partir de 22°C. Una vez añadido y bien distribuido en el plato de cultivo se pusieron 30 minutos a 37°C en el incubador, tras los cuales, están listos para plantar las células.

---

**Método de aislamiento y cultivo**

Se anestesia la rata, de unos 300g de peso, mediante inyección intraperitoneal con el cóctel anestésico. Seguidamente, se expone y canula la tráquea (16 GA 1,7 x 4,5 mm, BD Insyte™), y se ata fuertemente con hilo de sutura. Se expone el tórax, se elimina el timo, se localiza la arteria pulmonar en el corazón, y se inyecta 200 µl de heparina. Posteriormente se cánula (14 GA 1,7 x 4,5 mm, BD Insyte™), a través de la arteria pulmonar con un catéter por donde fluiría suero fisiológico, se realiza un corte en la aurícula izquierda, y realizando insuflaciones a través de la cánula de la tráquea se perfunden, perfectamente, los pulmones.



**Figura 11.** Pulmones de rata tras la perfusión

Se extrae el bloque corazón-pulmones-tráquea (todavía con la cánula) del tórax y se procede a realizar 8 lavados broncoalveolares, de 8 ml, con solución A, previamente atemperada a 37°C. En un vaso con solución A (200 ml), al baño maría a 37°C se introducen los pulmones, y se inocula la solución de digestión enzimática por la cánula traqueal, que sigue unida, 8 ml, cada 6 minutos un total de 4 veces (en total 32 ml de solución en 24 minutos).

Se retiran los pulmones del baño, y se elimina todo aquel tejido que no sea parénquima pulmonar. Se añade la solución de DNAasa y se tritura mediante tijeras quirúrgicas hasta obtener fragmentos de 1mm aproximadamente.

Posteriormente se añaden los 5 ml de FBS para parar la reacción enzimática. Se transfiere el tejido triturado a un erlenmeyer, y se bate a 37°C durante 5 minutos. Se pasa, a través de filtro de nylon, la suspensión celular por sucesivos poros de 100, 70, y 20 µm, ajustando el volumen final a 50 ml en un tubo cónico. La suspensión celular obtenida se centrifuga a 130g, durante 8 minutos. Se resuspende el pellet en 30 ml de DMED sin suero, y se distribuye en 10 ml para cada uno de los 3 platos de IgG preparados. Dejamos incubar a 37°C (la finalidad de este paso es permitir que se adhieran los macrófagos a las IgG y queden en suspensión los pneumocitos tipo II). Tras 30

---

minutos podemos recuperar estas células no adherentes, centrifugar, nuevamente y plantarlas con DMED al 10% FBS en el plato tratado con Matrigel, permitiendo, ahora sí, que se adhieran al gel.

Finalmente, para comprobar la pureza del cultivo se realiza inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-pro-SPC, exclusivo marcador para pneumocitos tipo II. A partir de un 85% de pureza se considera óptimo para su empleo en las diferentes técnicas experimentales.

### 1.2.3 Cultivo primario de pneumocitos de ratón (MT2P)

En el caso del estudio de los pneumocitos tipo II de ratón se desarrolló un protocolo de aislamiento que es la combinación del anteriormente mencionado (Dobbs & González, 2002) y el más recientemente publicado por Messier, Mason, & Kosmider en 2012. Ambos protocolos son parecidos, pero se diferencian en algunos puntos. Se detallan a continuación el material y soluciones de trabajo.

#### Material y Soluciones de trabajo

- **Perfusión:** Jeringa 10 ml (BD Discardit™), aguja 23 Gx1”Nr 16. 0,6mmx 25mm (BD Microlance™), Heparina Sódica Chiesi 1000 U/ml, PBS-EDTA 0,1 mM.
- **Canular la tráquea:** Cánula 22 GA 0.9x25mm (BD Insyte™), Seda trenzada 4/0, 90 cms (Lorca Marin)
- **Digestión enzimática:** Dispasa 5000 U/100ml (354235 BD™) en dilución 1:4 con HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*, Sigma). A 37°C antes de comenzar el protocolo.
- **Disgregación mecánica:** Se disgregan los pulmones en *GentleMACS™ Dissociator*, en los tubos *gentleMACS C-Tubes*, en el que se utilizará en programa *m\_lung\_01* (8 segundos). La solución de disgregación contiene DMED sin FBS 3ml/pulmón, 50 U/ml/pulmón de DNasa. A 37°C antes de comenzar el protocolo.
- **Filtrado:** El homogeneizado obtenido por filtros de nylon de 70 y 40 µm, diluyendo el homogeneizado con DMED suplementado al 10% de FBS
- **Solución de IgG y recubrimiento:** Como se indica en el apartado anterior.
- **Separación Inmuno-magnética:** *Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™*, BD Pharmigen) *Anti-mouse CD326 (EpCAM) Biotin* (eBioscience), *Anti-biotin MicroBeads* (Miltenyi Biotec), Superficie magnética *MACS MULTI STAND* (Miltenyi), *MiniMAC™ Separator*, *MACS® Separation Columns (MS columns)*, *autoMACS™ Running Buffer* (Miltenyi).

### **Método de aislamiento**

El sacrificio de los ratones se realizó mediante anestesia con sevofluorano (ABBOTT), seguidamente se abrió la cavidad abdominal y torácica, se realizó un corte en la vena cava y en la aurícula izquierda y se localizó la arteria pulmonar por la que se comenzó a perfundir con PBS-EDTA 0,1 mM, a través de una jeringa heparinizada. De esta manera, el blanqueo de los lóbulos pulmonares es instantáneo. Posteriormente, se expuso la tráquea. Se realizó una incisión entre dos anillos de la tráquea y se insertó la cánula. Atándola fuertemente con el hilo de sutura. El siguiente paso consiste en separar el bloque tráquea-pulmones-corazón del resto.

Una vez se tiene los pulmones canulados y separados, se insufla al interior la solución con la enzima (unos 2,5 ml) y se sumergen en 1 ml de la misma solución en un tubo de fondo cónico de 50 ml. Se permite que actúe la digestión de la enzima 6 minutos en un baño a 37°C. Tras la digestión enzimática, se recuperan los pulmones canulados y se separan del tejido no pulmonar con el material quirúrgico necesario. Se sumergen los lóbulos pulmonares en 3 ml de DMED con DNasa en el tubo gentleMACS C-Tube. Se programa al GentleMACS TM Dissociator con el programa m\_lung\_01, que tritura el tejido en pocos segundos. Tras la disgregación se realiza un pulso de centrifugación.

Seguidamente, tras la disgregación se realiza un pulso de centrifugación y se resuspende el pellet con 15 ml de DMED suplementado con 10% de FBS. El homogeneizado se filtra por consecutivos filtros de 70 y 40 µm. Se centrifuga 200 g durante 8 minutos. Se resuspende el pellet y se cuenta en la cámara de Neubauer. Excluyendo con Tripán Blue, se obtienen entre 20-25 x10<sup>6</sup> células/pulmón, aproximadamente. En este punto, se separa una alícuota y se lleva al Citospin (100.000 células). La muestra, ya en un portaobjetos recubierto con polilisina, se fija y se realiza inmunocitoquímica para el marcador de pneumocitos pro-SP-C. Este es el primer punto de control del proceso de aislamiento, obteniéndose entre un 5-8% de células SP-C positivas.

La suspensión celular obtenida tras la filtración del homogeneizado se cultiva en los platos recubiertos de IgGs (dos platos de cultivo por cada pulmón disgregado). Se permite que se adhieran las células inmunes y se queden en suspensión los pneumocitos tipo II, se deja 30 minutos a 37°C. Se recuperan las células no adheridas y se vuelve a sembrar, en otros dos platos IgGs y se deja otros 30 minutos a 37°C. Finalmente, se recuperan las células no adheridas y se centrifugan 200 g, 5 minutos. Se recuperan entre 8-12x10<sup>6</sup> células/pulmón. Una pequeña alícuota de 100.000 células se dedica al Citospin y posterior inmunocitoquímica con pro-SP-C. Este es el



---

segundo punto de control del aislamiento, normalmente se obtienen entre 18-20% de células pro-SP-C positivas.

Finalmente, el pellet obtenido de la última centrifugación se resuspende en un volumen pequeño de AutoMACS Running Buffer (0,3-0,5 ml), y se cuenta en la cámara de Neubauer, excluyendo con Tripán Blue. Se ajusta para tener aproximadamente unas  $1 \times 10^6$  células/10  $\mu$ l, se bloquea con Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32, durante 5 minutos, en hielo. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo Anti-mouse CD326 (EpCAM) Biotin, en dilución 1:100 durante 15 minutos en hielo también. Tras los 15 minutos, se lavó con 10 ml de autoMACS TM Running Buffer, y se centrifugó 200g, durante 5 minutos a 4°C. Se resuspendieron las células nuevamente, y se incubó con Anti-biotin MicroBeads, en dilución 1:10 durante 15 minutos. Se volvió a lavar con autoMACS TM Running Buffer, y se centrifugó nuevamente a 200g, 5 minutos a 4°C. Tras la centrifugación se resuspendieron las células en 500  $\mu$ l y se pasaron por la columna MACS® Separation Columns (MS columns).

La suspensión celular se pasa por la columna, para permitir la selección positiva de pneumocitos tipo II a través de su marcaje con CD326 (EpCAM) unido a su vez a la bola magnética. Tras el flujo de las células, no adheridas a la bola magnética, a través de la columna, se lava varias veces con autoMACS TM Running Buffer. Se separa la columna del campo magnético y se permite que las células atrapadas en la columna fluyan y se recuperen en un tubo de fondo cónico. Se centrifugan, a 200 g durante 5 minutos. Se cuentan en la cámara de Neubauer, se obtendrán finalmente entre  $1-3 \times 10^6$  células/pulmón y se destina una pequeña alícuota de 100.000 células para Citospin, repetir la inmunocitoquímica con pro-SP-C, y comprobar el porcentaje de pneumocitos tipo II que en este tercer punto de control, se encuentran aproximadamente entre el 80 y el 95%.

Por último las muestras obtenidas se procesaron según el punto 5.1 y 5.1.2 para el análisis de la expresión génica.

#### **1.2.4 Cultivo primario de macrófagos peritoneales de ratón**

En primer lugar, se provoca un reclutamiento de los macrófagos en el peritoneo del ratón mediante la inyección intraperitoneal de tioglicolato. En ratones de genotipo salvaje (WT) y dobles knock-out ( $LXR\alpha\beta^{-/-}$ ), de la misma edad y sexo. Tres días después de la inyección, se sacrificaron los ratones mediante anestesia con sevoflurano (ABBOTT) y se aislaron las células del peritoneo mediante sucesivos lavados de la cavidad peritoneal con 10 ml de PBS. Las células obtenidas de los lavados, se filtraron a través de un separador celular de Nylon, con un poro de 70  $\mu$ m (BD Falcon™, BD Bioscience) y se resuspendieron con medio de cultivo RPMI 1640 (Lonza)

suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS). Las células se sembraron en portaobjetos con cámara para cultivos celulares y se cultivaron a 37°C en una atmósfera que contenía 5 % de CO<sub>2</sub> – 95 % de aire, durante dos horas, tras las cuales, se realizaron 3 lavados con PBS con el fin de retirar otros tipos celulares presentes en el peritoneo que poseen menor capacidad de adherencia que los macrófagos.

### 1.2.5 Cultivo de la línea celular MLE-12

La línea celular MLE-12 (Murine lung epithelial cells, ATTC® CRL-2110™) se cultivó en medio DMEM F-12 (Sigma), ITS 5 ml (0.005 mg/ml insulina, 0.01 mg/ml transferrina, 30 nM Sodio selenita, Gibco) Hidrocortisona 10 nM (Sigma), β-estradiol 10 nM (Sigma), HEPES 10 mM, L-glutamina 1 mM, (Lonza) y 2% FBS. Previo a los tratamientos con ligandos sintéticos (GW3965, 1 μM, LG268 100 μM y G233 2 μM), se lavaron las células varias veces con PBS y se añadió medio fresco, esta vez al 0.2 % FBS.

## 1.3 MODELO DE INDUCCIÓN DE LIPIDOSIS EN MACRÓFAGOS PERITONEALES Y CÉLULAS MLE-12

Para estos experimentos se incubaron varios tipos celulares (macrófagos peritoneales y MLE-12) con fluidos broncoalveolares de diferentes genotipos (WT y LXRαβ<sup>-/-</sup>) con el fin de observar la respuesta de estas células a las condiciones diferenciales que representa la composición del surfactante de cada uno de los genotipos, (según protocolo modificado de (Naureckas et al., 1995).

Se realizaron los lavados broncoalveolares; uno con 2 x 500 μl de medio RPMI 1640 (Lonza) suplementado con 2 % de suero fetal bovino, en el caso de que posteriormente se fuera a utilizar para cultivar macrófagos peritoneales, y otro con medio suplementado con 0.2 % de FBS para el caso de cultivar células MLE-12. El volumen final obtenido (aproximadamente 1 ml) se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, y se recuperó el sobrenadante o fluido del lavado broncoalveolar (BALF, bronchoalveolar lavage fluid). En algunos casos se añadió en dilución 1:2000 LipidTOX™ Red phospholipidosis detection reagent a los BALF y se sometió a ultrasonidos en un sonicador (Bioruptor™, Diagenode) (3 pulsos de 30 segundos) para permitir que el contenido lipídico del BALF formara complejos con el componente fluorescente añadido. Posteriormente se añadió 400 μl de estos fluidos a las células cultivadas en portaobjetos con cámara (4) para cultivos celulares (4x10<sup>5</sup> macrófagos peritoneales/pocillo y 1,5x10<sup>5</sup> células MLE-12/pocillo) y se incubó toda la noche. A la mañana siguiente se lavaron las células varias veces con PBS y se fijaron las células con PFA 4% conteniendo a su vez en dilución 1:5000 de Hoechst 33342

---

dye durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron con PBS varias veces y se incubó durante una hora con LipidTOX™ Green neutral lipid stain 1:1000 en PBS. Se montó con medio de montaje (Vectashield Mounting Medium, Vector Laboratories).

#### **1.4 MODELO DE TRASPLANTES DE MÉDULA ÓSEA**

Para evaluar el papel de los macrófagos alveolares en el ambiente alveolar se desarrolló un modelo de trasplante de medula ósea.

##### **Irradiación de ratones receptores.**

La noche anterior al trasplante se asegura que los ratones receptores (10 semanas de edad) están sanos y se les priva de la comida, no así del agua. Al día siguiente se irradian (Cs-137) con una dosis letal (90 Gy) para la población celular de la médula ósea, suficiente para eliminar por completo la población de células de la médula ósea. Tras la irradiación se devolvieron los ratones receptores a jaulas autoclavadas, y se les permitió el acceso a alimento también autoclavado y agua suplementada con Enrofloxacino 20ml /L (Baytril 2.5%, Bayer).

##### **Aislamiento de la médula ósea de los ratones donantes.**

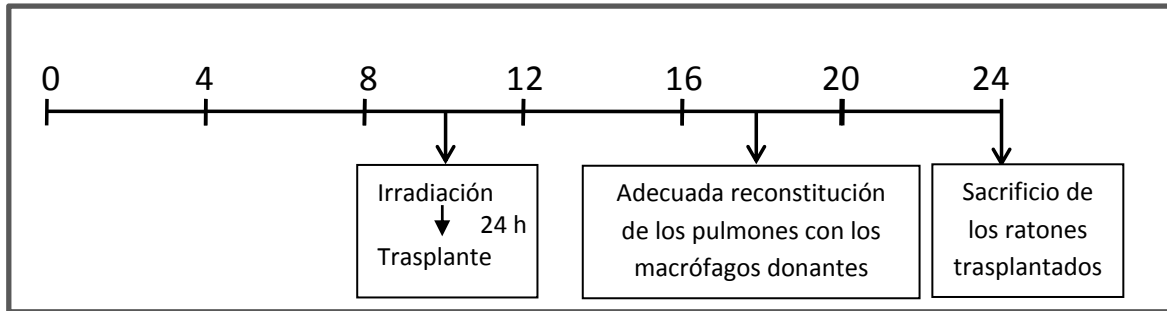
Tras 24 horas, se aisló la médula ósea de los ratones donantes, para ello las extremidades traseras se amputaron a la altura de la articulación de la cadera, se eliminó la piel y el músculo a su alrededor y se depositaron en un pequeño plato de cultivo con PBS. En condiciones de esterilidad, se separaron los huesos a la altura de la rodilla (fémur- tibia) se cortan sus extremos y se transfieren a un nuevo plato de cultivo que contiene medio RPMI. Se les inyecta este mismo medio de cultivo usando una jeringuilla de 10 ml y una aguja de 0.6 mm de diámetro. El proceso se repitió hasta que el interior del hueso quedó libre de células de la médula. Posteriormente, se filtró el medio obtenido a través de un separador celular de nylon, con un poro de 70 µm (BD Falcon™, BD Bioscience). La suspensión celular se centrifugó 1500 r.p.m. a 4°C durante 5 minutos.

##### **Inyección retro- orbital de las células donantes en el receptor.**

La médula ósea donante se resuspendió en PBS, para inyectar  $2-3 \times 10^6$  células en un volumen total de 150µl, vía retro-orbital. Estos ratones trasplantados se mantuvieron en las condiciones controladas antes mencionadas.

## Material y métodos

Finalmente, el sacrificio de los ratones trasplantados se realizó a los 6 meses, edad a la que se asegura que ha ocurrido una completa repoblación de los pulmones por células inmunocompetentes provenientes de la médula del donante (Matute-Bello et al., 2004).



**Figura 12. Protocolo de trasplante de médula ósea.** Se irradiaron ratones de 10 semanas de edad, 24 horas después se les trasplantó la médula donante. Sesenta días tras el trasplante se ha producido una adecuada repoblación de los pulmones por parte de la médula ósea donante. Finalmente se sacrificaron a las 24 semanas de edad.

Los trasplantes realizados, teniendo en cuenta el genotipo de los ratones donantes y receptores, fueron los siguientes:

Médula ósea Donante	Animal Receptor
WT	WT
LXRαβ -/-	LXRαβ -/-
WT	LXRαβ -/-
LXRαβ -/-	WT
MacGreen GFP <sup>+</sup>	WT
MacGreen GFP <sup>+</sup>	LXRαβ -/-

---

## **2. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA**

### **2.1 RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Para la extracción de tejido pulmonar y realización de técnicas de histología, se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical. Se procedió a la perfusión específica de los pulmones inoculando PBS a través de la arteria pulmonar. Posteriormente, se canuló la tráquea con un catéter corto de plástico (I.V. catheter 22 Ga, BD Insyte™) y se insufló medio OCT™ Compound (Tissue-Tek® Sakura), un polímero que solidifica a -20º C y preserva la estructura del tejido, con el fin de mantener la estructura pulmonar interna simulando una inspiración (sistema de bronquios, bronquiolos y sacos alveolares abiertos). Finalmente, se embebió el tejido, normalmente el lóbulo izquierdo, en un molde para histología (Lab-box) con OCT™ e inmediatamente se sumergió en isopentano frío en nieve carbónica, congelándose rápidamente. Estos moldes de tejido se conservaron en un congelador a -80º C.

### **2.2 OBTENCIÓN DE CRIOSECCIONES**

Se obtuvieron, mediante corte en criostato (Tissue-Tek® Cryo3®, Sakura), secciones de 4 µm de grosor de los tejidos congelados en OCT™. Los cortes realizados se recogieron en portaobjetos (Superfrost® plus, Thermo Scientific) que se dejaron secar al aire, durante unos minutos, antes de proceder a la tinción histológica o llevarse, de nuevo a -80°C para su conservación a largo plazo.

### **2.3 TINCCIONES**

Se llevaron a cabo varios tipos de tinciones para el análisis de las estructuras pulmonares. Tinciones topográficas, como la de hematoxilina eosina, cuyo objetivo es la de evaluar el conjunto del tejido, y las histoquímicas para la detección de lípidos colágeno, o glúcidos. Se detallan sus resultados en la tabla inferior (Edna, P. 1995. Métodos Histotecnológicos, AFIP).

<b>Técnica histológica</b>	<b>Resultado</b>	<b>Materiales</b>
Hematoxilina-Eosina	Núcleos: Azul-Violeta Citoplasma: Rosa	Hematoxilina de Harris (Panreac) Eosina amarillenta (Sigma)
Oil-Red-O	Núcleos: Azul Lípidos neutros: Rojo	Oil red- O (Sigma)
Tricrómico de Masson (Masson PJ,1929)	Núcleos: Azul oscuro-negro Miofibrillas, citoplasma: rojo Colágeno: azul o verde	Trichrome Stain (Masson) kit (Sigma)
Tinción del Ácido Peryódico de Schiff (PAS)	Núcleo: azules Moléculas glicosiladas: rosa	Periodic Acid-Schiff (PAS) kit (Sigma)

### 3. TÉCNICA HISTOLÓGICA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Para el análisis ultraestructural de los pulmones se realizaron estudios de microscopía electrónica de transmisión, tras 24 h de tratamiento con la Dexametasona, los ratones se sacrificaron y se perfundieron con solución de fijación (2 % glutaraldehído en PBS) por vía intracardiaca, antes de extraer los pulmones. Los pulmones se extrajeron, se pesaron y se dividieron en pequeños trozos (aproximadamente de 5-8 mm), tras lo cual, se volvieron a fijar en la misma solución de fijación durante toda la noche. Después, las muestras se post-fijaron con OsO<sub>4</sub> al 2 % en PBS y acetato de uranilo en solución acuosa al 1 %. Posteriormente, se procedió a la deshidratación de las muestras en una serie de grados crecientes de etanol. Las muestras, así fijadas y deshidratadas, fueron embebidas en resina Epoxi (EMBed 812) y polimerizadas a 70°C. Se realizaron cortes semi-finos (1 µm) y ultra-finos (50-100 nm) con un ultramicrotomo (Reichert Ultracut's Leica). Los cortes ultra-finos fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, para finalmente ser analizados con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 910 (Carl ZEISS, Germany) a 80 kV y las imágenes se tomaron con cámara digital Proscan SlowScan CCD-Camera for TEM (Fa.Proscan Elektronische Systeme GmbH, Germany) y software Soft Imaging System.

---

## 4. CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

Se utilizaron distintas técnicas para la detección de proteínas en función de la procedencia de la muestra y la finalidad de la técnica (cuantificación, localización tisular, sublocalización celular o identificación de proteínas). En la tabla 1 de Material y Métodos se muestran los anticuerpos usados, la procedencia de los mismos y la dilución empleada para cada una de las técnicas empleadas.

### 4.1 INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE EXTRACTOS CELULARES: WESTERN-BLOT (WB)

#### 4.1.1 Obtención de proteínas totales.

Las muestras, procedentes de tejidos de ratón, se homogeneizaron mediante el triturador ULTRATURRAX (IKA), en presencia de tampón de lisis de proteínas frío, (20mM Tris-HCl (pH 7.5), 120mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 10% glicerol, 1mM pirofosfato sódico, 20mM fluoruro sódico, 1mM ortovanadato sódico y un cóctel de inhibidor de proteasas (*Complete protease inhibitor cocktail, Roche*). A continuación se centrifugaron 5 minutos a 14.000 r.p.m. y 4°C. Los sobrenadantes resultantes de la centrifugación se mezclaron con el tampón de carga 5X, para electroforesis, en geles de acrilamida (SDS-PAGE) (100mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.05 mM *sodiumorthovanadate*, 3% SDS, 1 mM EDTA, 2% 2-mercaptoetanol, 5% glicerol). La determinación de la concentración proteica de cada muestra se realizó según el método BCA (ácido bicinconínico), donde los cambios de absorbancia a 562 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína presente (Smith et al., 1985).

Para el procesado de muestras procedentes de cultivos celulares, éstos se lisaron con el tampón de lisis previamente mencionado, y se procedió de igual manera que en los pasos posteriores para la extracción de las proteínas.

#### 4.1.2 Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Las proteínas se fraccionaron electroforéticamente en presencia del detergente aniónico SDS, que permite separar proteínas en función de su peso molecular. Los geles de poliacrilamida se prepararon en un porcentaje de reticulación, entre el 6% y el 10%, en función del peso molecular de la proteína de interés, con una proporción 29:1 de acrilamida: bisacrilamida. Estos geles, conteniendo las muestras, en tampón de electroforesis (glicina 1.25 M, Tris-HCl 12mM y SDS

0.2%) y dentro de cubetas Mini Protean II® (Bio Rad), fueron sometidos a un voltaje constante de 120 V.

#### **4.1.3 Transferencia e inmunodetección**

Una vez separadas las proteínas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Blot transfer Medium, Bio Rad Laboratories) a un amperaje constante de 250 mA, durante 3 horas, a 4°C en un medio de transferencia constituido por Tris 25mM, glicina 192mM y metanol 20%, pH8.3. Posteriormente, las membranas se incubaron durante una hora, a temperatura ambiente, con una solución de bloqueo que contenía leche desnatada al 5 % disuelta en TBS (Tris-HCl, 50 mM pH 7.4, NaCl 200 mM), con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido 1:2. Después de incubar toda la noche las membranas a 4°C, éstas fueron lavadas 3 veces durante cinco minutos con TBS-T (TBS con el detergente Tween-20 al 0,1 %), tras lo cual, las membranas se incubaron durante una hora, a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario que lleva acoplada moléculas de peroxidasa de rábano (Horseadishperoxidase, HRP). Por último, las membranas se incubaron en presencia de un compuesto fotosensible, el luminol (ECL Plus, Amersham). Las proteínas reconocidas con el anticuerpo primario y, posteriormente, el secundario, estarán acopladas, por tanto, a moléculas de peroxidasa que reaccionan con el luminol, el cual, cuando se oxida, emite luminiscencia que puede ser revelada por la exposición en una película fotosensible.

#### **4.2 INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS EN CULTIVO: INMUNOCITOQUÍMICA (ICQ)**

Para la inmunodetección de proteínas en cultivos celulares se sembraron las células sobre cubreobjetos de cristal tratados diferencialmente en función del tipo celular o en portaobjetos con cámara para cultivos celulares (LabTek® ChamberSlide™ System, 8 well glass slide). En el caso de macrófagos peritoneales el cultivo se realizó de manera rutinaria, sin embargo, para el cultivo de las células de la línea MLE-12 previamente se recubrió el cubreobjetos con FBS (Fetal Bovine Serum Gold, PAA Laboratories GmbH), durante 1 hora a 37°C, con el fin de mejorar la adherencia de las células. De la misma forma para el cultivo de las células derivadas del lavado broncoalveolar (BAL, broncoalveolar lavage) se realizó un recubrimiento con 50 ug/ml polilisina (Sigma) y 50ug/ml fibronectina (Sigma), y finalmente en el caso del cultivo primario de pneumocitos aislados de rata se recubrió con BD Matrigel™ (*Basement Membrane Matrix, 10 ml vial*), una matriz sintética que simula la lámina basal epitelial.



---

Una vez que las células fueron cultivadas sobre las superficies tratadas, se lavaron varias veces los cultivos con PBS con el fin de eliminar el medio de cultivo. Posteriormente se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) 4%, durante 15 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se lavó con PBS nuevamente para eliminar los restos de PFA. Las células se incubaron durante una hora, a temperatura ambiente, con la solución de bloqueo (PBS al 6 % de BSA, bovine serum albumin, más 2 % de suero normal de cabra) para evitar la unión del anticuerpo primario a epítomos inespecíficos. En algunos casos, hubo que realizar un paso de permeabilización, cuando el antígeno a localizar era citoplasmático, para lo que se añadió a la solución de bloqueo saponina al 0.2% y se dejó actuar durante una hora. El anticuerpo primario se incubó, según la dilución indicada (tabla 1), en solución de bloqueo diluida 1:2 en PBS, durante toda la noche, a 4° C o en otros casos durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras realizar tres lavados con PBS, se incubaron durante una hora, a temperatura ambiente y en oscuridad, con el anticuerpo secundario acoplado a una molécula fluorescente (tabla 1). Finalmente, las células se lavaron tres veces con PBS y se procedió al montaje con un medio que incluía DAPI (Vectashield Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories), colorante que se acopla específicamente al DNA por lo que tiñe los núcleos de las células de color azul. La adquisición y procesamiento de las imágenes se efectuó mediante el sistema de microscopía confocal LSM 5 PASCAL Lasser Scanning Microscope (Zeiss) y el programa LSM 5 Image Examiner.

### **4.3 INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN TEJIDOS**

Con el objetivo de localizar y caracterizar los tipos celulares de interés se llevaron a cabo marcajes simples y dobles en muestras de tejido pulmonar, realizando dos tipos de técnicas: inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

#### **4.3.1 Inmunofluorescencia en tejidos congelados (IF)**

La inmunofluorescencia se basa en la detección de antígenos en los tejidos mediante la utilización de anticuerpos que están acoplados a moléculas fluorescentes (tabla 1). Estos anticuerpos pueden ser, tanto anticuerpos primarios dirigidos al epítomo de interés, como anticuerpos secundarios que se usan para revelar la presencia del primario. La técnica inmunofluorescente consistió en un primer paso de fijación con PFA 4 % en PBS, a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras la fijación de los tejidos se realizaron tres lavados, de cinco minutos cada uno, con PBS-T (PBS con 0,1 % de Tritón, un detergente empleado con el fin de permeabilizar las células) y se realizó el bloqueo de las muestras con PBS-Tal 6 % de BSA y 2 % de suero normal de cabra.

La reacción con el anticuerpo primario se llevó a cabo con el anticuerpo diluido (tabla 1) en solución de bloqueo, diluida 1:2 en PBS. La incubación de los anticuerpos primarios se realizó en cámara húmeda, durante una hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4<sup>o</sup> C, en función de las características de cada epítipo o anticuerpo. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó, tras sucesivos lavados, durante una hora a temperatura ambiente. En algunos casos se incubó, junto con el anticuerpo secundario, con BODIPY<sup>®</sup> 493/503 (*4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene*) a una dilución final de 1 ug/ml, compuesto de estructura no polar, lipofílico que se usa para teñir lípidos neutros y otros lípidos no polares (Listenberger & Brown, 2007).

Finalmente, se utilizó el medio de montaje Vectashield Mounting Medium con DAPI (Vector laboratories) y los tejidos se analizaron y fotografiaron en un microscopio de fluorescencia LSM 5 PASCAL Lasser Scanning Microscope (Zeiss) y con el programa LSM 5 Image Examiner.

### **4.3.2 Inmunohistoquímica en tejidos congelados (IHQ)**

La detección de proteínas en tejidos, mediante inmunohistoquímica, consiste en el reconocimiento del epítipo de interés mediante anticuerpos, de la misma manera que en las técnicas de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia en tejidos, pero la tinción se revela mediante reacciones enzimáticas. En este caso, se realizó el revelado mediante la reacción de la enzima peroxidasa, cuyo sustrato (Diaminobencidina, DAB) produce un color pardo y la fosfatasa alcalina, cuyo sustrato (nitroazul de tetrazolio) produce un color azul. Concretamente, el proceso comienza como una inmunofluorescencia, con la fijación con PFA 4%, el bloqueo y la incubación con el anticuerpo primario. Cuando el revelado se realizó con la diaminobencidina, fue necesario realizar un paso extra de bloqueo o saturación (previo al bloqueo) de las peroxidasas endógenas del tejido, incubando los portaobjetos, con las muestras, con una solución que contenía metanol al 10 % y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 1 %, durante 10 minutos, en hielo. Tras el anticuerpo primario, se incubaron las muestras con anticuerpos secundarios (Tabla 1) que llevan acopladas moléculas de biotina. Los anticuerpos biotinilados permiten la amplificación de la señal de determinados anticuerpos gracias al posterior uso de unos kits comerciales (incubaciones de 30 minutos) que incluyen la estreptavidina, molécula que tiene una alta afinidad por la biotina, acoplada a moléculas de peroxidasa (VECTASTAI6<sup>®</sup> Universal Elite<sup>®</sup> ABC Kit, Vector laboratories), o fosfatasa alcalina (VECTASTAI6<sup>®</sup> Universal ABC-APKit, Vector laboratories). Finalmente, la reacción colorimétrica, para cada una de las enzimas acopladas a los anticuerpos, se realizó con los kit comerciales *DAB HRP substrate* (Vector) para la peroxidasa y *Vector<sup>®</sup> Blue AP substrate* (Vector) para la fosfatasa alcalina.

---

Por último, se contratiñeron los núcleos de las células con hematoxilina (Panreac), en el caso de las inmunohistoquímicas reveladas con diaminobencidina, y con verde metilo (Methyl Green, Vector Laboratories), en el caso de las inmunohistoquímicas reveladas con Vector® Blue AP substrate.

## 5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

### 5.1 EXTRACCIÓN DE RNA

Las muestras de RNA que se utilizaron en los experimentos procedían de tejido congelado y de células en cultivo. En cualquiera de los dos casos, la extracción se realizó con el reactivo TRIZOL® (Invitrogen), un reactivo que incorpora una mezcla estable de fenol, GuSCN y colorante y estabilizantes que facilitan la extracción del RNA. En el caso de la extracción a partir de tejidos, cuando éstos se aíslan del animal, se ponen en presencia del reactivo TRIZOL® y en este medio, se disgregan usando un triturador ULTRA-TRURRAX (IKA). Para la extracción del RNA a partir de cultivos celulares, las células se lavaron con PBS y se levantaron del plato de cultivo mediante la adición del reactivo TRIZOL®. Una vez obtenido el RNA de las muestras, se cuantificó mediante la medición de la absorción, a 260nm (longitud de onda de absorción de los nucleótido) usando un espectrofotómetro (Spectrophotometer, Nanodrop).

### 5.2 RT-QPCR (REVERSE TRANSCRIPTION QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION)

Se utilizó la técnica de RT-qPCR para cuantificar los niveles relativos de RNA mensajero (mRNA) de los genes de interés en cada experimento. Para ello, se diseñaron unos cebadores específicos (*primers*) para amplificar cada gen. Las secuencias específicas de estos cebadores se muestran en la tabla 2.

La técnica de RT-qPCR comprende una primera fase de retrotranscripción de RNA o síntesis de DNA complementario (DNAC) y una segunda fase de amplificación del fragmento de DNAC con los cebadores específicos. Para realizar la retrotranscripción, se usó 1µg de RNA y se utilizó el kit "*iScript cDNA Synthesis Kit*" (Biorad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para realizar la qPCR se utilizaron 2,5 ng de DNAC de cada muestra, 0,3µM de los cebadores específicos y 10 µl del cóctel 2X PCR MasterMix (Diagenode) que contenía la enzima polimerasa (*Taq DNA polymerase*), un tampón de reacción con MgCl<sub>2</sub> a 5mM y los nucleótidos. Además, se añadió isotiocianato de fluoresceína (*FITC*) que dará la fluorescencia necesaria para la cuantificación de las copias de DNA que se generan. Toda la mezcla de reacción fue amplificada en un

termociclador (*iQTM5, Multicolor Real-Time PCR Detection System*, BioRad) y los datos se analizaron con el *iQ5 Software Data Analysis* (BioRad). La expresión de los genes estudiados se normalizó con la expresión del gen de la polimerasa 2 (Pol2).

Los análisis de ARNm se realizaron en muestras procedentes de cultivos celulares primarios como macrófagos peritoneales, células obtenidas mediante lavado broncoalveolar y pneumocitos tipo II de ratón. También se analizó la línea inmortalizada de pneumocitos MLE-12. Además, se estudiaron muestras de pulmón total de animales WT y LXR $\alpha\beta$ -/- tanto a nivel basal como tras la estimulación intraperitoneal, con el agonista sintético de LXR, GW3965. Para ello, tras mantener a los ratones en ayuno se les inyectó intraperitonealmente una dosis de 10 mg/kg del agonista. Tres horas después se sacrificaron y se procesaron como se ha descrito previamente.

## 6. EVALUACIÓN DEL METABOLISMO LIPÍDICO EN PULMÓN

### 6.1 EVALUACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA DE LA ACUMULACIÓN LIPÍDICA DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES EN CULTIVO

Antes de proceder al aislamiento de las poblaciones derivadas del BAL, se recubrió la superficie a cultivar con 50ug/ml polilisina (Sigma) y 50ug/ml fibronectina (Sigma). Seguidamente se cultivaron  $2 \times 10^5$  células por pocillo del portaobjetos con cámara para cultivos celulares (LabTek® ChamberSlide™ System, 4 well glass slide) con medio de cultivo RPMI 1640 (Lonza) suplementado con 10 % de suero fetal bovino. Se permitió la adherencia de las células durante dos horas y se lavó con PBS.

Para la localización de macrófagos alveolares se realizaron técnicas de inmunofluorescencia, localizando macrófagos alveolares mediante el uso de un anticuerpo anti-CD68 acoplado a una molécula fluorescente AF-594 (BDbioscience) e incubando conjuntamente con una dilución de Bodipy 493/503 (Molecular Probes; 50 mM stock in DMSO), molécula que tiñe lípidos neutros en verde.

Con la finalidad de detectar la acumulación de especies lipídicas por parte de los diferentes fenotipos obtenidos en el lavado broncoalveolar se utilizó el kit *HCS LipidTOX™ Phospholipidosis and Steatosis Detection Kit* (Invitrogen). Brevemente, se incubaron las células durante toda la noche con una dilución 1:2000 de *LipidTOX™ Red phospholipidosis detection reagent* (detecta fosfolípidos y tiene un espectro de Emisión/Excitación 585/609, rojo), al día siguiente se fijaron las células con PFA 4% conteniendo a su vez en dilución 1:5000 de *Hoechst 33342 dye* (marca

---

núcleos y fluoresce en azul) durante 30 minutos. Finalmente se incubó con *LipidTOX™ Green neutral lipid stain* (detecta lípidos neutros y tiene un espectro de Emisión/Excitación 500/510, verde) 1:1000 en PBS durante 1 hora. Se montó con medio de montaje (Vectashield Mounting Medium, Vector Laboratories).

Con este procedimiento se evalúa la posible fosfolipidosis (acumulación de fosfolípidos) y/o esteatosis (acumulación de lípidos neutros) que puedan presentar las células obtenidas en el lavado broncoalveolar para los diferentes fenotipos estudiados.

## 6.2 DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES LIPÍDICAS DEL PULMÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE ALTA EFICIENCIA

Se realizó para dos tipos de muestras, de extractos de pulmón total y de fluido de lavado broncoalveolar (BAL) de animales WT y LXR $\alpha\beta$ -/-.

El extracto lipídico se realizó con cloroformo/metanol (2:1 v/v) conteniendo 0.01 % de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante. El solvente orgánico se evaporó bajo atmósfera de nitrógeno, y el contenido lipídico se determinó gravimétricamente. Se separaron las clases lipídicas mediante cromatografía en una dimensión en capa fina de alta eficiencia (One-dimensional double development high performance thin layer chromatography) HPTLC usando metil acetato/isopropanol/cloroformo/metanol/KCl 0.25% (5:5:5:2:1.8 v/v) como solvente para las clases lipídicas polares, y hexano/dietil éter/ácido acético (22.5:2.5:0.25 v/v) como solvente para las clases lipídicas neutras. Las clases lipídicas fueron cuantificadas mediante carbonización con acetato cúprico acuoso 3% (w/v) conteniendo ácido fosfórico 8% (v/v) en Shimadzu CS-9001PC dual wavelength flying spot scanner.

Las clases lipídicas fueron purificadas del total de lípidos mediante TLC. Las bandas que contenían cada una de las fracciones se rasparon de las placas y se separaron en tubos. Los fosfolípidos y triglicéridos se sometieron a transmetilación mediante catálisis ácida durante 16 h a 50°C, usando 1 ml de tolueno y 2 ml de ácido sulfúrico (v/v) en metanol. Los ésteres de ácidos grasos metilados (FAME, fatty acid methyl esters) se purificaron mediante TLC, y se visualizaron pulverizando con yodo en cloroformo al 1%. Durante la transmetilación mediante catálisis ácida, los FAME se generan simultáneamente con dimetil acetales (DMA) que se originan a partir de cadenas 1-alqueno de los plasmalógenos. Los FAME y DMA se separaron, y cuantificaron utilizando un cromatógrafo equipado con un detector de ionización de llama (250°C) Shimadzu GC-14A y columnas capilares de sílice fundida Supercowax™ 10 (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

(diámetro interno 30 mm x 0.32 mm). Se usó Helio como gas transportador. La temperatura inicial del horno fue de 180°C durante 10 minutos, seguido por un incremento de 2.5°C cada minuto hasta una temperatura final de 215°C. Los FAME y DMA individuales se identificaron mediante referencia a auténticos estándares.

El índice de insaturación se calculó como el  $\sum m_i n_i$ , donde  $m_i$  es el porcentaje de moles y  $n_i$  es el número de dobles enlace carbono-carbono de los ácidos grasos. El índice de peroxidabilidad se calculó (Cosgrove, Church, & Pryor, 1987) como  $\sum \text{monoenoic} * 0.025 + \sum \text{dienoic} + \sum \text{trienoic} * 2 + \sum \text{tetraenoic} * 3 + \sum \text{pentaenoic} * 6 + \sum \text{hexaenoic} * 8$ .

### **Análisis estadístico**

La composición lipídica inicial se analizó mediante el análisis doble de la varianza (two-way ANOVA) seguido del test de Tukey post-hoc. Las clases lipídicas, principalmente ácidos grasos, fueron adicionalmente sometidos a análisis de factores por medio de análisis de componentes principales (PCA). Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS, versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM y como un porcentaje del total de las clases lipídicas o ácidos grasos. Para alcanzar la normalidad, los datos de lípidos se transformaron mediante arcoseno.

## **7. EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS CELULAR MEDIANTE TÉCNICA DE TÚNEL**

La reacción de TUNEL (*Terminal - dUTP -nick end labeling*) es la técnica más ampliamente utilizada para la detección de células apoptóticas. Las células apoptóticas presentan núcleos cuyo DNA ha comenzado a fragmentarse presentando multitud de extremos 3'-OH libres. Mediante esta técnica se acoplan nucleótidos marcados con una molécula fluorescente o Biotina a estos extremos libres de manera que mediante técnicas histológicas son fácilmente identificables. En nuestro caso, realizamos la reacción enzimática con la transferasa terminal (*Terminal transferase, recombinant\** Roche) la cual acopla nucleótidos biotinilados (*Biotin-16 UTP*, Roche). El protocolo consistió en fijar los cortes de tejidos con PFA 4% durante 10 minutos. Posteriormente se permeabilizó con Tritón al 2% en PBS frío, también 10 minutos. Se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena, sumergiendo los cortes en una solución acuosa al 10 % de metanol y 3% en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> otros 10 minutos. Entre cada uno de estos pasos se realizaron 3 lavados en PBS durante 5 minutos cada uno. Seguidamente se llevó a cabo la reacción de TUNEL según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se preparó el tampón TdT. Para 1 ml se preparan 200  $\mu$ l de TDT 5x tampón de reacción y 40  $\mu$ l de solución de CoCl<sub>2</sub> en 760  $\mu$ l de PBS. A este mililitro de tampón TdT

---

se le añaden 3  $\mu$ l de la enzima *Terminal transferase, recombinant\** y 2  $\mu$ l de los nucleótidos *Biotin-16 UTP*. Esta reacción tuvo lugar a 37°C durante 20-30 minutos. Posteriormente se lavaron las muestras 3 veces durante 5 minutos en PBS y se procedió a realizar la amplificación de la señal con el ABC kit (*VECTASTA16®Universal Elite® ABC Kit*, Vector laboratorios), revelado con DAB (*DAB HRP substrate*, Vector) y contratinción con hematoxilina (Panreac)

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores presentados son la media  $\pm$  el error estándar de los resultados obtenidos en ensayos valorados por triplicado, de un número variable de experimentos que se especifica en cada caso. El análisis comparativo entre dos grupos de muestras se efectuó mediante la prueba t-Student para dos muestras (no pareado) (Excel, Microsoft). Se consideró que hubo diferencias estadísticamente significativas cuando el nivel de significación bilateral fue  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) o  $p < 0.001$  (\*\*\*) como se indica en cada caso.

## ➤ ANEXO

Tabla I. Anticuerpos

ANTICUERPO	PROVEEDOR	WB	ICQ	IHQ
Rat anti-B220	Catlag			1:300
Rat Anti-CD3	Hibridoma			Puro
Rat anti-CD68	Serotec		1:300	1:300
Rat anti-Sialoadhesina	Cedido amablemente por el Dr. Simon Gordon			1:50
Rabbit anti- Pro-SPC	Millipore	1:1000	1:2000	1:1000
Rabbit anti-ABCA1	Novus	1:10000		
Mouse anti- $\beta$ -actina	Sta. Cruz	1:200		
Rabbit anti-LXR $\alpha$ $\beta$	Cedido amablemente por el Instituto Karolinska	1:1000		
Rabbit anti-GFP	Abcam			1:5000
Goat Anti-rat IgGAlexa Fluor <sup>®</sup> 488	Invitrogen		1:400	1:400
Goat Anti-rat IgGAlexa Fluor <sup>®</sup> 594	Invitrogen		1:500	1:500
Rabbit anti-Rat biotin	Dako			1:150
Goat anti-rabbit biotin	Dako			1:150
Goat anti-mouse HRP	Sta. Cruz	1:10000		
Goat anti-rabbit HRP	Sta. Cruz	1:10000		

Tabla 1. Dilución de trabajo de los anticuerpos empleados en los experimentos de Western blot (WB), inmunocitoquímica (ICQ), inmunofluorescencia (IF).



Tabla II Cebadores

GEN DIANA	SECUENCIA ESPECÍFICA DEL CEBADOR qPCR
<b>ABCA1</b>	Sentido: 5'- GCAGATCAAGCATCCCAA CT-3' Anti-sentido: 5'- CCAGAGAATGTTTCATTGTCC A-3'
<b>ABCA3</b>	Sentido: 5'- CCTTCTTCAGTAAAGCCAAC-3' Anti-sentido: 5'- CCAGGCCATAGAGTGCTGAG-3'
<b>ABCG1</b>	Sentido: 5'-TCACCC AGTTCTGCATCC TCT T-3' Anti-sentido: 5'- GCAGATGTGTGACGACCGAGT-3'
<b>ACAT</b>	Sentido: 5'- TTTCTCTGGGCCATCCAAT-3' Anti-sentido: 5'- AGGGCATGAGCCATATGAAC-3'
<b>FASN</b>	Sentido: 5'-TGCTGAGAATCGAGGAGACA-3' Anti-sentido: 5'- GACCGGCCAGAGTGTTC-3'
<b>GPAT</b>	Sentido: 5'-GGAAGGTGCTGCTATTCCTG-3' Anti-sentido: 5'-TGGGATACTGGGGTTGAAAA-3'
<b>LPCAT1</b>	Sentido: 5'-GCTGGTGAGCTGTCCTTGAT-3' Anti-sentido: 5'-GGTGACGTTCTTGAAGA-3'
<b>LPCAT3</b>	Sentido: 5- TTCAGTTTGGCATGCTGGT-3' Anti-sentido: 5'- ATTGTCCTGGCTCAGGATTC-3'
<b>LCAT</b>	Sentido: 5'- GGCTGAACTCAGTAACCACACA-3' Anti-sentido: 5'- TTGGCTTCTAGCCGATTCC-3'
<b>LXR<math>\alpha</math></b>	Sentido: 5'- CAA CAG TGT AAC AGG CGC T-3' Anti-sentido: 5'- TGCAATGGGCCAAGGC-3'
<b>LXR<math>\beta</math></b>	Sentido: 5'- CCCACAAGTTCTCTGGACACT-3' Anti-sentido: 5'- TGACGTGGCGGAGGTACTG-3'
<b>MCP-1 (CCL-2)</b>	Sentido: 5'- CATCCACGTGTTGGCTCA-3' Anti-sentido: 5'- GATCATCTTGCTGGTGAATGAGT-3'
<b>MIP-2<math>\alpha</math> (CXCL2)</b>	Sentido: 5'-AGTGAAGTGCCTGTCATGC -3' Anti-sentido: 5'- AGGCAAACTTTTGACCGCC -3'
<b>MIP-1<math>\beta</math> (CCL4)</b>	Sentido: 5'-CATGAAGCTCTGCGTGTCTG-3' Anti-sentido: 5'-GGAGGGTCAGAGCCATT-3'
<b>MMP-8</b>	Sentido: 5- AACGGGAAGACATACTTCTTCATAA-3' Anti-sentido: 5'- GGGTCCATGGATCTTCTTTG-3'
<b>MMP-12</b>	Sentido: 5- TGCTGATGACATACGTAACATTCA-3' Anti-sentido: 5'- TTGTCAAGGATGGGGGTTT-3'
<b>POL-2</b>	Sentido: 5- TGACGACTTGAAAAATGCTG-3' Anti-sentido: 5'- CCAGATGGGAGAATCTCGAC-3'
<b>SPA</b>	Sentido: 5'-CTGGAGAACATGGAGACAAGG-3' Anti-sentido: 5'- AAGCTCCTCATCCAGGTAAGC-3'
<b>SPB</b>	Sentido: 5'-AACCCACACCTCTGAGAAC-3' Anti-sentido: 5- GTGCAGGCTGAGGCTTGT-3'
<b>SPC</b>	Sentido: 5'-GGTCTGATGGAGAGTCCAC-3' Anti-sentido: 5'- GATGAGAAGGCGTTTGAGGT-3'
<b>SPD</b>	Sentido: 5'-GGCCTTAAAAGGAAAACACTACAGC-3' Anti-sentido: 5'- CCATCAGGGAACAATGCAG-3'
<b>SPP-1</b>	Sentido: 5'-CCCGGTGAAAGTACTGATT-3' Anti-sentido: 5'- ATCTGGGTGCAGGCTGTAA-3'
<b>SREBP1c</b>	Sentido: 5'- TGGATCTGTACACTTTACACAGTTCCA-3' Anti-sentido: 5'- CCCGTTTTCTGAAAACCTAAA-3'

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados en los experimentos de RT-qPCR



# RESULTADOS



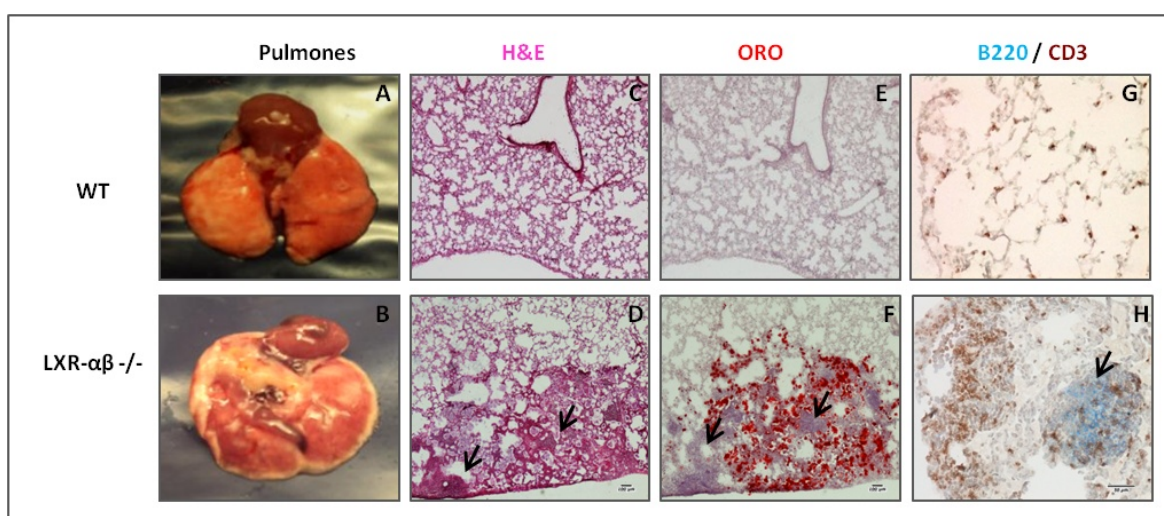
## RESULTADOS

### 1. LOS PULMONES DE ANIMALES $LXR\alpha\beta^{-/-}$ DESARROLLAN INFLAMACIÓN Y LIPIDOSIS

#### 1.1. Acumulación celular y lipídica progresiva en los pulmones $LXR\alpha\beta^{-/-}$

##### i. Análisis histológico de pulmones de animales WT, $LXR\alpha^{-/-}$ , $LXR\beta^{-/-}$ , $LXR\alpha\beta^{-/-}$

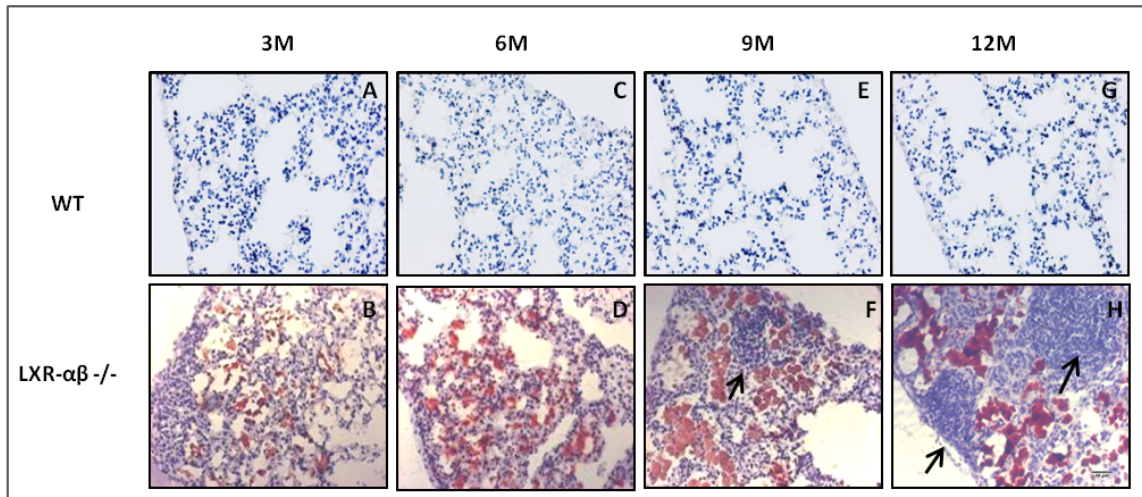
La primera aproximación para determinar el papel de los receptores LXR en la fisiología pulmonar consistió en un estudio histológico del pulmón de ratones WT,  $LXR\alpha^{-/-}$ ,  $LXR\beta^{-/-}$  y  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ . A nivel macroscópico se observa un halo blanquecino que bordea los lóbulos pulmonares (área subpleural) de los animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ , rasgo morfológico diferenciador que aparece a los 2 meses de vida del animal y se hace bastante patente a partir de los 6 meses (Figura 13, B). El halo blanquecino de los lóbulos pulmonares  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  es, histológicamente, una zona caracterizada por la presencia de infiltrados celulares (Figura 13, D). El análisis de cortes consecutivos indica, que entre estos infiltrados celulares hay áreas Oil Red-O positivas, lo que indica la existencia de una lipidosis en los animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (Figura 13, F). Realizando una tinción inmunoenzimática para el marcador B220 (linfocitos B) y CD3 (linfocitos T), en otra zona del área subpleural, se constata que estos infiltrados se corresponden con células inmunitarias (Figura 13 G,H).



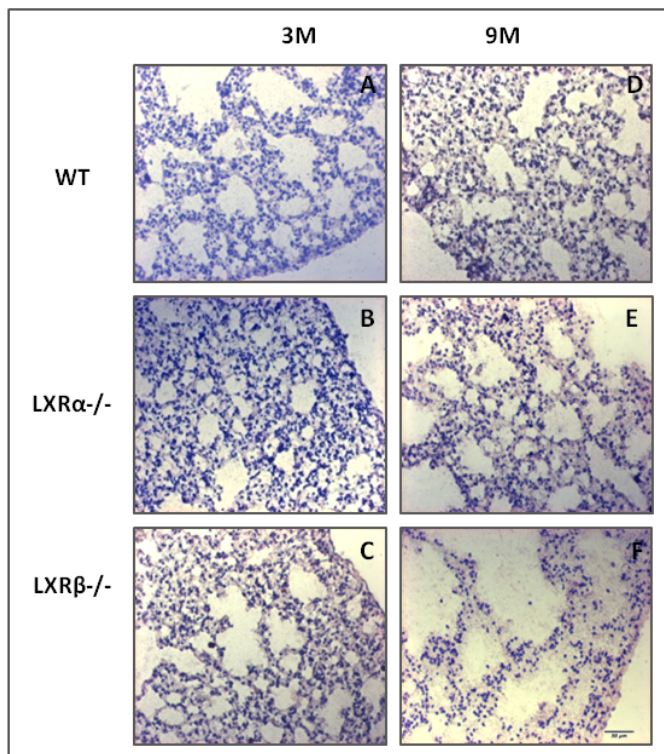
**Figura 13. Inflammation y lipidosis en pulmones  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ .** Imagen macroscópica de pulmones WT y  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (A, B). Tinción de H&E en pulmones WT y  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (C, D) y áreas Oil Red-O positivas (ORO, rojo) (E, F). Inmunodetección de linfocitos T (CD3) y B (B220) en cortes de pulmón WT y  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (G, H). Las flechas indican la presencia de infiltrados de células inflamatorias. Los resultados son representativos de muestras de 6 animales. La barra de escala de las imágenes C, E, D y F corresponde a 100 $\mu$ m y las imágenes G y H a 50  $\mu$ m.

La acumulación lipídica en el área subpleural es progresiva y se incrementa con la edad en los animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ , yendo acompañada del desarrollo de un proceso inflamatorio, también

crónico, caracterizado por la acumulación de células inmunocompetentes (Figura 14). Es importante destacar que este proceso inflamatorio sólo ocurre en el caso de animales que carecen de ambas isoformas de LXR,  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  y no en los  $LXR\alpha^{-/-}$  o  $LXR\beta^{-/-}$  (Figura 15). Por este motivo, de aquí en adelante, centraremos este estudio en el análisis del fenotipo que desarrolla el animal  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  con respecto a los animales salvajes WT.



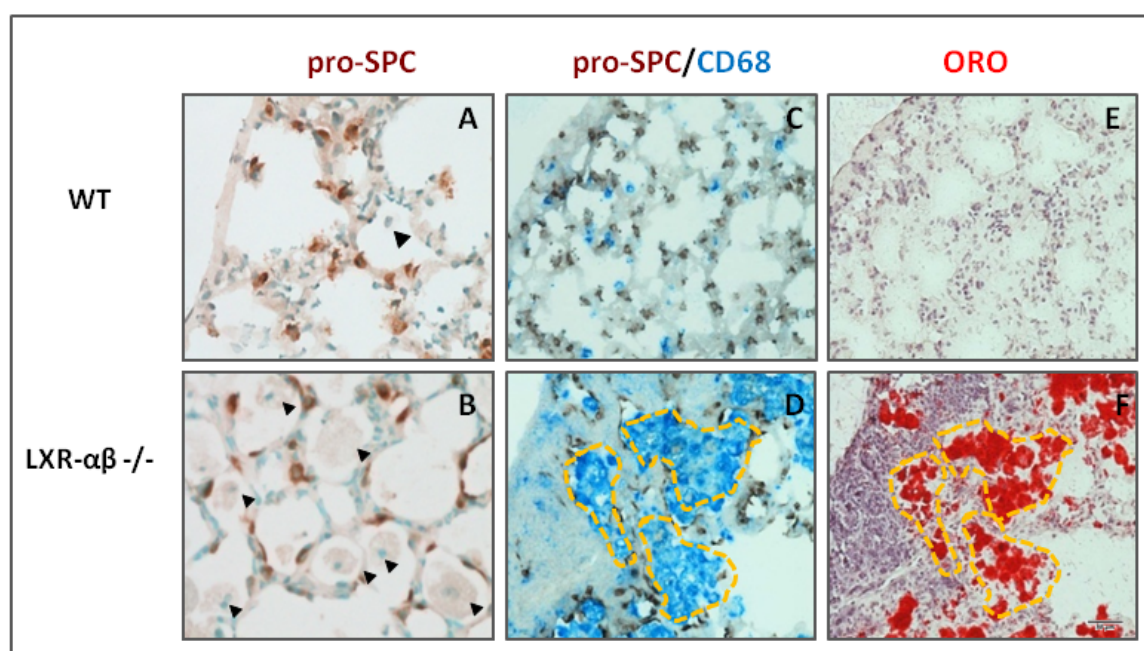
**Figura 14. Progresión de lipodosis e inflamación en pulmones  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ .** Detección de células ORO positivas en muestras de 3, 6, 9 y 12 meses (3M, 6M, 9M, 12M). Esta acumulación va acompañada de un incremento de infiltrados linfocíticos (flechas). Los resultados son representativos de muestras de 6 animales. La barra de escala de todas las imágenes corresponde a 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 15. Análisis histológico de pulmones  $LXR\alpha^{-/-}$  y  $LXR\beta^{-/-}$ .** Tinción de ORO en muestras de pulmones WT (A, D)  $LXR\alpha^{-/-}$  (B, E) y  $LXR\beta^{-/-}$  (C, F) obtenidas a los 3 y 9 meses de edad (3M y 9 M). Los resultados son representativos de muestras de 6 animales. La barra de escala de todas las imágenes corresponde con 20  $\mu\text{m}$ .



Con el objetivo de esclarecer la identidad de estas acumulaciones Oil-Red positivas se realizó, por un lado, la detección de los pneumocitos tipo II mediante detección inmunoenzimática de la proteína específica Pro-SPC (proprotein Surfactant protein-C) (Figura 16, A-B), comprobando que el número de pneumocitos no varía significativamente entre genotipos (WT y LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>). Por otro lado, se realizó una doble inmunodetección enzimática para localizar en los tejidos WT y LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>, pneumocitos tipo II y macrófagos alveolares, en este último caso con el marcador CD68 (Figura 16 C, D). De esta manera, se pudo constatar que los macrófagos coincidían con las áreas Oil Red-O positivas en LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> (Figura 16, F). Por tanto, estos resultados indican que se trata de macrófagos espumosos, a veces multinucleados, que acumulan lípidos y que se encuentran obstruyendo los espacios alveolares.

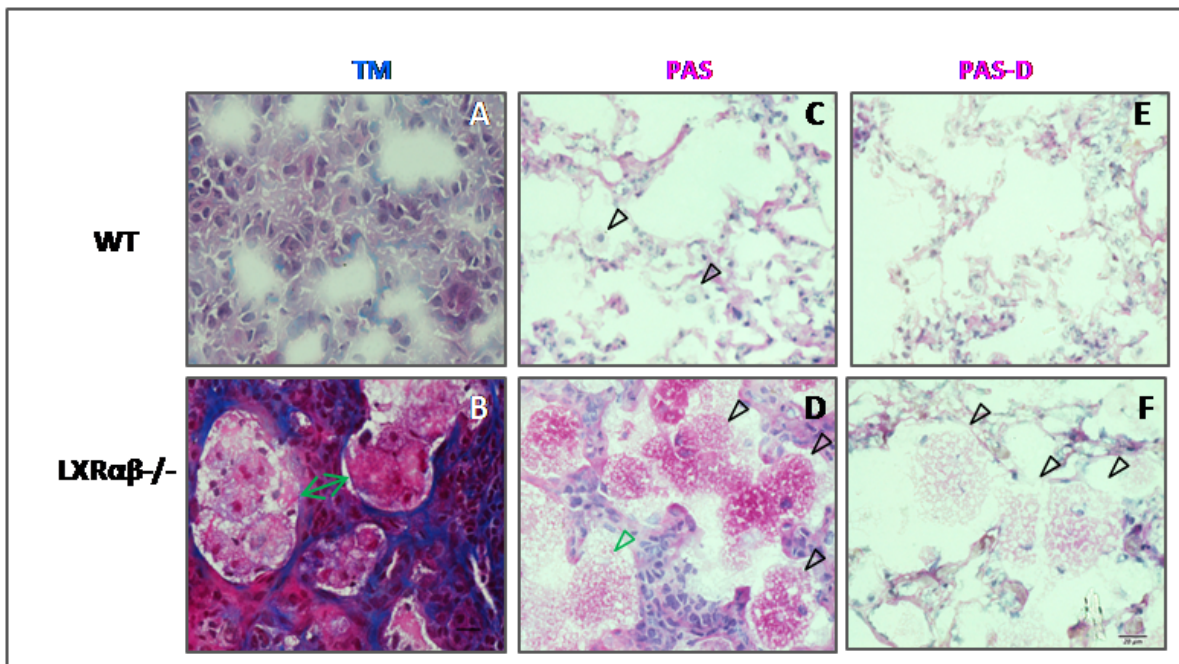


**Figura 16. Detección de macrófagos (CD68+) espumosos ORO+ en pulmones LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>.** Detección de pneumocitos tipo II en cortes de pulmón WT y LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> (A, B). Acumulación de lípidos neutros (ORO) en los macrófagos CD68+; cortes consecutivos C-E en muestras de pulmón WT y D-F de LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>. Puntas de flechas representan los macrófagos alveolares. Áreas delimitadas con línea intermitente amarilla indica la coincidencia de áreas en cortes consecutivos. Los resultados son representativos de muestras de 6 animales. La barra de escala de todas las imágenes corresponde a 50  $\mu$ m.

Por otro lado, se realizó, una tinción Tricrómica de Masson. Mediante esta técnica se pone de manifiesto la presencia de fibras de colágeno (azul) de un tejido. En el caso que nos ocupa encontramos que, en los animales WT, el sostén proporcionado por las fibras de colágeno se limita a bordear las vías respiratorias y, de manera más laxa, forma parte de los tabiques intraalveolares (Figura 17, A). Mientras que en el caso de los animales LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>, estas fibras

invaden, de forma patente, casi todo el parénquima pulmonar y forman gruesas fibras en los tabiques intraalveolares (Figura 17, B).

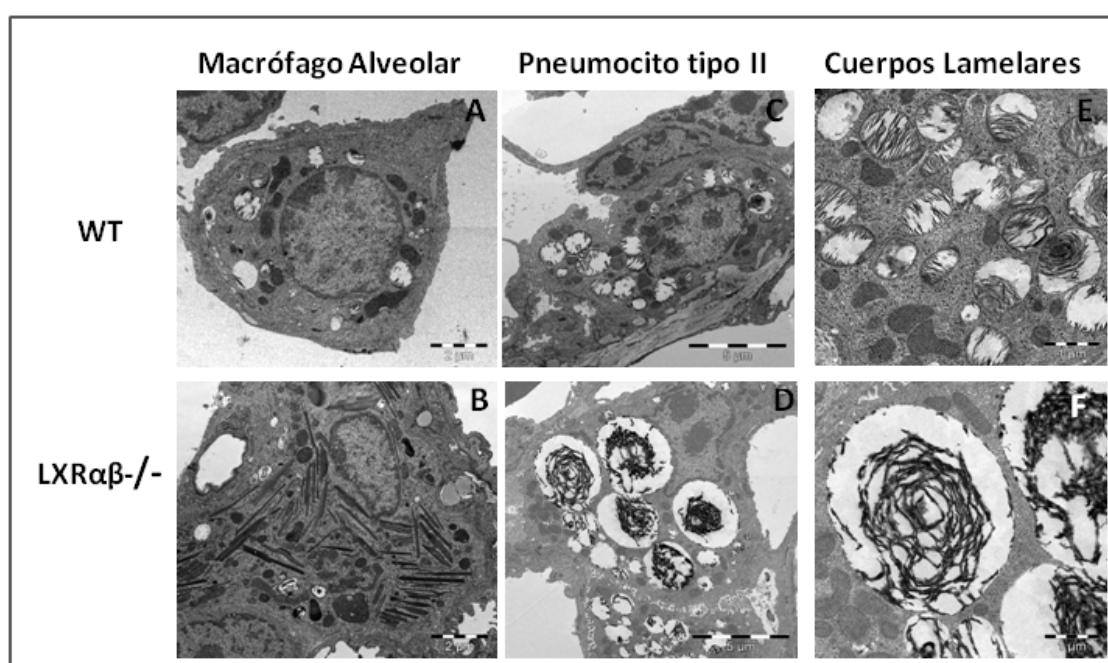
También, se realizó la tinción del Ácido Periódico de Schiff (*Periodic Acid Schiff*, PAS). Esta técnica se utiliza, para la detección de polisacáridos ligados a lípidos o proteínas en los tejidos. En el caso de la investigación de patologías pulmonares, la tinción se emplea en la determinación de patologías como la Proteinosis Alveolar Pulmonar, se caracteriza por una coloración rosácea al detectar el material surfactante en el interior de los alvéolos. En nuestro caso, detectamos un material PAS positivo que llena los alvéolos de los animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (Figura 17 D), punta de flecha verde), probablemente material surfactante acumulado. Además, este material se detecta también a nivel intracelular en los macrófagos de área subpleural (Figura 17 D, punta de flecha negra), coincidiendo con aquéllos que son Oil-Red positivos. El pretratamiento de las muestras con diastasa ( $\alpha$ -amilasa salival) PAS-D, confirma que, efectivamente, es un material PAS-positivo (Figura 17, F). En su conjunto, estos datos sugieren que el material surfactante se concentra intracelularmente los macrófagos alveolares. El exceso de este surfactante estaría siendo fagocitado por el macrófago con el objetivo de aliviar la congestión del espacio alveolar.



**Figura 17. Desarrollo de fibrosis y acumulación de material surfactante en pulmones  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ .** Tinción tricrómica de Masson (TM) revela fibras de colágeno en azul (A-B). Tinción de ácido periódico de Schiff (PAS) positivo (D) rellena los espacios alveolares (flecha verde) así como en el interior de los macrófagos alveolares (flechas negra) que desaparece al ser tratado previamente con diastasa (PAS-D) (F). Los resultados son representativos de muestras de 5 animales. La barra de escala de todas las imágenes corresponde a 20  $\mu$ m.



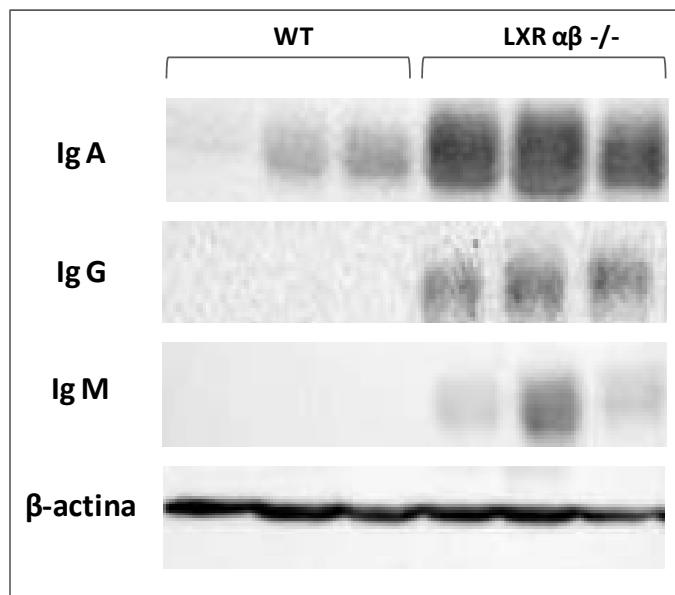
El siguiente paso en la caracterización del tejido pulmonar del fenotipo  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ , frente al animal control WT, consistió en la observación detallada de la estructura pulmonar mediante microscopía electrónica. Este análisis mostró varios aspectos interesantes y diferenciadores entre ambos fenotipos. Mediante esta técnica se pudo analizar la morfología y ultraestructura celular de los pneumocitos tipo II (encargados de la síntesis y reciclaje del surfactante) y de los macrófagos (que degradan este material surfactante cuando ya no es útil). En animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  se puso de manifiesto la presencia de pneumocitos tipo II hipertróficos, con cuerpos lamelares aberrantes (en detalle, figura 18, F), que han aumentado de tamaño y que son más electrodensos que en los animales WT (Figura 18 C, D). Los macrófagos alveolares, también hipertróficos, muestran inclusiones intracitoplasmáticas, en forma de agujas, que podrían ser “agujas de colesterol”. (Figura 18 A, B).



**Figura 18. Macrófagos alveolares y pneumocitos tipo II aberrantes en  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ .** Análisis de microscopía electrónica mostrando macrófagos alveolares WT y  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (A, B), así como cuerpos lamelares de los pneumocitos tipo II (C, D). Los resultados son representativos de muestras de 3-4 animales. En detalle estos cuerpos lamelares a 16.000 aumentos (E,F). Imágenes A, B, C y D 8.000 aumentos.

Este análisis histológico pone de manifiesto que la ausencia de ambas isoformas de LXR lleva a estos animales a desarrollar una enfermedad inflamatoria progresiva que se caracteriza por la acumulación de macrófagos espumosos en las áreas subpleurales, infiltrados de células inflamatorias y desarrollo de fibrosis, probablemente producida por la perpetuación en el tiempo del proceso inflamatorio. Además, la presencia de material PAS positivo, en el interior de los

alvéolos, podría deberse a un exceso de material surfactante, como ocurre en la enfermedad de Proteínosis Alveolar Pulmonar. El desarrollo del proceso inflamatorio se confirma con la consiguiente detección de niveles elevados de las inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM en el tejido pulmonar LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> (Figura 19). Esta detección se realizó en pulmones que habían sido perfundidos, por lo que la aportación de las inmunoglobulinas presentes en sangre es mínima. En este sentido, es posible que los numerosos infiltrados de linfocitos, presentes en el tejido pulmonar LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>, estén produciendo estas inmunoglobulinas contribuyendo al ambiente proinflamatorio.



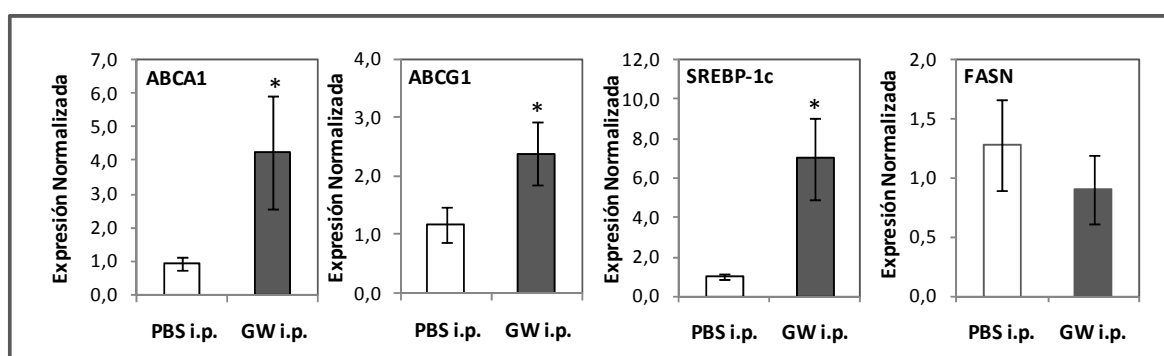
**Figura 19.** Análisis de expresión de IgA, IgG e IgM en muestras de pulmón. Control de carga  $\beta$ -actina. Cada carril es representativo de un conjunto de 5 animales.

## ii. Estudio de la actividad transcripcional de LXR en pulmón total

Los receptores nucleares LXR están involucrados en la regulación del metabolismo del colesterol (Zelcer and Tontonoz, 2006) y, además, son reguladores clave de la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria inmunitaria innata (Castrillo et al., 2003b; Joseph et al. 2003; Valledor et al., 2004) Sin embargo, el papel de la actividad de los receptores en la biología pulmonar se conoce menos. Por ello, uno de los principales objetivos de este trabajo fue estudiar la regulación transcripcional de los principales genes diana de LXR en el tejido pulmonar.

Para determinar la actividad de LXR en el pulmón, estudiamos los niveles de expresión de genes diana de LXR previamente establecidos. Para aumentar la actividad de los receptores LXR empleamos (mediante inyección intraperitoneal) el agonista de LXR, GW3965 (10 mg/Kg), durante 3 horas. Los genes analizados fueron ABCA1 (*ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member*

1), ABCG1 (*ATP-binding cassette, sub-family G, member 1*), SREBP/1c (*sterol regulatory element binding transcription factor 1*) y FASN (*fatty acid synthase*) que se encuentran regulados directamente por LXR (Tontonoz & Calking, 2012). ABCA1 y ABCG1, son importantes en el transporte reverso del colesterol, SREBP/1c está implicado en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, y por último, FASN está implicado en la síntesis de ácidos grasos. El análisis mediante qPCR mostró que estos genes diana de LXR aumentan su expresión, excepto FASN, tras la activación farmacológica de LXR con GW3965, lo que indica que los receptores LXR se encuentran transcripcionalmente activos en el tejido pulmonar (Figura 20).

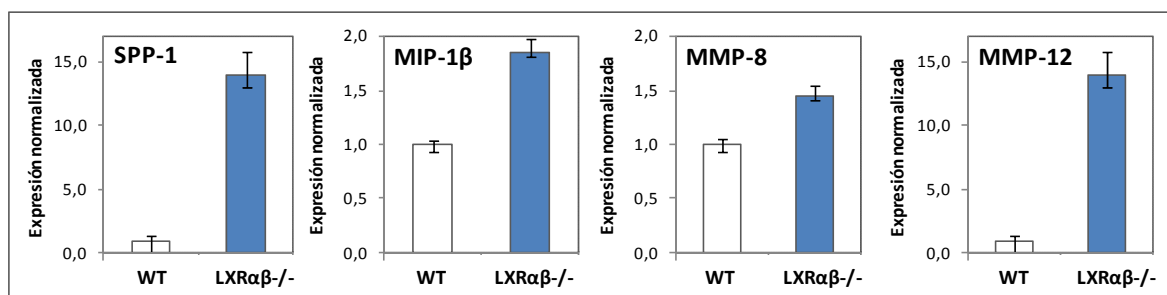


**Figura 20. Análisis de la expresión de genes diana de LXR en tejido pulmonar.** Mediante qPCR se analizó la expresión de ABCA1, ABCG1, SREBP-1c y FASN en tejido pulmonar tras la inyección intraperitoneal de PBS (vehículo control, barras abiertas) o GW3965 (barras coloreadas) en animales WT de 3 meses de edad. Expresión relativa a la expresión de Polimerasa-2 (POL-2). Las barras representan la media  $\pm$  la desviación estándar correspondientes a los valores de expresión de cada gen en 4 ratones individuales, donde \*:  $p < 0.05$ .

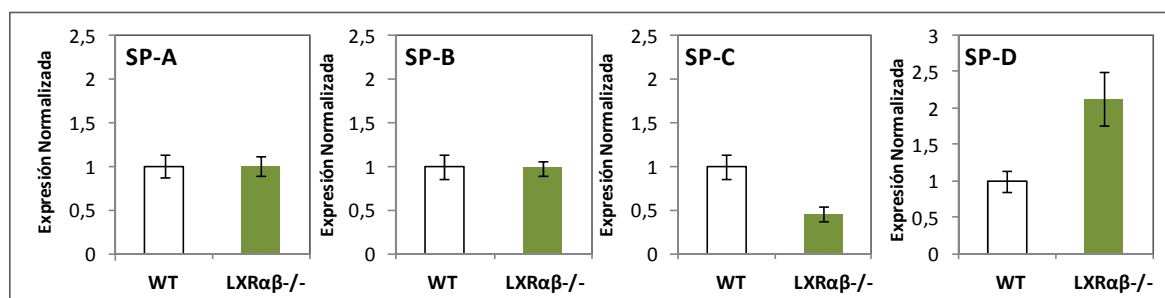
### iii. Expresión de genes relacionados con la inflamación y el metabolismo del líquido surfactante

Como parte de la caracterización del fenotipo desarrollado en los animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ , hemos analizado histológicamente el tejido pulmonar, así como la actividad de LXR, comprobando que, efectivamente, los genes diana de LXR se encuentran regulados en el pulmón. Se ha visto, por tanto, que la deficiencia de ambas isoformas de LXR desencadena un proceso inflamatorio dependiente de la edad. Para corroborarlo, se analizó la expresión de algunos genes cuya sobreexpresión está relacionada con el desarrollo de un proceso inflamatorio: SPP-1 (secreted phosphoprotein 1), MIP-1 $\beta$  (macrophage inflammatory protein- 1 $\beta$ ), MMP-8 y MMP-12 (matrix metalloproinase-8 y -12), en tejidos WT y  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (Figura 21). La expresión de SPP-1 se encuentra incrementada, en los pulmones  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ , unas 15 veces con respecto al WT. Esta proteína es secretada tras la estimulación por citoquinas pro-inflamatorias y tiene propiedades

quimiotácticas, promoviendo el reclutamiento a los lugares con inflamación, entre otras funciones (O'Regan et al., 2003). MIP-1 $\beta$ , potente quimiotáctico de células inmunitarias, también aumenta en el tejido LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>. En cuanto a las metaloproteínas analizadas, MMP-8 y MMP-12, claramente desreguladas en el tejido LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>, están presentes en los tejidos de manera habitual y están implicadas en la degradación de la matriz extracelular en procesos del desarrollo, crecimiento y reparación de heridas. Existen evidencias de que defectos en la regulación de estas metaloproteinasas, en el tejido pulmonar, tienen consecuencias patológicas para el tejido, siendo ejemplos de ello el asma, E.P.O.C. y el Síndrome de Distrés Respiratorio (Shapiro & Senior, 1999).



**Figura 21. Análisis de la expresión de genes relacionados con la inflamación en pulmón.** Mediante qPCR se analizó la expresión de las proteínas SPP-1 (secreted phosphoprotein 1), MIP-1 $\beta$  (macrophage inflammatory protein 1 $\beta$ ), MMP-8 y MMP-12 (matrix metalloproteinase-8 y -12) en tejido pulmonar de animales WT (barras abiertas) o LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> (barras coloreadas) en animales de 3 meses de edad. Expresión relativa a la expresión de polimerasa-2 (POL-2). Gráficas representativas de 3 ó 4 experimentos independientes donde los errores representan los valores individuales de los triplicados de una qPCR.



**Figura 22. Análisis de la expresión de genes implicados en el metabolismo surfactante en pulmón.** Mediante qPCR se analizó la expresión de las proteínas surfactantes SP-A, SP-B, SP-C y SP-D, en tejido pulmonar de animales WT (barras abiertas) o LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> (barras coloreadas) en animales de 3 meses de edad. Expresión relativa a la expresión de polimerasa-2 (POL-2). Gráficas representativas de 3 ó 4 experimentos independientes donde los errores representan los valores individuales de los triplicados de una qPCR.

El siguiente paso en esta caracterización consistió en comprobar los niveles de expresión de genes implicados en el control del metabolismo surfactante, y más concretamente, de aquellos que codifican proteínas cuya actividad es importante para la función de los pneumocitos tipo II. Se analizó la expresión de las proteínas surfactantes (*surfactant protein -A,-B,-C y -D*) en tejidos WT y LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> (Figura 22). El análisis de la expresión génica de SP-A y SP-B no reveló variaciones cuando se compararon ambos genotipos. Sin embargo, la expresión de SP-C disminuye, un 50% aproximadamente, en el genotipo LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> con respecto al WT, al contrario que la expresión de SP-D, que muestra un incremento en su expresión en LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>. Teniendo en cuenta la importancia de estas proteínas para la correcta homeostasis del líquido surfactante, la drástica reducción en la expresión de ARNm de SP-C, sintetizada en exclusiva por el pneumocito tipo II, indica que, probablemente, éste tipo celular está implicado en el desarrollo del fenotipo LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>.

## 1.2. Diferente composición celular del lavado broncoalveolar en animales LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>

### i. Recuento celular WT vs. DKO

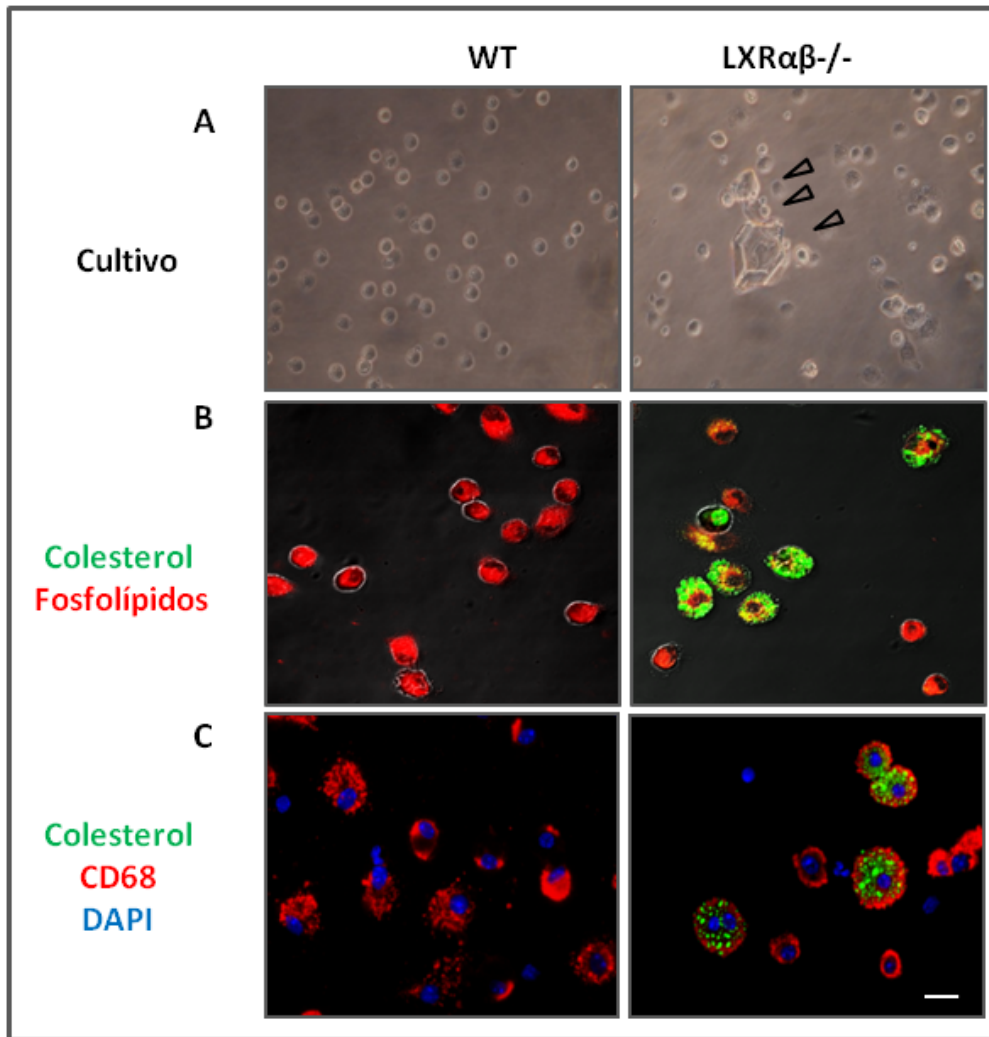
La siguiente aproximación que realizamos en relación al fenotipo de inflamación y lipidosis desarrollado en las áreas subpleurales de los pulmones LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>, consistió en el estudio de las poblaciones celulares obtenidas mediante lavado broncoalveolar, de animales WT y LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> de 3, 6 y 9 meses de edad. La tinción de May-Grünwald Giemsa fue la utilizada para la identificación cuantitativa y cualitativa de estos tipos celulares (Figura 23, B). Realizando los lavados broncoalveolares, como previamente se apuntó en el apartado 1.2.1 de Material y Métodos, se recuperan entre 15-20x10<sup>4</sup> células totales en los animales WT, de las que el 90% son macrófagos alveolares y el otro 10% está constituido principalmente por linfocitos (B y T), y en menor medida por neutrófilos y eosinófilos, (Figura 23, A, B). En el caso de ratones LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>, este recuento es claramente diferente. Se recuperan aproximadamente el doble de células (entre 25-40x10<sup>4</sup> células), de las que el 20% de los macrófagos se han convertido en células espumosas (llenas de vacuolas lipídicas, Oil Red-O positivas) (Figura 23, A y C) que van aumentando su tamaño y contenido lipídico con relación a la edad (3,6 y 9 meses) (Figura 23 C). Los linfocitos también aumentan, de un 5% en WT, a un 18% en LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>, y los neutrófilos, de un 0,2% en WT a un 2-3% en LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>. Este recuento evidencia, nuevamente, la progresión del proceso inflamatorio con un incremento de las células inmunocompetentes en el tejido pulmonar de ratones LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>, y una clara alteración del fenotipo de los macrófagos alveolares.

## ii. Presencia de macrófagos espumosos y cristales en el BAL de animales LXR $\alpha\beta$ -/-

Para un análisis más detallado, se realizaron cultivos *in vitro* de las poblaciones celulares obtenidas del BAL, concretamente de animales de 6 meses. En ellos (Figura 24, A), se distingue la presencia de cristales extracelulares hexagonales de gran tamaño. Estos cristales se asemejan a los observados en otros modelos animales que presentan defectos pulmonares como en ratones ABCG1 -/- (Baldán et al., 2006), de naturaleza lipoproteica.

También, se realizaron estudios de inmunocitoquímica (Figura 24, C) para la localización de macrófagos alveolares con el marcador CD68, a los que simultáneamente se trató con *Bodipy 493/503* que se une específicamente a lípidos neutros (fluorescencia verde). De esta manera, se confirma que son los macrófagos alveolares LXR $\alpha\beta$ -/- los responsables de acumular estos lípidos en su interior, y, que como constatamos posteriormente, en forma de depósitos de ésteres del colesterol. Además, teniendo en cuenta el papel crucial que tiene el macrófago alveolar en la homeostasis del material surfactante y dado que el 90% del material está constituido por fosfolípidos, realizamos una primera aproximación para analizarla carga lipídica intracelular del macrófago alveolar. Para ello utilizamos el kit comercial *HCSLipidTox<sup>TM</sup>* (Invitrogen), diseñado para la detección de fosfolipidosis y esteatosis *in vitro*, y comprobamos que aquellos macrófagos que se han convertido en células espumosas y acumulan lípidos neutros (esteatosis, fluorescencia verde) en forma de vacuolas en sus citoplasmas presentan un marcaje más débil para los fosfolípidos acumulados en su interior (fosfolipidosis, fluorescencia roja) (Figura 24, B)





**Figura 24. Análisis del BAL en animales de 6 meses.** El lavado de los animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  presenta cristales extracelulares (puntas de flecha) (A). Los macrófagos alveolares,  $CD68+$  (rojo) acumulan colesterol (verde, *Bodipy+*) en el caso de  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (C). Además el acúmulo de colesterol implica el desplazamiento del almacenamiento de fosfolípidos (rojo) (B). Los resultados son representativos de muestras de 5 animales. La barra de escala de todas las imágenes se corresponden a 20  $\mu m$ .

### 1.3. Caracterización del perfil lipídico pulmonar

#### i. En pulmón total

La acumulación lipídica, junto a la progresión de un proceso inflamatorio, caracterizan el fenotipo pulmonar de los animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ . Con el fin de esclarecer el perfil lipídico completo, se realizaron análisis mediante cromatografía en capa fina de alta eficiencia (HPTLC, high performance thin-layer chromatography). Para ello, muestras de pulmón total de animales WT y  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  se procesaron según protocolos establecidos de extracción de especies lipídicas y análisis mediante HPTLC.



---

Cuando se analizaron las clases lipídicas (Tabla 3) en muestras de pulmón total, se encontró un gran desequilibrio en el genotipo LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>. De entre los cambios más significativos observados en los pulmones LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>, respecto a los WT, destaca el gran aumento (6 veces) de los niveles de esteres del colesterol, no así de los de colesterol libre, que prácticamente se mantienen sin cambios. Al contrario, los triglicéridos experimentan una reducción importante (~40%), al igual que los niveles del fosfolípido esfingomiolina, que aparecen significativamente reducidos (~42%).

Con respecto al contenido de ácidos grasos, se observan elevaciones importantes y significativas de los ácidos grasos poliinsaturados, ácido araquidónico, AA (20:4n-6) y ácido docosahexaenoico DHA (22:6n-3) en LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>. También, aumenta el ácido linoléico (18:1n-9), lo que es compatible con el aumento de AA. Cabe destacar la elevación de los niveles totales de n-6 PUFA y n-3 PUFA (polyunsaturated fatty acid) además de la relación 18:1n-9/n3 HUFA (highly unsaturated fatty acid) y de los ratios de insaturación y peroxidabilidad, ambos elevados en LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> (Tabla 3).

### ii. En Fluido del Lavado Broncoalveolar (BALF)

Con el objetivo de identificar posibles diferencias, en cuanto al contenido lipídico, del material surfactante que forma parte de la interfase aire-líquido de los alvéolos, consideramos el estudio del sobrenadante (BALF), resultante de la centrifugación del BAL, el cual contendrá potencialmente restos del surfactante pulmonar. Para ello, se seleccionaron 8 animales de ambos genotipos, WT y LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>, realizándose el lavado broncoalveolar a cada individuo con 500  $\mu$ l de PBS-EDTA 0,1  $\mu$ M. Todos los lavados de los animales del mismo genotipo se unificaron y se centrifugaron y, finalmente, se recuperó el sobrenadante y se sometió al análisis mediante HPTLC.

Lo más destacable del análisis del BALF procedente de animales LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> (tabla 4) es, de nuevo, el aumento de los niveles de esteres del colesterol (50%) y del AA. Pero además, nos llama la atención los cambios en los niveles de dos especies lipídicas. Uno, es la caída, aunque ligera (6%), de los niveles del principal componente del material surfactante, la DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), en cada uno de sus respectivos componentes, la fosfatidilcolina y el ácido palmítico (16:0) y el segundo, la bajada espectacular (100%) del fosfatidilglicerol (PG). Ambas especies son de una gran importancia para las propiedades biofísicas del líquido surfactante.

Por otro lado, disminuyen los niveles de ácido araquidónico (20:4n-6) y el de sus precursores de 20 y 18 átomos de carbono, aproximadamente el 20%. Estos resultados manifiestan una clara desregulación en el metabolismo del material surfactante por parte del pneumocito tipo II, encargado de su síntesis y reciclaje.

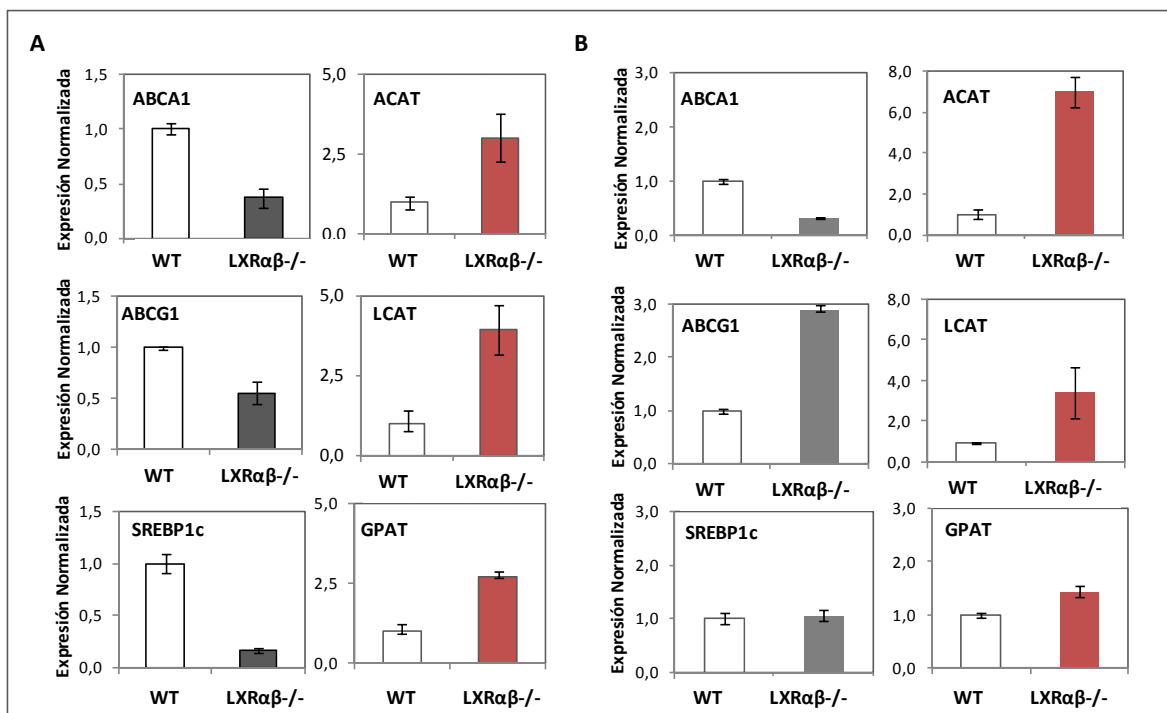
### iii. Expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico

El perfil lipídico que se observa en los pulmones de los animales LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> se encuentra alterado con respecto a los WT. Teniendo en cuenta el papel central que tienen los receptores LXR en el mantenimiento de la homeostasis lipídica, como sensores del colesterol, se analizó la expresión de aquellos genes diana de LXR, cuya desregulación podría estar implicada en el desarrollo del fenotipo LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>. De este modo, se comprobó, mediante qPCR que la expresión del ARNm de ABCA1, ABCG1 y SREBP-1c se encuentra muy disminuida en muestras de pulmón total de

animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (Figura 25, A). La expresión de ABCA1 disminuye también de forma significativa en macrófagos (población mayoritaria) del lavado broncoalveolar (Figura 25, B). Los transportadores de membrana ABCA1 y ABCG1, desempeñan una función importante favoreciendo el transporte reverso del colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado. Por tanto, una posible consecuencia en la disminución de la expresión de estos genes en el pulmón  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  podría ser la acumulación de colesterol en el interior celular, que puede llegar a ser tóxica en altas concentraciones. Uno de los mecanismos para evitar esta toxicidad es la esterificación del colesterol mediante las enzimas ACAT1 (acetyl-CoAacetyltransferase) y LCAT (lecithin cholesterol acyltransferase), cuyos niveles de ARNm se encuentran elevados en los pulmones  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (Figura 25, A).

El ácido fosfatídico, de cuya síntesis es responsable la enzima GPAT (glycerol-3-phosphoacyltransferase) es el precursor de todos los fosfoglicéridos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol) y de los triglicéridos. Cuando analizamos la expresión de GPAT, enzima que se encuentra regulada por el factor de transcripción SREBP, encontramos que sus niveles aumentan ligeramente, tanto en pulmón total, como en las células del lavado broncoalveolar  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (Figura 25, A, B).

En definitiva, el conjunto de estos resultados, sumados a los obtenidos en el análisis de especies lipídicas anterior, revelan que los ratones  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  presentan un perfil lipídico aberrante que obedece a severas alteraciones en el metabolismo y homeostasis lipídica.



**Figura 25. Análisis de expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico.** Expresión ARN total de genes en muestras obtenidas de pulmón total (A) y de células del BAL (B), de animales WT (barras abiertas) y  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (barras coloreadas). Los niveles de expresión están normalizados con el gen Pol-2 (Polimerasa-2). Gráficas representativas de 3 ó 4 experimentos independientes donde los errores representan los valores individuales de los triplicados de una qPCR.

**TABLA 3: Composición de las clases lipídicas y ácidos grasos de pulmón total en animales WT y LXRαβ -/-.**

	Pulmón WT		Pulmón LXRαβ -/-
<b>Clases lipídicas</b>			
	Mean ±SEM		Mean ±SEM
LPC	0 ±0		0 ±0
Esteres de colesterol	4,46 ±0,62	***	25,79 ±1,75
Triglicéridos	32,41 ±3,00	**	20,37 ±2,51
Esfingomielina	2,43 ±0,33	**	1,41 ±0,23
Fosfatidiletanolamina	14,88 ±0,66	**	12,57 ±0,42
Colesterol	22,4 ±1,01	*	19,6 ±0,76
Fosfatidilcolina	12,06 ±0,73		10,65 ±0,65
Fosfatidilserina	5,28 ±0,27	*	4,4 ±0,31
Fosfatidilinositol	2,99 ±0,3	*	2,34 ±0,16
Fosfatidilglicerol	1,92 ±0,24		1,54 ±0,04
Fosfolípidos/Colesterol	1,66 ±0,06		1,61 ±0,06
LNT (Lípido neutro total)	60,44 ±1,87	**	67,09 ±1,55
LPT (Lípido polar total)	39,56 ±1,87	**	32,91 ±1,55
SUMA	100,00 ±0,00		100,00 ±0,00
<b>Ácidos Grasos</b>			
14:0	2,29 ±0,03	**	2,16 ±0,04
14:1	0,53 ±0,05	*	0,66 ±0,04
15:0	0,17 ±0,03	*	0,24 ±0,02
17:0	0,15 ±0,02	*	0,21 ±0,02
17:1	0,14 ±0,01	***	0,18 ±0,01
18:0	7,51 ±0,42		7,84 ±0,44
18:1 n-9	22,76 ±3,51		16,2 ±1,66
18:2 n-6	8,74 ±0,37		10,07 ±0,91
18:3 n-3	0,21 ±0,02		0,19 ±0,06
20:1	0,72 ±0,09	**	0,99 ±0,06
20:2 n-6	0,26 ±0,03	***	0,59 ±0,03
20:4 n-6	5,41 ±0,91	*	7,77 ±0,59
20:5 n-3	0	**	0,11 ±0,04
22:1	0,19 ±0,01	***	0,24 ±0,01
22:6 n-3	1,64 ±0,2	***	3,06 ±0,28
n-9	23,14 ±3,45		16,81 ±1,62
n-3	2,32 ±0,27	***	4 ±0,36
n-6	16,95 ±1,67	*	21,64 ±0,54
n-3 HUFA	2,1 ±0,29	***	3,81 ±0,37
n-3/n-6	0,14 ±0	**	0,19 ±0,02
18:1n-9/n-3 H	12,75 ±3,52	*	4,43 ±0,57
Hexaenoicos	1,64 ±0,2	***	3,06 ±0,28
Índice Peroxidabilidad	50,28 ±6,51	**	73,84 ±2,71
Índice Insaturación	98,23 ±3,96	***	118,5 ±1,37
Saturados/Insaturados	0,81 ±0,06		0,76 ±0,06
Saturados/n-3	19,86 ±1,63	***	11,13 ±1,15
Saturados/n-9	2,14 ±0,4		2,71 ±0,35

Tabla 3. Desequilibrio en la presencia de especies lipídicas en pulmones WT y LXRαβ -/-. Los resultados se expresan como media ± error estándar de tres experimentos independientes. Los contenidos de las especies lipídicas se expresan como mol% del lípido total.

**TABLA 4. Composición de las clases lipídicas y ácidos grasos de del Fluido Broncoalveolar (BALF) en animales WT y LXRαβ -/-.**

	BALF WT	BALF LXRαβ -/-	% Cambio
<b>Clases lipídicas</b>			
	<b>Valor</b>	<b>Valor</b>	
LPC	0	0	
Esteres de colesterol	7,83	11,78	50,48
Triglicéridos	3,6	3,57	-0,81
Esfingomielina	0,65	0,75	16,11
Fosfatidiletanolamina	27,57	27,12	-1,64
Colesterol	22,95	22,82	-0,56
Fosfatidilcolina	26,91	24,56	-8,76
Fosfatidilserina	1,29	1,23	-4,69
Fosfatidilinositol	5,55	5,81	4,67
Fosfatidilglicerol	0,88	0	-100
FFA	2,76	2,35	-14,76
Fosfolipidos/Colesterol	2,71	2,57	-5,08
LNT (Lípido neutro total)	37,15	40,54	-5,08
LPT (Lípido polar total)	62,85	59,46	-5,39
<b>SUMA</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>0,00</b>
<b>Ácidos Grasos</b>			
14:0	1,5	2	33,47
16:0	66,24	62,4	-5,8
16:0 DMA	0,17	0,43	153,19
16:1 n-7	6,61	9,02	36,5
18: 2n-6	4,96	5,56	12,01
18:3 n-6	0,11	0,09	-18,1
20: 3 n-6	0,19	0,14	-26,24
20: 4 n-6	3,22	2,46	-23,53
20: 5 n-3	0,08	0,07	-12,41
22: 4 n-6	0,14	0,13	-7,05
22: 5 n-6	0,22	0,12	-45,4
22: 6 n-3	1,36	1,28	-5,79
<b>Saturados</b>	<b>71,25</b>	<b>68,61</b>	<b>-3,71</b>
<b>Insaturados</b>	<b>28,74</b>	<b>30,56</b>	<b>6,34</b>
n-9	6,37	5,81	-8,71
n-3	1,71	1,59	-6,92
n-6	8,85	8,51	-3,86
n-3 HUFA	1,62	1,49	-7,93
n-3/n-6	0,19	0,19	-3,18
18:1n-9/n-3 H	3,93	3,86	-1,7
<b>Indice Peroxidabilidad</b>	<b>30,06</b>	<b>26,76</b>	<b>-10,98</b>
<b>Indice Insaturación</b>	<b>53,3</b>	<b>52,3</b>	<b>-1,87</b>
<b>Saturados/Insaturados</b>	<b>2,48</b>	<b>2,25</b>	<b>-9,45</b>
<b>Saturados/n-3</b>	<b>41,63</b>	<b>43,07</b>	<b>3,45</b>
<b>Saturados/n-9</b>	<b>11,19</b>	<b>11,81</b>	<b>5,48</b>

**Tabla 4. Desequilibrio en la presencia de especies lipídicas en el Fluido BAL WT y LXRαβ-/-.** La tabla indica los valores obtenidos de 1 experimento con muestras de BAL WT y LXRαβ -/- tras reunificación de 9 muestras individuales de cada genotipo. Los contenidos de las especies lipídicas se expresan como mol% del lípido total.

---

## 2. TRASPLANTES DE MÉDULA ÓSEA EN RATONES WT Y LXR $\alpha\beta$ -/-

### 2.1. Reconstitución de los macrófagos alveolares en trasplantes de médula ósea en animales WT y LXR $\alpha\beta$ -/-

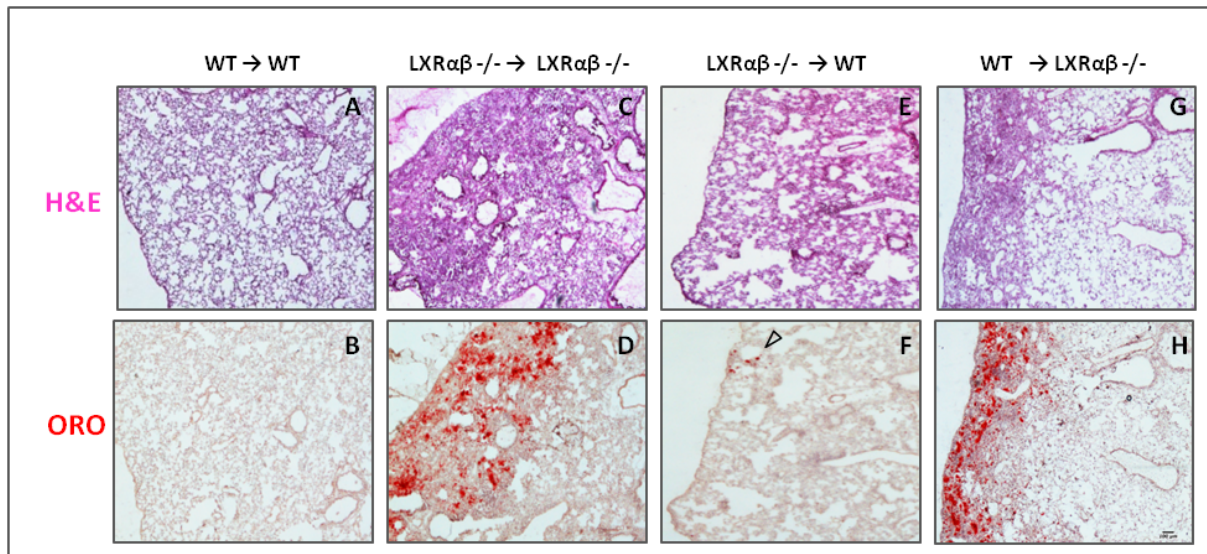
La transferencia de células mieloides, utilizando trasplantes de médula ósea, se ha convertido en un método ampliamente aceptado en investigación científica. Mediante este mecanismo es posible estudiar la contribución de las células provenientes de la médula ósea en la patogénesis de numerosas enfermedades desarrolladas experimentalmente. En el caso de este trabajo, el trasplante de médula ósea tuvo como objetivo la repoblación de células de origen mieloides en los pulmones, concretamente en el recambio de los macrófagos alveolares.

Los resultados expuestos hasta ahora ponen de manifiesto la acumulación de macrófagos alveolares espumosos, que presentan alteraciones en la expresión de genes del metabolismo lipídico en los pulmones LXR $\alpha\beta$ -/-. Por otro lado, muestran que los pneumocitos tipo II presentan un fenotipo alterado, con cuerpos lamelares aberrantes en su citoplasma y desregulación en varios genes implicados en el metabolismo del surfactante pulmonar y en el proceso inflamatorio.

Para evaluar la contribución de los macrófagos alveolares al desarrollo del fenotipo LXR $\alpha\beta$ -/- se realizaron trasplantes de médula ósea en los que la médula ósea de animales WT fue transferida a animales LXR $\alpha\beta$ -/- a las 8-10 semanas de edad y viceversa. Mediante este planteamiento y permitiendo la completa reconstitución tras el trasplante, células progenitoras, provenientes de los donantes WT, repoblaron los pulmones de los animales LXR $\alpha\beta$ -/- y, en el trasplante inverso, progenitores LXR $\alpha\beta$ -/- repoblaron los pulmones de animales WT. Finalmente, los animales trasplantados se sacrificaron a las 24 semanas de edad, cuando se considera que ha ocurrido una adecuada reconstitución por parte de la médula ósea donante (Matute-Bello et al., 2004). Como control se utilizaron tejidos trasplantados con su propia médula ósea, es decir, WT  $\rightarrow$  WT y LXR $\alpha\beta$ -/-  $\rightarrow$  LXR $\alpha\beta$ -/-.

Cuando los pulmones de uno y otro genotipo se analizaron mediante técnicas histológicas en cortes consecutivos usando hematoxilina-eosina y Oil-Red-O (Figura 26) se observó que los animales LXR $\alpha\beta$ -/- trasplantados con médula WT (Figura 26, G, H) presentan el área subpleural con infiltrados y Oil-Red positiva, de manera similar al trasplante control de LXR $\alpha\beta$ -/- en LXR $\alpha\beta$ -/- (Figura 26, C, D). En el caso del animal WT trasplantado con médula LXR $\alpha\beta$ -/- (Figura 26, E, F) no se observan grandes cambios, si bien, se encuentran con frecuencia, pequeñas zonas donde se desarrollan macrófagos Oil-Red positivos (Figura 26, F, punta de flecha). Estos datos iniciales, en el que el fenotipo pulmonar del animal receptor prevalece tras el trasplante de médula ósea, nos

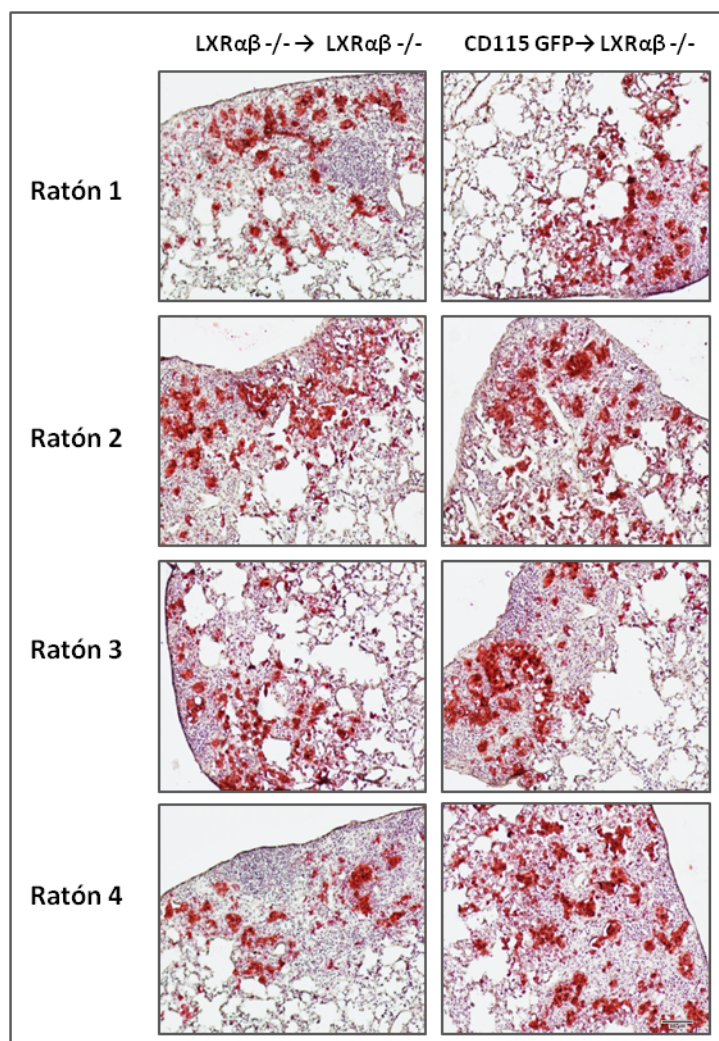
lleva a cuestionar la contribución del macrófago alveolar al desarrollo del fenotipo  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ , aunque también nos hace dudar si el resultado podría ser causa de la baja eficacia del trasplante.



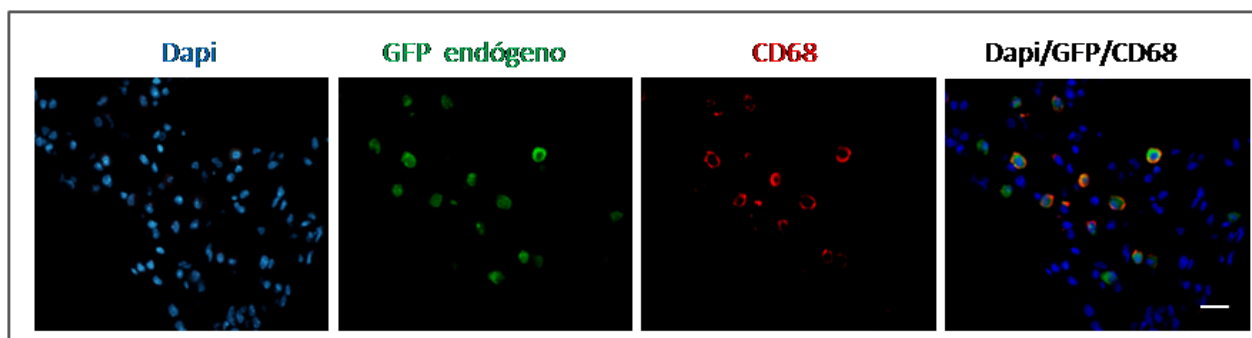
**Figura 26. Trasplantes de médula ósea en animales WT y  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ .** Análisis de H&E y Oil-red O en cortes consecutivos de pulmones autotrasplantados WT (A, B) y  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (C, D), WT trasplantados con médula de  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  ( $LXR\alpha\beta^{-/-}$  → WT, E, F) y  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  trasplantados con médula ósea WT (WT →  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ , G, H); Todas las imágenes pertenecen a animales de 24 semanas de edad son representativas de grupos de estudio n=8. La barra de escala de las imágenes corresponde a 100  $\mu$ m.

Paralelamente, se planteó la realización de un nuevo trasplante, tomando como receptores los animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  y como médula donante la de animales CD115 Mac Green GFP\*. De esta manera, se puede comprobar la efectividad del trasplante, ya que los progenitores mieloides que repueblen los pulmones serán fácilmente identificables por la expresión de GFP (green fluorescent protein). El resultado se muestra en la figura 27, y, al igual que en el caso anterior, en el que el animal receptor es  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ , en el tejido se observan acumulaciones lipídicas, Oil-Red positivas en el área subpleural. Un análisis más detallado constata que los macrófagos alveolares  $CD68^+$  colocalizan con la fluorescencia GFP, verificando de esta manera la efectividad del trasplante (Figura 28). No obstante, y aunque en la zona subpleural se detectan macrófagos  $GFP^+$  de los donantes, las zonas afectadas presentan una alta autofluorescencia debida a los lípidos, por lo que el grado de reconstitución puede ser cuestionable.

Este último resultado nos lleva a plantear dos incógnitas; la primera, cuestionar la efectividad del trasplante, en estas áreas subpleurales, por parte de los progenitores repobladores; y segunda, una posible implicación de los pneumocitos tipo II en el desarrollo del fenotipo, observado en el microambiente pulmonar de los animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ .



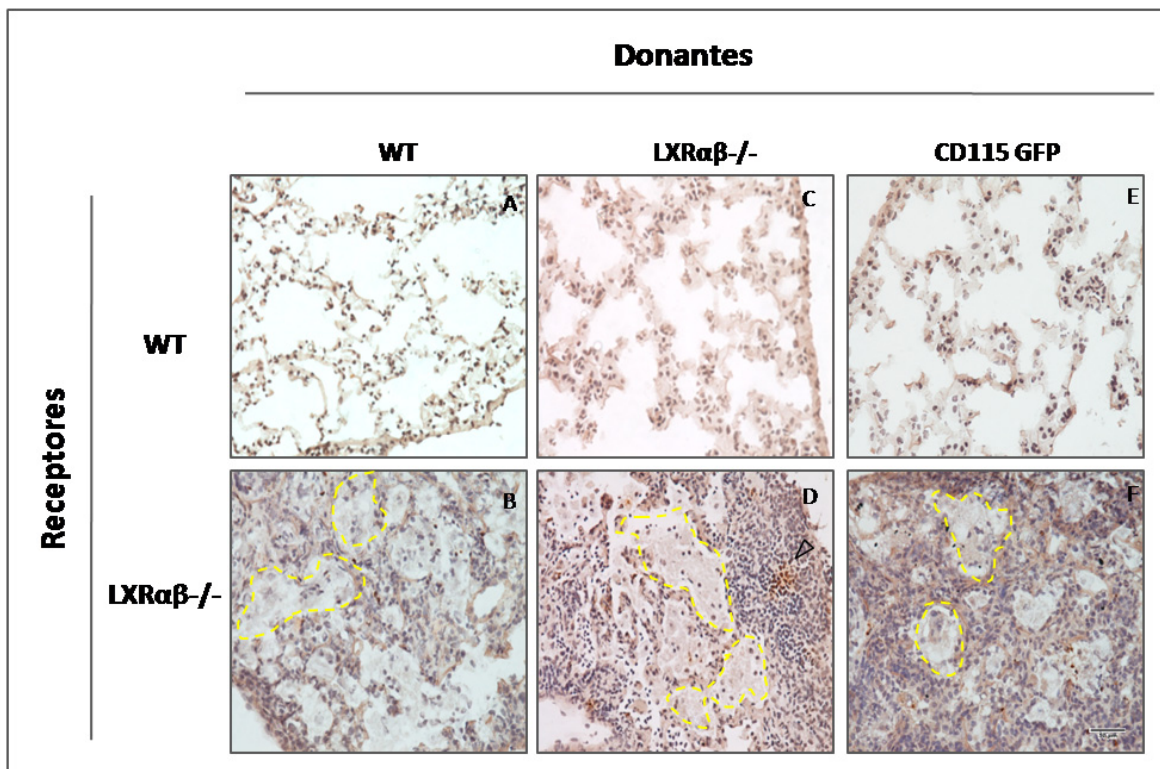
**Figura 27.** Trasplantes de médula ósea  $LXR\alpha\beta^{-/-} \rightarrow LXR\alpha\beta^{-/-}$  y  $CD115\ GFP \rightarrow LXR\alpha\beta^{-/-}$ : Comparativa de áreas supleulares Oil Red-O positivas en un experimento  $n=4$ , representativo de 5 experimentos independientes. La barra de escala de las imágenes corresponde a  $50\ \mu\text{m}$ .



**Figura 28.** Análisis de expresión de GFP y CD68 en muestras de trasplantes de médula ósea  $CD115\ GFP \rightarrow LXR\alpha\beta^{-/-}$ . Progenitores de médula ósea  $GFP^+$  positivos se diferencian a macrófagos alveolares  $CD68^+$ . Además se observan algunas células  $GFP^+/CD68^-$  posiblemente neutrófilos. Todas las imágenes pertenecen a animales de 24 semanas de edad son representativas de grupos de estudio  $n=8$ , de 5 experimentos independientes. La barra de escala de todas las imágenes corresponde a  $20\ \mu\text{m}$ .



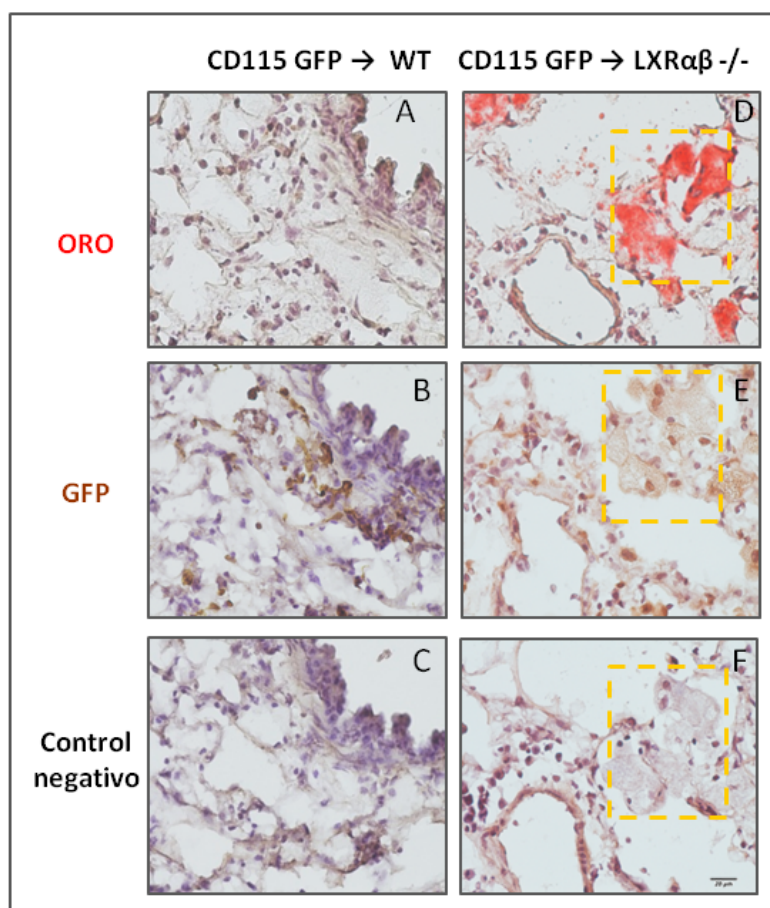
Para examinar si tal vez un exceso de muerte celular por apoptosis (constituyendo por tanto una zona muerta, inaccesible a la llegada de nuevas células) fuese la causa de una incompleta reconstitución de los macrófagos en las zonas subpleurales se realizó la técnica de TUNEL (*Terminal dUTP Nick-EndLabeling*). En las imágenes mostradas en la figura 29 se comprueba que las áreas subpleurales de los tejidos trasplantados ( $LXR\alpha\beta^{-/-} \rightarrow LXR\alpha\beta^{-/-}$ ,  $WT \rightarrow LXR\alpha\beta^{-/-}$  y  $CD115 GFP \rightarrow LXR\alpha\beta^{-/-}$ ) que mantienen áreas de macrófagos espumosos Oil-Red positivos no presentan células TUNEL positivas (áreas delimitadas con línea intermitente amarilla en la figura 29, imágenes B, D y E). Confirmamos la efectividad de la técnica en la imagen de la figura 29 B, en la que se observan algunas células positivas fuera de las áreas de macrófagos espumosos (punta de flecha). Con las limitaciones de esta aproximación, estos resultados indican que los macrófagos espumosos del área subpleural no son apoptóticos.



**Figura 29. Detección de células apoptóticas en trasplantes de médula ósea en animales WT y  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ .** Las células apoptóticas se detectaron mediante la técnica de TUNEL en pulmones autotrasplantados WT (A), autotrasplantados  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (D),  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  trasplantados con médula ósea WT ( $WT \rightarrow LXR\alpha\beta^{-/-}$ , B), WT trasplantados con médula de  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  ( $LXR\alpha\beta^{-/-} \rightarrow WT$ , C) y animales WT y  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  trasplantados con médula ósea procedente de animales CD115-GFP (E y F). Todas las imágenes pertenecen a animales de 24 semanas de edad y son representativas de grupos de estudio  $n=6-8$ , de 4 experimentos independientes. La barra de escala de todas las imágenes corresponde a 50  $\mu m$ . Punta de flecha muestra marcaje positivo de células apoptóticas. Las líneas intermitentes amarillas muestran áreas de macrófagos espumosos no apoptóticos en las zonas subpleurales.



Finalmente, para confirmar el éxito del trasplante, incluso en las áreas subpleurales, localizamos las células GFP<sup>+</sup>, en el trasplante CD115 GFP\*→LXRαβ<sup>-/-</sup>, mediante inmunohistoquímica (Figura 30). Comprobamos que efectivamente las células de estas zonas, son GFP<sup>+</sup>, poniendo de manifiesto que la transferencia de células mieloides ha sido exitosa, en el conjunto del tejido pulmonar. Este resultado pone de manifiesto que el ambiente presente en el entorno alveolar es suficiente para inducir lipidosis en las nuevas células repobladoras, y que, por tanto, los macrófagos alveolares LXR-WT no son capaces, por si solos, de rescatar el fenotipo lipídico en los animales LXRαβ<sup>-/-</sup>. Estos datos nos conducen a plantear la segunda de las incógnitas anteriormente sugeridas, que los pneumocitos tipo II tienen un papel preponderante en el desarrollo del fenotipo lipídico en los animales LXRαβ<sup>-/-</sup>.



**Figura 30. Progenitores mieloides GFP<sup>+</sup> trasplantados se convierten en células espumosas en animales receptores LXRαβ<sup>-/-</sup>.** Análisis de ORO y expresión de GFP en cortes consecutivos de pulmones trasplantados CD115 GFP → WT (A,B y C) y CD115 GFP → LXRαβ<sup>-/-</sup> (D,E y F) comprobando que los macrófagos GFP positivos acumulan lípidos (Oil Red-O +) en animales receptores LXRαβ<sup>-/-</sup>. Áreas delimitadas con línea intermitente amarilla indica la coincidencia de áreas en cortes consecutivos. Todas las imágenes pertenecen a animales de 24 semanas de edad son representativas de grupos de estudio n= 8, de 5 experimentos independientes. La barra de escala de todas las imágenes corresponde a 20 μm.

### **3. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LXR EN CULTIVOS DE PNEUMOCITOS.**

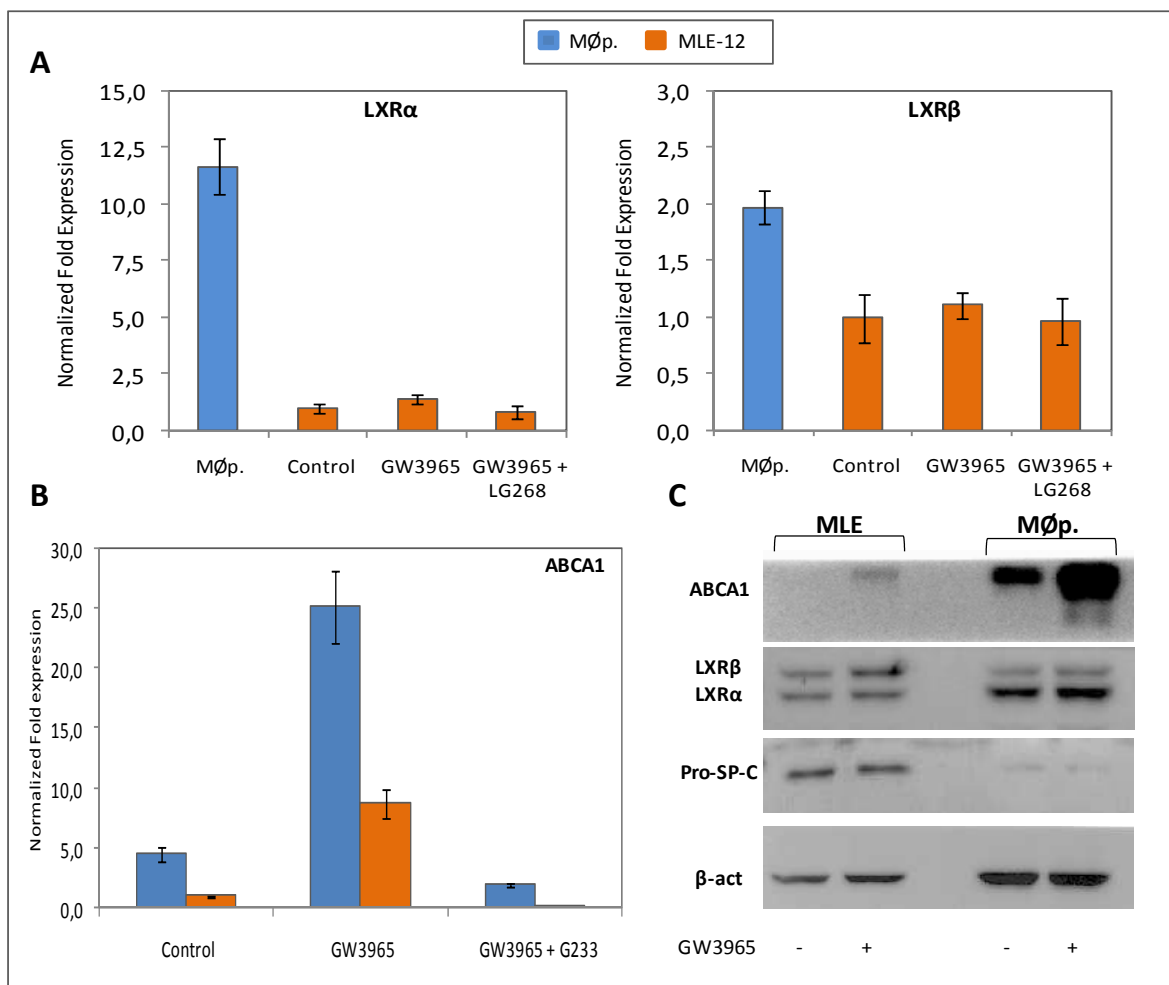
#### **3.1. ACTIVIDAD LXR EN PNEUMOCITOS TIPO II, MLE-12.**

Como se ha descrito en la introducción de este trabajo, los pneumocitos tipo II constituyen, junto a los macrófagos alveolares, el eje central en la homeostasis del material surfactante. Los pneumocitos tipo II sintetizan y reciclan el material surfactante, por lo que su correcto funcionamiento es esencial para su homeostasis. Los resultados de este trabajo (apartado 1.3) pusieron de manifiesto una deficiente expresión de la proteína surfactante SP-C, importante en el procesamiento del surfactante pulmonar, además de un incremento en la expresión de SP-D en los animales LXR $\alpha\beta$ -/-.

El siguiente paso en el estudio del fenotipo LXR $\alpha\beta$ -/- consistió en analizar la actividad de los receptores LXR en un modelo "in vitro" de pneumocitos tipo II, empleando la línea celular MLE-12 (CRL-2110™), con la finalidad de esclarecer si la actividad de LXR podría intervenir en el procesado del surfactante pulmonar por parte del pneumocito tipo II.

##### **3.1.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LXR EN CÉLULAS MLE-12**

Si bien la expresión de LXR en pneumocitos tipo II en ratones se ha comprobado *in vivo* (Smoak et al., 2008). No existen datos acerca de su expresión en la línea celular MLE-12. Por este motivo, la primera aproximación en el estudio de los receptores LXR en las células MLE-12 fue la detección, mediante análisis de la expresión del ARNm (qPCR), de las isoformas LXR $\alpha$  y LXR $\beta$ . Tomando como referencia la expresión de los receptores LXR en macrófagos peritoneales se analizaron los niveles de expresión en MLE-12. Además se trataron las células con agonistas de LXR y RXR, (GW3965 1 $\mu$ M y LG268 100  $\mu$ M respectivamente) para estudiar la actividad de estos receptores. Como se aprecia en la figura 31, las células MLE-12 expresan LXR $\alpha$  y LXR $\beta$  y los niveles de ARNm no varían en presencia de agonistas de LXR/RXR. Sin embargo, macrófagos peritoneales y células MLE-12 presentan diferentes niveles de expresión de las isoformas de LXR. Los macrófagos peritoneales expresan mayores niveles de la isoforma LXR $\alpha$  frente a la isoforma LXR $\beta$ . En las células MLE-12 ocurre al contrario, la isoforma LXR $\beta$  es la predominante (Figura 31, A).



**Figura 31. Estudio comparado de la expresión de LXR $\alpha$  y LXR $\beta$  y su actividad transcripcional en macrófagos peritoneales y MLE-12.** Análisis de la expresión de LXR $\alpha$  y LXR $\beta$  mediante qPCR en macrófagos peritoneales (M $\phi$ p) y células MLE-12 (A). Expresión de mRNA de ABCA1 tras el tratamiento con GW3965  $\pm$  G233 en M $\phi$ p y MLE-12 (B). Estudio de la expresión de las proteínas ABCA1, LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , pro-SP-C y  $\beta$ -actina ( $\beta$ -act) mediante Western Blot. Graficas representativas de 3 ó 4 experimentos independientes donde los errores representan los valores individuales de los triplicados de una qPCR.

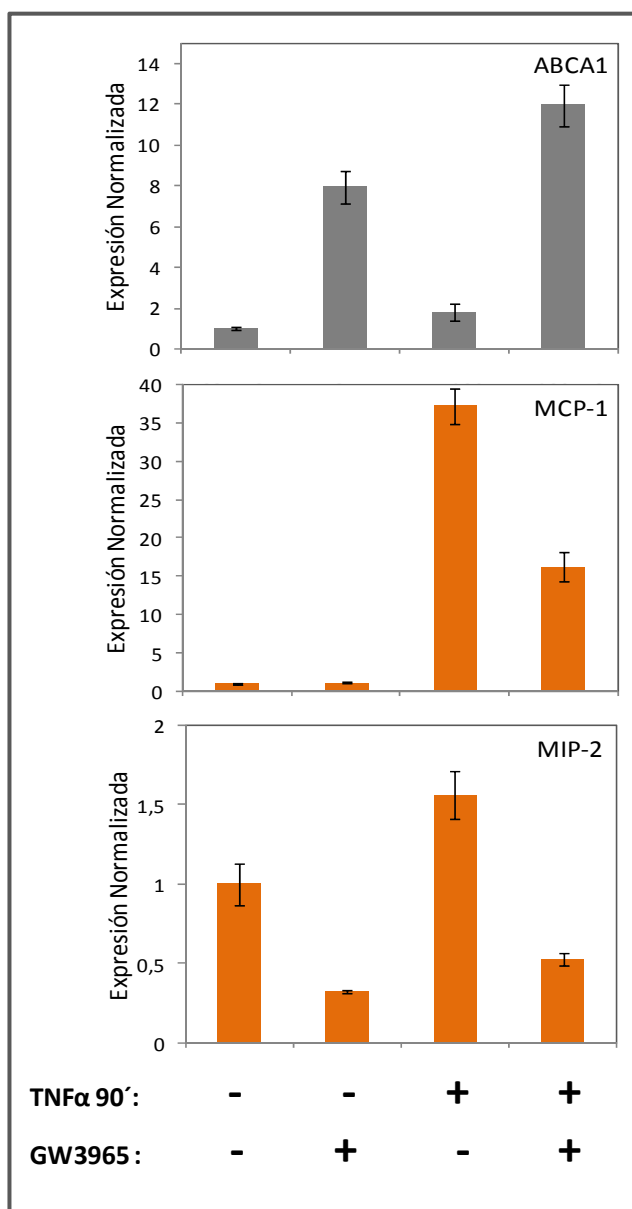
Cuando estudiamos la actividad transcripcional de LXR en células MLE-12 comprobamos que la expresión de ABCA1, se induce en presencia del agonista GW3965. Como era de esperar esta inducción se reprime cuando las células se cultivan en presencia del antagonista GW233 (Figura 31, B, panel izquierdo).

Finalmente, se realizó el estudio, mediante *Western Blot* (Figura 31, C), de los niveles de las proteínas ABCA1, LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , y pro-SP-C (usando  $\beta$ -actina como control de carga). Esta regulación mediada por LXR en las células MLE-12 no interfiere con la producción de la proteína específica de pneumocitos tipo II, pro-SP-C (forma no madura de la proteína surfactante SP-C). Estos resultados indican que la línea celular MLE-12 conserva la regulación de la expresión génica mediada por LXR, así como la expresión de, al menos, la pro-proteína SP-C.

### **3.1.2. EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LOS AGONISTAS DE LXR EN CULTIVO DE MLE-12.**

Los receptores LXR tienen un papel fundamental en la homeostasis del metabolismo lipídico, así como en la modulación de la respuesta inflamatoria. En este sentido, se ha descrito que el tratamiento de pneumocitos MLE-12, con la citoquina TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), induce en estas células la expresión de quimioquinas pro-inflamatorias como MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) o MIP-2 (*macrophage inflammatory protein-2*), entre otras (Sharma et al., 2007).

Para testar el potencial efecto antiinflamatorio de LXR en MLE-12, se cultivaron las células de manera combinada con agonistas de LXR y la citoquina pro-inflamatoria TNF $\alpha$ . Los resultados muestran en la figura 32 que cuando se cultivan las células MLE-12 en presencia de TNF $\alpha$  durante 90 minutos, se induce la expresión de las quimioquinas MCP-1 y MIP-2. Sin embargo, cuando las células son estimuladas con GW3965, el efecto inductor de TNF $\alpha$  se ve inhibido, más del 50%, en ambos casos. Estos datos ponen de manifiesto que la actividad antiinflamatoria de LXR no sólo ocurre en macrófagos (Joseph et al, 2003) sino en pneumocitos tipo II, cuando éstos se encuentran en un ambiente pro-inflamatorio. Además, este resultado tiene relevancia si lo extrapolamos al fenotipo de los pulmones LXR $\alpha\beta$ -/-, donde hemos observado que se desarrolla un ambiente inflamatorio. Por tanto, los pneumocitos tipo II carentes de LXR pueden estar contribuyendo al reclutamiento de células inmunes con la producción de las quimioquinas específicas.



**Figura 32. Efecto antiinflamatorio de los agonistas de LXR en cultivo de MLE-12.** Análisis de la expresión de quimioquinas MCP-1 y MIP-2 mediante qPCR en células MLE-12, así como la expresión de ABCA1 tras el tratamiento combinado con el agonista GW3965 y el estímulo inflamatorio TNF $\alpha$ . Los niveles de expresión son relativos a la expresión de la Polimerasa-2 (POL-2). Gráficas representativas de 3 ó 4 experimentos independientes donde los errores representan los valores individuales de los triplicados de una qPCR.

#### 4. ACTIVIDAD DE LXR EN CULTIVOS CELULARES EN PRESENCIA DE FLUIDO BRONCOALVEOLAR

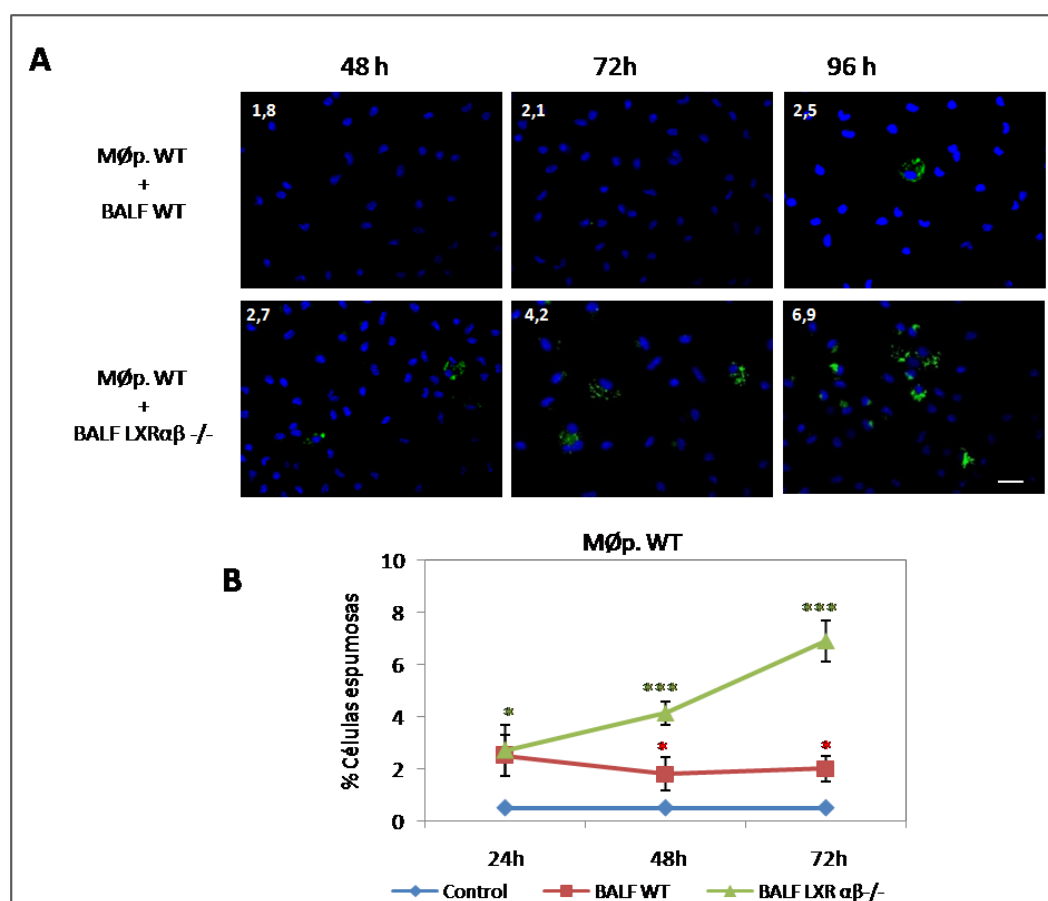
##### 4.1. MODELO IN VITRO DE INDUCCIÓN DE LIPOSIS

Una vez caracterizada la expresión de LXR en cultivos de pneumocitos tipo II (MLE-12), así como su respuesta a estímulos inflamatorios, nuestro siguiente paso consistió en intentar recrear *in vitro* las condiciones ambientales de lipodosis en las que se encuentran los pneumocitos en el pulmón del animal LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>. Para ello, se incubaron los cultivos celulares de pneumocitos tipo II, MLE-12 con el BALF obtenidos de animales LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> y se estudió si se produce alguna alteración sobre su fenotipo, y en caso de producirse, si la activación de LXR podría tener algún efecto sobre esa alteración.

#### 4.1.1. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL BALF EN CULTIVO DE MACRÓFAGOS PERITONEALES.

Inicialmente, y para poner a punto el modelo de inducción de lipidosis se analizó el efecto de la presencia de fluido broncoalveolar (BALF) en cultivos de macrófagos peritoneales WT (MØp.), dada la gran capacidad fagocítica de estas células y su, relativamente, fácil aislamiento. Los lavados broncoalveolares se realizaron según el apartado 1.2.1 de Material y Métodos. Los macrófagos peritoneales WT se cultivaron en presencia de BALF procedentes de animales WT y LXRαβ<sup>-/-</sup>, es decir, MØp. + BALF WT y MØp. + BALF LXRαβ<sup>-/-</sup>, durante 48, 72 y 96 horas. Finalizado el tiempo, en cada una de las condiciones, se procedió a la fijación, y adición de Bodipy 493/503, compuesto fluorescente verde con alta afinidad por los lípidos neutros (Figura 33, A) y, de esta manera, determinar el porcentaje de MØp espumosos (que acumulan lípidos, en forma de vacuolas, en su citoplasma).

Teniendo en cuenta que los MØp WT en condiciones basales presentan aproximadamente un 0,5% de células espumosas, en presencia del fluido alveolar WT, experimentaron un ligero incremento en la acumulación lipídica en sus citoplasmas (Figura 33, A, B). Este incremento de células espumosas, sin embargo, es significativamente mayor en el caso del cultivo de los MØp en presencia del fluido LXRαβ<sup>-/-</sup> (Figura 33, A, B). Este resultado preliminar, indica que los fluidos broncoalveolares procedentes de animales LXRαβ<sup>-/-</sup>, son capaces de inducir lipidosis en macrófagos peritoneales que este sistema podría funcionar como modelo potencial de inducción de lipidosis en los pneumocitos tipo II, dada su capacidad para captar y reciclar el material surfactante.

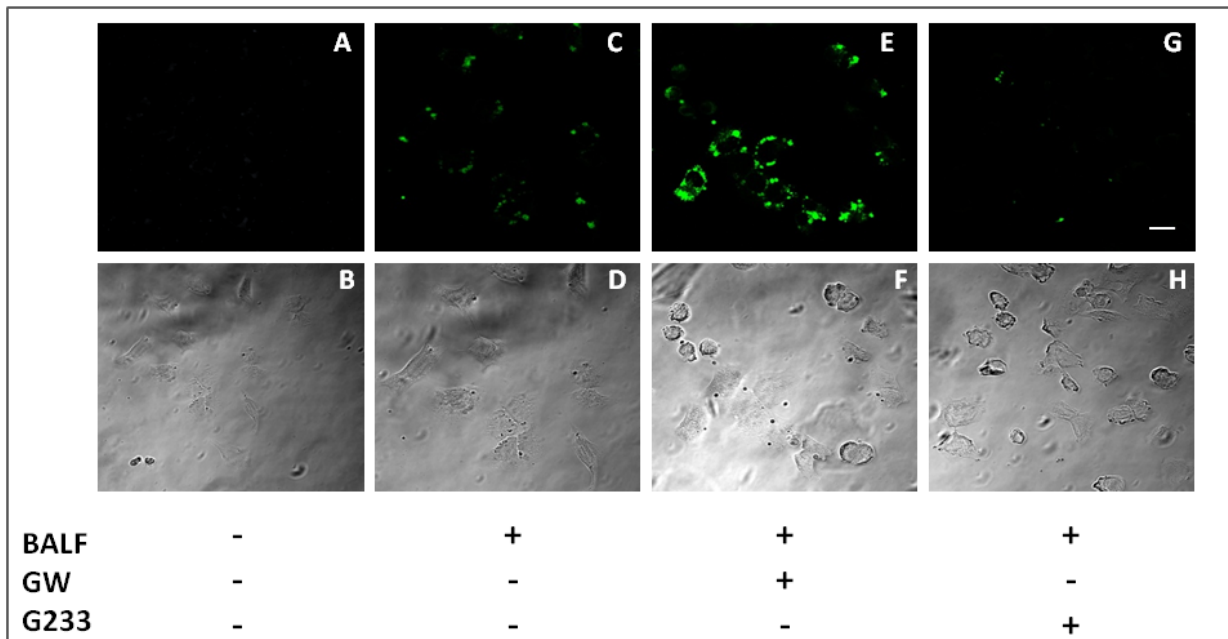


**Figura 33. Inducción de lipidosis en MØ peritoneales en presencia de surfactante natural (BALF).** MØ peritoneales (MØp.) de animales WT teñidos con el compuesto fluorescente Bodipy 493/503 para la detección de lípidos neutros. Recuento de macrófagos espumosos (Bodipy 493/503 positivos) tras 48, 72 y 96 horas en cultivo en presencia de BALF WT o LXRαβ<sup>-/-</sup> (A, B). Las cantidades corresponden al porcentaje de células espumosas; total células cuantificadas en cada caso: 500. Experimentos representativos de grupos de estudio n= 4. La barra de escala de todas las imágenes corresponde a 20 µm.

#### 4.1.2. LA ACTIVIDAD DE LXR REGULA LA UTILIZACIÓN DEL SURFACTANTE NATURAL (BALF) EN CULTIVOS DE CÉLULAS MLE-12.

Tras poner de manifiesto la eficacia de la incubación de fluido broncoalveolar en el cultivo de MØp, para desarrollar lipidosis en esas células, nos propusimos trasladarlo al cultivo de pneumocitos tipo II (MLE-12). De manera similar, se incubaron las células MLE-12 con BALF de animales LXRαβ<sup>-/-</sup>. Además y con el objetivo de determinar cuál es el resultado de la activación de LXR en estos cultivos, se testó, en combinación con el agonista de LXR, GW3965 o el antagonista G233, empleando, como sistema de detección, el compuesto Bodipy 493/503. El resultado se muestra en la figura 34, en la que se aprecia que la incubación de células MLE-12 con BALF, induce una ligera acumulación de lípidos neutros en sus citoplasmas. Este efecto se ve incrementado cuando se cultivan las células simultáneamente con el agonista GW3965, haciéndose más patentes las inclusiones lipídicas (Figura 34, C). Sin embargo, la combinación BALF

junto al antagonista G233, se traduce en una disminución drástica de la acumulación de lípidos neutros (Figura 34, E). En este sentido, los datos sugieren que la activación de LXR es fundamental para la captación del material surfactante por parte de lo pneumocitos tipo II. Su inactivación (como ocurre en el ratón  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ ) podría suponer una acumulación del surfactante en el espacio alveolar.



**Figura 34: Inducción de lipidosis en células MLE-12 en presencia de surfactante natural (BALF) procedente de animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ .** Células MLE-12 teñidas con el compuesto fluorescente Bodipy 493/503 para la detección de lípidos neutros. Las células MLE-12 fueron cultivadas sin fluido BALF (A), o con fluido BALF (C), además de, en presencia de agonista de LXR GW3965,  $1\mu\text{M}$  (E) o con el antagonista G233,  $2\mu\text{M}$  (G). Las imágenes B, D, F y H en contraste de fases, corresponden con los campos A, C, E y G respectivamente. Todas las imágenes son representativas de 5 experimentos independientes. La barra de escala de todas las imágenes corresponde a  $20\mu\text{m}$ .



---

## 5. DEFECTO EN EL METABOLISMO DEL MATERIAL SURFACTANTE EN LOS PNEUMOCITOS TIPO II DE ANIMALES LXR $\alpha\beta$ -/-

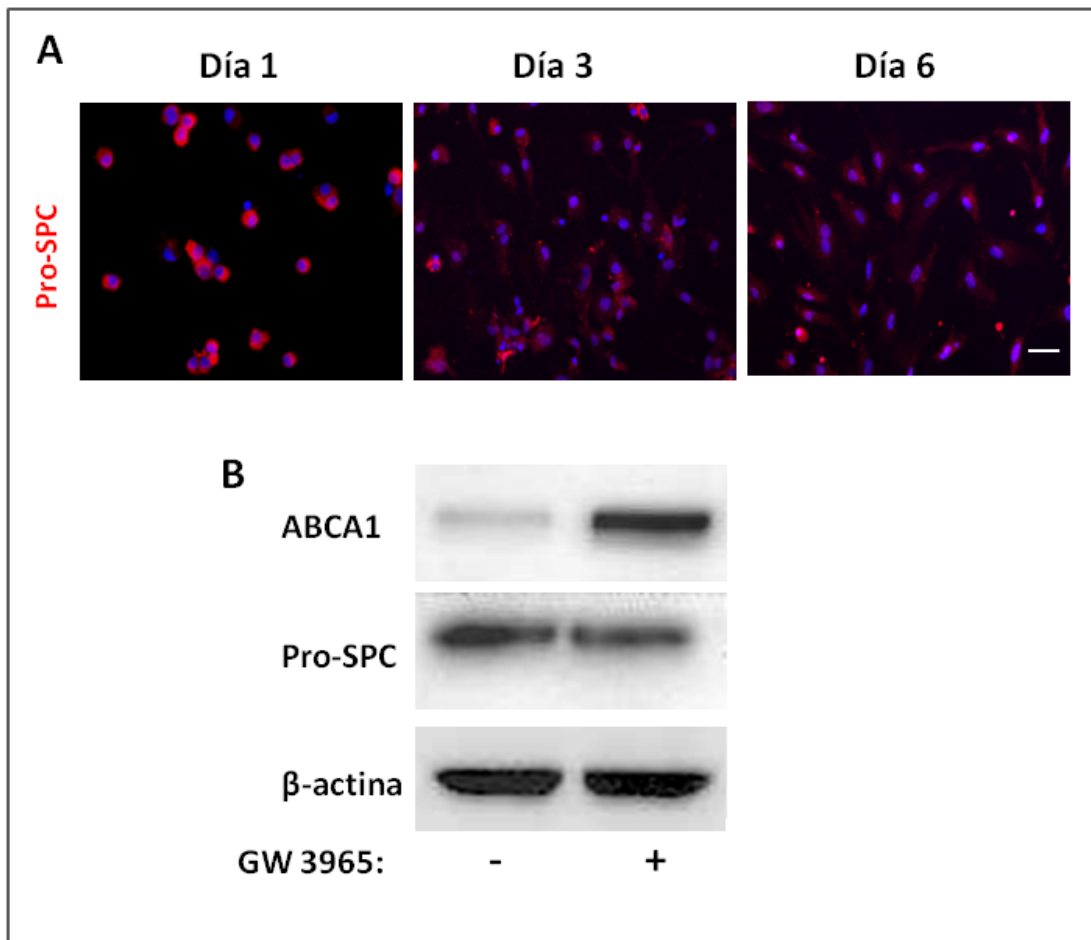
### 5.1. ESTUDIO DE PNEUMOCITOS PRIMARIOS

Los experimentos *in vitro* empleando el modelo de pneumocito MLE-12, implican a LXR directamente en la regulación del metabolismo surfactante. Por este motivo, se propuso el estudio de la actividad de LXR en pneumocitos primarios. Debido a la complejidad en el protocolo de aislamiento de este tipo celular, inicialmente se ensayó el aislamiento en rata y, posteriormente tras la optimización, en ratones.

#### 5.1.1. LXR SE ENCUENTRA REGULADO EN PNEUMOCITOS PRIMARIOS DE RATA

La obtención de pneumocitos tipo II de rata (RT2P, rat type II pneumocytes) se realizó siguiendo una versión adaptada del protocolo previamente establecido de Dobbs & González, 2002. Este protocolo requiere el uso de dos métodos combinados, la digestión enzimática y la selección celular. Finalmente, se cultivaron los pneumocitos tipo II, con un alto porcentaje de pureza (>85%), sobre lámina de Matrigel y se realizó inmunocitoquímica para detectar la proteína pro-SP-C, en los días siguientes al cultivo, concretamente, al día siguiente del aislamiento (Día 1), al tercero (Día3) y al sexto (Día 6) (Figura 35, A). Durante estos días de cultivo se comprobó, además, la identidad de las células mediante su morfología y el nivel de expresión de la proteína pro-SP-C. Al día siguiente del aislamiento, las células conservan su morfología más redondeada (que recuerda a su forma cuboidal *in vivo*) y un alto nivel de expresión de pro-SP-C. Sin embargo, el cultivo de estas células por tiempos prolongados afecta a su morfología y se observa una disminución de la expresión de pro-SP-C, indicando el inicio de su transdiferenciación a pneumocitos tipo I (Figura 35, A).

Para constatar la actividad de LXR en estos cultivos, se trataron los pneumocitos primarios de rata con el agonista GW3965 y se analizó la expresión de los genes de interés, como ABCA1 y pro-SP-C. En este sentido, se pudo comprobar que ABCA1 incrementa su expresión tras el tratamiento con el agonista, mientras que las células siguen expresando la proteína surfactante SP-C (Figura 35, B).



**Figura 35. Actividad de LXR en pneumocitos primarios tipo II de rata.** Inmunoquímica de pneumocitos tipo II primarios de rata en cultivo sobre matrigel para la proteína pro-SP-C, en los días 1,3 y 6 posteriores al aislamiento (A). Expresión de las proteínas ABCA1 y pro -SP-C en cultivo tras el tratamiento con el ligando sintético de LXR GW3965 (B). Todas las imágenes son representativas de 8 experimentos independientes. La barra de escala de todas las imágenes corresponde a 20  $\mu$ m.

### 5.1.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE PNEUMOCITOS PRIMARIOS TIPO II DE RATONES WT Y LXR $\alpha\beta$ -/-

Tras la optimización del método de aislamiento de pneumocitos tipo II en rata, nos propusimos el desafío en ratones. Con ese objetivo, se puso a punto un protocolo de aislamiento combinando el anteriormente mencionado (Dobbs & González, 2002) y otro más reciente (Messier, Mason, & Kosmider, 2012). El resultado se muestra en la figura 36. El seguimiento de la expresión de pro-SP-C, mediante inmunoquímica, fue el método utilizado como mecanismo de control de viabilidad y pureza a lo largo del proceso de aislamiento. Estos puntos de control son: tras la obtención del homogeneizado de pulmón total, en el que se detectaron entre un 5 y un 8% de pneumocitos; tras la recuperación de las células no adherentes, en el que se contaron entre un 18 y un 20 % de pneumocitos tipo II; y en el punto final del proceso tras la selección positiva

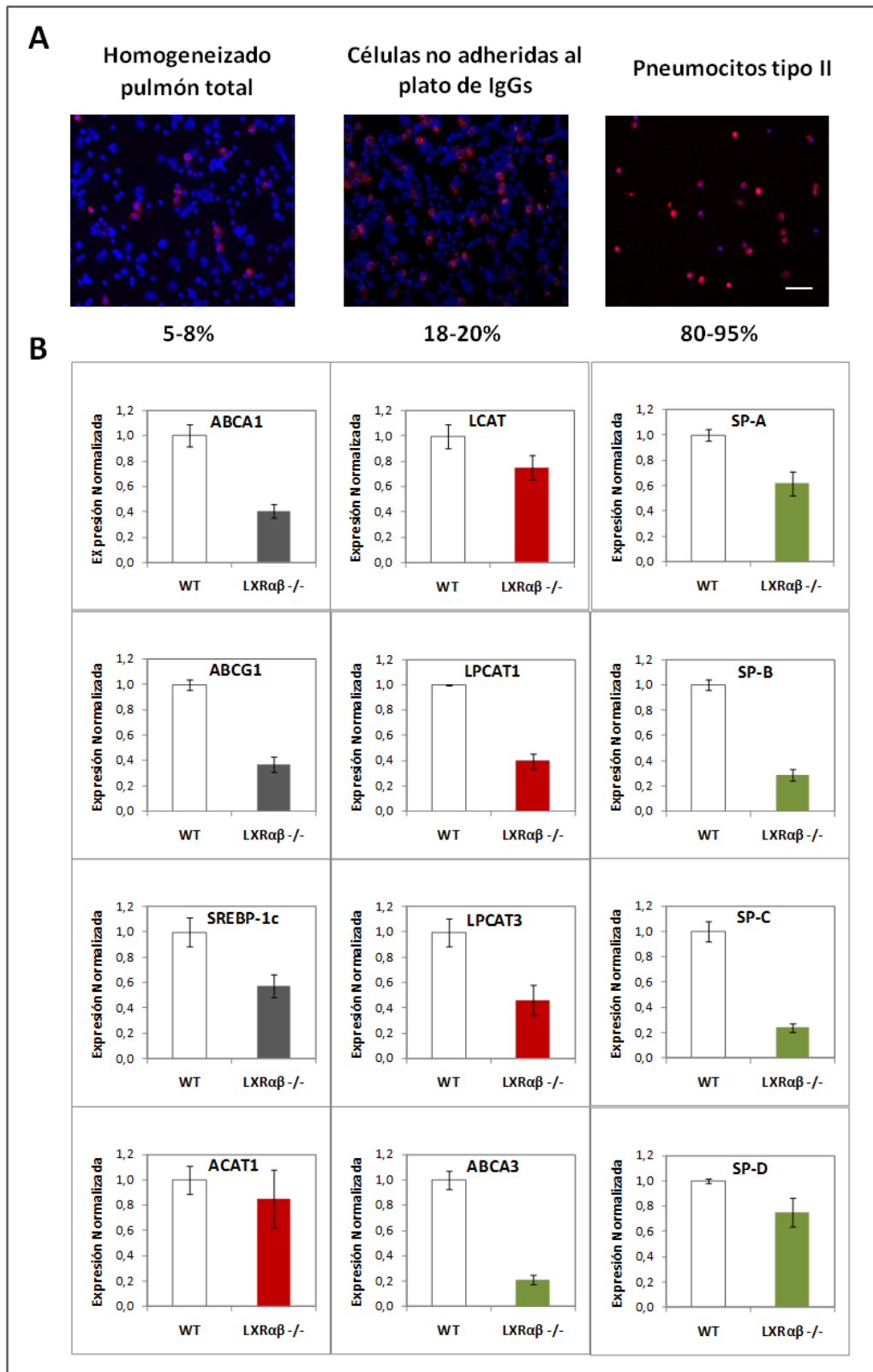
---

mediante columna inmunomagnética con el anticuerpo EpCAM, en el que se encontró un alto grado de pureza en pneumocitos, entre el 80-95% (Figura 36,A).

Finalmente, se analizó (Figura 36, B), mediante qPCR, la expresión de genes diana de LXR en pneumocitos WT y deficientes en LXR. Fue gratificante comprobar cómo algunos genes controlados por LXR en otros tipos celulares como, ABCA1, ABCG1 y SREBP-1c presentaron una menor expresión en los pneumocitos LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>. En cuanto a los genes implicados en el metabolismo lipídico como ACAT1, LCAT no presentaron cambios en su expresión. Sin embargo, se observaron niveles significativamente reducidos en la expresión de las aciltransferasas, LPCAT1 y LPCAT3 en pneumocitos LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> con respecto a los controles.

También examinamos la expresión de genes, que como hemos visto a lo largo de este trabajo presentan cambios en su regulación, y son de interés para la correcta homeostasis del material surfactante. Este análisis desveló, por un lado, que tanto SP-A como SP-D experimentaron ligeras caídas en el nivel de expresión en el pneumocito tipo II LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>. Y por otro, que la expresión de SP-C y SP-B experimentaron una disminución muy acusada, de hasta un 80% en pneumocitos tipo II LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>, con respecto a los controles WT. Además, sorprendentemente, el transportador de fosfolípidos y colesterol en la membrana de los cuerpos lamelares, ABCA3, también disminuyó su expresión un 80 % menos en los animales LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>.

Este análisis, por tanto, confirma el defecto en la expresión de genes, implicados en la síntesis y reciclaje del material surfactante, en los pneumocitos del animal LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> frente al WT. De esta manera, podemos corroborar que el fenotipo pulmonar mostrado en los animales LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> se debe probablemente, en su origen, a una mala gestión del material surfactante por parte del pneumocito tipo II.



**Figura 36. Análisis de la expresión génica de pneumocitos primarios tipo II de ratones WT y LXRαβ<sup>-/-</sup>.** Inmunoquímica de pneumocitos tipo II primarios, mediante la detección de la proteína pro-SP-C en monocapa tras citospín; en el homogeneizado de pulmón total (A), tras la recuperación de células no adherentes (B) y en el punto final del aislamiento tras la columna de selección positiva (C). Análisis de la expresión génica en pneumocitos tipo II de animales WT y LXRαβ<sup>-/-</sup> de genes relevante en la regulación de LXR (genes diana, color gris), metabolismo lipídico (color rojo) y homeostasis del surfactante pulmonar (color verde). Todas las imágenes son representativas de 8 experimentos independientes. La barra de escala de todas las imágenes corresponde con 10 μm. Gráficas representativas de 3 ó 4 experimentos independientes donde los errores representan los valores individuales de los triplicados de una qPCR.

# **DISCUSIÓN**



---

## DISCUSIÓN

Los receptores LXR han sido estudiados en los últimos años por su papel en el metabolismo lipídico, y han sido denominados “sensores de colesterol”. Además ha quedado patente su relevancia en la respuesta inmunitaria, concretamente, en el papel que desarrolla el macrófago en la respuesta innata.

El aparato respiratorio constituye una de las primeras barreras de actuación en esta respuesta inmunitaria. El alveolo pulmonar, unidad funcional del aparato pulmonar y crucial para el intercambio gaseoso, forma una superficie bañada por líquido surfactante que está en contacto directo con el medio externo y por tanto susceptible de sufrir agresiones antigénicas. En este sentido, macrófagos alveolares pero también epitelio alveolar y material surfactante son indispensables para dar una adecuada respuesta inmunitaria. En este contexto el papel de LXR no se ha descrito aún en profundidad, y es por ello que el propósito de esta tesis ha consistido en estudiar la importancia de los receptores LXR en la fisiología pulmonar.

El primer paso dado, para dilucidar el papel de LXR en la fisiología pulmonar, fue analizar macroscópica e histológicamente los pulmones de animales  $LXR\alpha^{-/-}$ ,  $LXR\beta^{-/-}$  y  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  y compararlos con el del animal WT. Nuestras observaciones destacan a nivel macroscópico un halo blanquecino (Fig.13) que bordea los lóbulos pulmonares de los animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ , no así de los  $LXR\alpha^{-/-}$ ,  $LXR\beta^{-/-}$ . Este halo se traduce histológicamente en un área subpleural con gran celularidad donde abundan los infiltrados de células inmunes (linfocitos T y B) y zonas de macrófagos espumosos Oil-Red-O y CD68 positivos (Fig.16). Las áreas Oil-Red positivas se hacen más patentes con la edad y llegan a ocupar gran parte del parénquima pulmonar, sin embargo observables sólo en los animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ , lo que indica que la pérdida de ambas isoformas de LXR es lo que promueve el daño. Fenotipos parcialmente análogos se observan en los animales  $ABCA1^{-/-}$  (McNeish et al., 2000) o  $ABCG1^{-/-}$  (Baldán et al., 2006, 2008), los cuales también desarrollan lipidosis en su tejido pulmonar, poniendo de manifiesto que la actividad de LXR modula de manera importante el metabolismo lipídico en el pulmón.

Cuando el estudio histológico lo realizamos en tejidos procedentes de animales de edad avanzada (12 meses de edad) detectamos un pulmón anatómicamente patológico, que en algunos aspectos, como es su estado avanzado de fibrosis, recuerda a la Proteínosis Alveolar Pulmonar (PAP, Pulmonary Alveolar Proteinosis). Esta patología, caracterizada por la acumulación de material lipoproteico que rellena los espacios alveolares, así como el interior de los macrófagos alveolares, ha sido descrita como una enfermedad autoinmune (Shibata et al., 2001; Trapnell &

Whitsett, 2002; Trapnell et al., 2009). Los pacientes con PAP presentan autoanticuerpos capaces de neutralizar a GM-CSF (Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos) en muestras obtenidas de lavado broncoalveolar. Estos estudios apoyan otros previos que demuestran como ratones *Csf2*<sup>-/-</sup> y ratones *Csf2r*<sup>-/-</sup> (carentes de GM-CSF o su receptor respectivamente) desarrollan PAP. Todos estos hallazgos apoyan la idea de que la pérdida de funcionalidad de GM-CSF causa un fallo en el funcionamiento de los macrófagos alveolares, que da lugar a un defecto en el catabolismo de los lípidos y proteínas del material surfactante y, en consecuencia, una disrupción de la homeostasis del surfactante. En esta línea, y teniendo en cuenta el trastorno autoinmune que sufren los animales *LXRαβ*<sup>-/-</sup> (A-Gonzalez et al., 2010), es posible que el fenotipo detectado en los macrófagos alveolares de estos animales se deba, al menos en parte, a la neutralización de sus funciones por autoanticuerpos. Apoyando esta hipótesis encontramos que los pulmones *LXRαβ*<sup>-/-</sup> presentan valores elevados de inmunoglobulinas, concretamente IgA, IgG e IgM (Fig.19). Es posible que los numerosos infiltrados linfocíticos que localizamos en el área subpleural (Fig. 13) sean los productores de estas inmunoglobulinas, y que puedan contener cierto porcentaje de autoanticuerpos. Por otro lado el análisis mediante qPCR confirma que estos pulmones *LXRαβ*<sup>-/-</sup> presentan una alteración en la expresión de algunos de los genes diana de LXR implicados en el metabolismo lipídico, como son ABCA1, ABCG1, SREBP-1c y FASN (Fig. 20). La expresión de estos genes, implicados en la regulación del flujo de colesterol y de la vía lipogénica, se encontró notablemente disminuida cuando se estudiaron muestras de pulmón total procedentes de animales *LXRαβ*<sup>-/-</sup>. Por tanto, postulamos que, el fenotipo lipídico puede tener varios orígenes, uno derivado de un trastorno autoinmune y otro del producido por el desequilibrio en la expresión de los genes involucrados en el metabolismo lipídico.

Hasta este punto encontramos que los pulmones de los animales *LXRαβ*<sup>-/-</sup> presentan un claro desequilibrio en el contenido lipídico, posiblemente debido a un defecto en la gestión del material surfactante por parte del macrófago alveolar y a un estado inflamatorio que se agrava con la edad. Este estado inflamatorio se confirma con la presencia de valores elevados de algunas proteínas, cuyo aumento se relaciona con la progresión de un estado inflamatorio (Fig. 21). Es el caso de SPP-1 (secreted phosphoprotein 1) y MIP-1β (macrophage inflammatory protein- 1β), ambas moléculas son potentes quimiotáticos de células inflamatorias que promueven el reclutamiento a los lugares con inflamación, por lo que probablemente tengan un papel importante en creación del ambiente inflamatorio que caracteriza al tejido pulmonar *LXRαβ*<sup>-/-</sup>.



---

También se encontraron elevaciones en la expresión de algunas metaloproteinasas, MMP-8 (actividad colagenasa-2) y MMP-12 (con actividad elastasa) en el tejido LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>. Ambas están implicadas en la degradación de la matriz extracelular en procesos de desarrollo, crecimiento y reparación de heridas. Sin embargo, cuando analizamos la matriz extracelular mediante tinción histológica encontramos un incremento de fibras de colágeno en el tejido pulmonar LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> de animales de avanzada edad, a pesar del ligero incremento en MMP-8 (Fig. 21). Es posible que inhibidores de las MMP, los TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases), estén ejerciendo su función; en este sentido, son necesarios más estudios que profundicen en la regulación de la expresión de estos genes.

Ha quedado patente el importante daño que sufren los pulmones de los ratones LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>, hecho que se refleja en la acumulación de los macrófagos alveolares de la zona subpleural. Sin embargo, el carácter inflamatorio también viene definido por las acumulaciones de otras células inmunes. En este sentido, en este trabajo analizamos las poblaciones celulares del lavado broncoalveolar a tres edades diferentes. Inicialmente encontramos que el recuento total de células recuperadas incrementa al doble en el fenotipo LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> con respecto al WT. Esta diferencia causa el incremento de un 20% en macrófagos espumosos, a veces multinucleados y con citoplasmas llenos de vacuolas lipídicas, además de elevaciones importantes de linfocitos y neutrófilos en LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> (Fig. 23). Estos datos apoyan los resultados obtenidos mediante las técnicas histológicas, poniendo de manifiesto que el proceso inflamatorio que sufren estos animales en su tejido pulmonar implica una tendencia a la obstrucción de las vías aéreas, concretamente al colapso de los espacios alveolares. Analizando en detalle estos lavados broncoalveolares, mediante su cultivo, encontramos la presencia de cristales extracelulares en forma hexagonal en los lavados LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> (Fig. 24). Estos depósitos extracelulares ya habían sido descritos anteriormente como cristales eosinofílicos (Huffnagle et al., 1998; Takamoto et al., 1997). En estudios más recientes se ha logrado identificar la composición de estos cristales, como una mezcla de varias proteínas, donde el 90% está constituida por diferentes variantes de la *quitinasa* (Baldán et al., 2008; Guo et al., 2000).

Paralelamente a estos cultivos, se realizaron inmunofluorescencias con el objetivo de localizar a las células espumosas. En este caso comprobamos que únicamente los macrófagos alveolares CD68<sup>+</sup> son los que acumulan lípidos neutros en forma de vacuolas lipídicas en su citoplasma (Fig. 24).

Por otro lado, está ampliamente descrito que la fracción lipídica del surfactante pulmonar está compuesta principalmente por fosfolípidos, y en menor medida por colesterol. En este sentido,

estudiamos también cual es el comportamiento de los macrófagos alveolares obtenidos de BALF cuando se incuban en presencia de fosfolípidos y se analiza su contenido de lípidos neutros. En presencia de estos fosfolípidos marcados, los macrófagos WT los captan del medio hacia su interior, encontrando niveles fisiológicos normales de macrófagos con vacuolas lipídicas bodipy positivas. Sin embargo, se confirma que el 20% de los macrófagos LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> son células espumosas, que curiosamente presentan un marcaje muy débil procedente de los fosfolípidos. Este resultado pone de manifiesto que los macrófagos espumosos que acumulan lípidos neutros probablemente captan menos fosfolípidos. En consecuencia, pueden darse dos circunstancias, por un lado, la acumulación extracelular de material surfactante, lo que efectivamente ocurre y se manifiesta en la técnica de PAS (Fig. 17), y por otro, que la vía para la retirada de material lipídico del espacio alveolar, el reciclaje, suponga una carga mayor para los pneumocitos tipo II.

Para caracterizar los pneumocitos tipo II realizamos varias aproximaciones. Mediante inmunohistoquímica, comprobamos que su número no aumenta en el tejido LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> (Fig. 16). Sin embargo, el análisis mediante microscopia electrónica mostró algunas características diferenciadoras con respecto al fenotipo WT. Los pneumocitos LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> presentan un volumen celular notablemente mayor y cuerpos lamelares aberrantes, esto es, que han aumentado de tamaño y son más electrodensos que los de los animales WT (Fig. 18). Estas características han sido descritas en animales con deficiencias en el procesamiento del material surfactante (Botas et al., 1998; McNeish et al., 2000), lo que sugiere que es muy probable que en los animales LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>, el pneumocito tipo II también esté afectado. Por su parte, los macrófagos alveolares, también hipertróficos muestran inclusiones intracitoplasmáticas en forma de agujas, que en otros casos han sido descritas como agujas de colesterol (Baldán et al., 2006; Hawgood et al., 2002).

El hallazgo de los pneumocitos tipo II hipertróficos nos llevó al estudio de la expresión génica de las proteínas surfactantes SP-A, -B, -C, y -D. Fundamentales en el procesamiento del material surfactante y con funciones variadas en relación a sus características moleculares. Encontramos una disminución importante en la expresión de la SP-C y una elevación, también significativa de SP-D (Fig. 22). SP-C es importante para el procesamiento del material surfactante por los pneumocitos tipo II en el interior de sus cuerpos lamelares, así como en la formación de la monocapa surfactante (Amin et al., 2001) (Glasser et al., 2009). En el caso de SP-D, ha sido descrita en los procesos de inmunidad innata a nivel pulmonar, incrementando la opsonización de microorganismos y limitando la respuesta inflamatoria (Stolley et al., 2012). Todos estos hallazgos, implican directamente a los pneumocitos tipo II en el desarrollo de la patología pulmonar que sufren los animales LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>. Considerados en conjunto, nuestros resultados

---

apunten a que en el ambiente alveolar, tanto los macrófagos alveolares como los pneumocitos tipo II son responsables del fenotipo pulmonar LXR $\alpha\beta$ -/-.

Como parte de la caracterización de los pulmones LXR $\alpha\beta$ -/- nos propusimos profundizar en una de las características fenotípicas más llamativas que desarrollan los pulmones LXR $\alpha\beta$ -/-, la lipidosis. Inicialmente se llevaron a cabo, mediante HPTLC análisis lipídicos en muestras de pulmón total y posteriormente en muestras de BALF. El cambio más llamativo detectado fue el incremento en esteroides del colesterol, no así del colesterol total, que disminuye ligeramente en pulmón total (Tabla 3). Estos resultados apoyan los anteriormente obtenidos en expresión génica de pulmón total y de macrófagos alveolares, donde se observa una desregulación de los genes diana de LXR, ABCA1, ABCG1. Estos transportadores de colesterol hacia el exterior celular se expresan menos y en consecuencia probablemente el colesterol tiende a acumularse en el interior celular. La potencial toxicidad que esto supone para las células hace que se incremente la expresión de enzimas como LCAT o ACAT encargadas de esterificar el colesterol, resultando en su almacenamiento en forma de esteroides de colesterol. Corroboran esta hipótesis, las elevaciones importantes de los ácidos grasos poliinsaturados, ácido araquidónico, AA (20:4n-6) y ácido docosahexaenoico, DHA (22:6n-3). Estos dos ácidos grasos se incorporan preferentemente al hidroxilo libre del colesterol tras la transferencia desde la fosfatidilcolina (PC) por medio de LCAT. Por otro lado, de todos es conocido el papel del AA como precursor de potentes mediadores inflamatorios, como son las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Kulmacz, 1998; Mitchell et al., 1995), moléculas que tendrían un papel destacado en el ambiente inflamatorio acaecido en el pulmón LXR $\alpha\beta$ -/-.

Por otro lado, una característica llamativa es la reducción, en pulmón total del nivel de triglicéridos. En este sentido las importantes reducciones en la expresión de SREBP-1c (bajo control de LXR) regulador central en la vía lipogénica, para la síntesis en último término de triglicéridos, son probablemente las responsables de esta disminución (Fig. 25).

Otro cambio importante encontrado, en pulmón total del animal LXR $\alpha\beta$ -/-, es la disminución en el contenido de esfingomielina, esfingolípido que tiene dos funciones importantes, como componente estructural de las membranas biológicas y como molécula fuente de ceramida, molécula pleiotrópica que tiene un papel clave en la señalización intracelular. Escrutando esta última vía, observamos que en los análisis no se detectan sulfátidos, por lo que la única fuente de ceramidas es la esfingomielina. La generación de ceramida a partir de la esfingomielina es producto de la activación de la esfingomielinasa, generalmente por estímulos relacionados con el estrés celular (Jenkins et al., 2009). Recientemente ha sido descrita, en los procesos de

arterioesclerosis, una esfingomielinasa ácida que es secretada por las células subendoteliales vasculares y cuya actividad, transformando la esfingomielina-LDL a ceramida-LDL, favorece la agregación de LDL al subendotelio y consecuentemente la formación de células espumosas (Tabas, 1999; Yan & Hansson, 2007). Basándonos en estos datos y a falta de realizar análisis de los niveles de expresión del gen (SMPD1) que codifica para las esfingomielinasas ácidas, podríamos sugerir que en el pulmón del animal  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ , la activación de la hidrólisis de esfingomielina estaría potenciando la formación de macrófagos espumosos.

Los ratios y sumatorios más importantes también han sido analizados. En general, existe una elevación en los niveles totales de n-6 PUFA y n-3 PUFA (polyunsaturated fatty acid) además de en la relación 18:1n-9/n3 HUFA (highly unsaturated fatty acid). Este cambio se refleja en los ratios de insaturación y peroxidabilidad, ambos elevados en  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (Tabla 3). El índice de peroxidabilidad hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos. Esta degradación consiste en la formación de radicales libres que son capaces de capturar electrones de los lípidos, casi siempre de ácidos grasos poliinsaturados. En muchos casos el ambiente inflamatorio, como el descrito para el animal  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ , implica también un entorno capaz de generar un importante estrés oxidativo, ejemplos de ello son modelos de asma (Brussino et al., 2010) o de daño producido por humo de tabaco (Kosmider et al., 2011).

En cuanto al análisis del BALF procedente de animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  (Tabla 4), volvemos a ver una repetición en cuanto al aumento de los niveles de esteres del colesterol y del AA. Pero quizás, lo más destacables que, los niveles del principal componente del material surfactante, la DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) presenta una ligera caída en cada uno de sus componentes, fosfatidilcolina y ácido palmítico (16:0). Igual de llamativo resulta el aumento de la relación LNT/LPT (lípidos neutros totales/lípidos polares totales) en  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ . Estos cambios se traducirían posiblemente, en un cambio en las propiedades físicas del surfactante, lo que conllevaría la disminución de la capacidad surfactante, es decir, menor capacidad tensoactiva del material y, en consecuencia, dificultades respiratorias. Este hecho se ve reforzado por la bajada dramática (100%) del fosfatidilglicerol (PG), fosfolípido minoritario del líquido surfactante pero de una gran importancia para sus propiedades biofísicas.

El estado patológico de inflamación crónica y acumulación lipídica desarrollado en los pulmones de los ratones  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  implica directamente una alteración del fenotipo celular de los macrófagos alveolares y los pneumocitos tipo II. Con el objetivo de evaluar la contribución de los macrófagos alveolares a la evolución de esta patología se planteó el desarrollo de trasplantes de médula ósea (BMT). Mediante esta aproximación, tratamos de corroborar si los progenitores

---

mieloides donantes, repueblan los pulmones receptores con nuevos macrófagos alveolares tras un tiempo establecido. Realizando los trasplantes WT → WT y LXRαβ<sup>-/-</sup> → LXRαβ<sup>-/-</sup>, comprobamos que los animales receptores mantuvieron el fenotipo pulmonar original. Cuando analizamos mediante técnicas histológicas el BMT LXRαβ<sup>-/-</sup> → WT comprobamos que el animal mantiene las características tisulares del pulmón de un animal WT, sin embargo observamos pequeñas zonas donde se aprecian algunos macrófagos espumosos (Fig. 26). En cambio, en el caso del trasplante WT → LXRαβ<sup>-/-</sup>, el tejido presenta todas las características que presentaría un animal LXRαβ<sup>-/-</sup> de la misma edad. Mediante transferencia de progenitores mieloides GFP positivos (Matute-Bello et al., 2004) en animales LXRαβ<sup>-/-</sup>, comprobamos que la transferencia de células GFP ha ocurrido satisfactoriamente (Fig. 28), sin embargo al igual que en el caso de la transferencia WT → LXRαβ<sup>-/-</sup>, el área subpleural se mantiene congestionada con presencia de macrófagos espumosos (Fig. 27). Todos estos estudios en su conjunto confirmaron que los macrófagos espumosos de las áreas subpleurales eran viables (Fig.29) y derivados de la medula donante (Fig.30). Esto significa, que el trasplante consiguió recambiar la totalidad de las células mieloides del pulmón, a pesar de observarse cargadas de lípidos. Por tanto, este resultado pone de manifiesto que es probablemente el ambiente, o más concretamente, las alteraciones en la actividad de los pneumocitos tipo II del tejido LXRαβ<sup>-/-</sup>, la que promueva el defecto en el macrófago una vez recambiado. Finalmente, podemos postular, dentro de los límites de nuestras aproximaciones, que tanto los macrófagos alveolares como los pneumocitos tipo II, responsables ambos del metabolismo del material surfactante, se encuentran afectados en nuestro modelo de estudio LXRαβ<sup>-/-</sup>.

Seguidamente, nos propusimos estudiar en mayor profundidad la fisiología del pneumocito tipo II. Desarrollamos un modelo de estudio en una línea de pneumocitos tipo II, MLE-12. Comprobamos, en esta línea celular, la presencia de ambas isoformas de LXR así como su capacidad de regulación de la expresión génica (Fig.31), además de validar el papel de LXR como modulador de la respuesta inflamatoria (Fig.32).

La relevancia de este resultado radica en el hecho de que la capacidad antiinflamatoria de LXR no es una propiedad única de los macrófagos (Joseph et al., 2003) sino también de los pneumocitos tipo II. Esto significa que es muy probable que en los pulmones LXRαβ<sup>-/-</sup> el ambiente proinflamatorio que hemos descrito, sea capaz de inducir en los pneumocitos la producción de una serie de quimioquinas que estén contribuyendo al reclutamiento de células inmunes. Sin duda, este resultado posiciona a los agonistas de LXR como candidatos farmacológicos frente a la inflamación pulmonar.

Sin embargo, no conocemos el papel de LXR en la homeostasis del material surfactante en pneumocitos tipo II. Por este motivo diseñamos un modelo de estudio en el que intentamos recrear el ambiente al que se encuentran sometidos los pneumocitos en su entorno natural, el alvéolo. Este tipo de ensayos, en los que se coincuban fluidos alveolares y cultivos celulares, han sido descritos previamente por (Naureckas et al., 1999) aunque con otros objetivos. Como demuestran los resultados obtenidos en la Figura 33, el BALF LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> tiene una gran capacidad para inducir acumulaciones de lípidos neutros en los macrófagos. Es por ello que el ambiente extracelular en el que se encuentran los pneumocitos en el animal LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> presenta una mayor capacidad de inducir lipodosis.

Finalmente, cuando se traslado el modelo anterior al cultivo *in vitro* de pneumocitos tipo II (MLE-12) pudimos constatar que la incubación con BALF procedente de animales LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> induce una leve lipodosis en las células MLE-12, hecho que se ve potenciado cuando las células son cotratadas con el agonista GW3965 (Fig. 34). Estos datos sugieren que la activación de LXR es fundamental para la captación de especies lipídicas por parte de los pneumocitos tipo II. Su inactivación (como ocurre en el ratón LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>) podría suponer la acumulación del surfactante, y por ende, de su contenido lipídico, congestionando el espacio alveolar.

Los resultados obtenidos con la línea de pneumocitos MLE-12 indican que la actividad de LXR controla, tanto la respuesta inflamatoria como el metabolismo lipídico. En este sentido LXR podría estar involucrado en el metabolismo del material surfactante, dada su capacidad para regular la disponibilidad de especies lipídicas en el pneumocito tipo II. Para ello desarrollamos un método con el que obtener una población celular de pneumocitos tipo II con un alto índice de pureza. Sin duda, el aislamiento de pneumocitos de ratón ha constituido uno de los desafíos de esta tesis. Analizamos, tras el aislamiento, la expresión de una serie de genes involucrados en la regulación de LXR y en el metabolismo del material surfactante (Fig. 36). Nuevamente, encontramos una regulación alterada en los genes diana de LXR, ABCA1, ABCG1 y SREBP-1c, hecho que afectaría directamente a la disponibilidad de especies lipídicas por parte del pneumocito, y necesarias para la correcta síntesis del material surfactante.

ABCA1 ejerce su función en el pneumocito tipo II en la membrana plasmática del dominio basolateral, es decir, en contacto con el plasma sanguíneo. Desde ahí entra en contacto con las lipoproteínas sanguíneas permitiendo el flujo de fosfolípidos y colesterol hacia ellas. El animal que carece de este gen, ABCA1<sup>-/-</sup>, tiende a acumular lípidos en sus pneumocitos (McNeish et al., 2000), lo que indica la importancia de este transportador en la fisiología del pneumocito tipo II. En el caso del animal LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> no observamos una acumulación del mismo nivel en los pneumocitos,

---

por lo que probablemente, y a pesar de su menor expresión, ésta es suficiente para evitarla. Además para que exista acumulación lipídica es necesaria la transformación del colesterol en ésteres de colesterol, en este sentido, y a diferencia del macrófago alveolar, las enzimas involucradas LCAT y ACAT mantienen niveles de expresión similares en pneumocitos WT y LXR $\alpha\beta$ -/-.

ABCG1, es una proteína citoplasmática, de la que recientemente se ha demostrado su localización en endosomas tardíos y endosomas de reciclaje (Tarling & Edwards, 2011), y aunque no se ha demostrado que forme parte de los cuerpos lamelares de los pneumocitos tipo II, muy probablemente la deficiencia en la expresión de ABCG1 en nuestro modelo de pneumocitos LXR $\alpha\beta$ -/- afecte al reciclaje del surfactante (Baldán et al., 2006, 2008).

El miembro de la familia ABC que experimenta una espectacular reducción en su expresión en el animal LXR $\alpha\beta$ -/- es ABCA3. Aunque no existen evidencias hasta ahora de que su expresión esté bajo control directo de LXR (lo que sería interesante explorar en un futuro), sí que se ha demostrado que está controlada por SREBP-1c (Besnard, Xu, & Whitsett, 2007). Es posible que la menor expresión de SREBP-1c afecte a ABCA3 en LXR $\alpha\beta$ -/-. Se encuentra en altos niveles en los pneumocitos tipo II, concretamente asociado a los cuerpos lamelares (Mulugeta et al., 2002; Yamano et al., 2001). Las mutaciones en el gen de ABCA3 humano se asocian con el Síndrome de Distrés Respiratorio Letal en recién nacidos, los cuales fallecen al nacer por no contener la cantidad adecuada de material surfactante (Garmany et al., 2006). Los ratones ABCA3-/- mueren 1 hora después de nacer por fallo respiratorio, no presentan material surfactante normal en el espacio alveolar ni cuerpos lamelares maduros (Ban et al., 2007; Fitzgerald et al., 2007). Se caracterizan por una drástica disminución de las especies lipídicas fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol. A nivel ultraestructural, a diferencia de los ABCA3-/-, los animales LXR $\alpha\beta$ -/- presentan cuerpos lamelares gigantes y reducciones de DPPC discretas. Sin embargo, es posible que la reducción en ABCA3 en las membranas de los cuerpos lamelares LXR $\alpha\beta$ -/- sea en parte responsable de esta moderada reducción en la principal especie lipídica del material surfactante así como la del fosfatidilglicerol, fosfolípido minoritario pero crucial para conferir fluidez a las altamente empaquetadas monocapas de DPPC en la superficie surfactante, que se reduce a cero en nuestro análisis del contenido de material surfactante (Tabla 4). Curiosamente, en el animal ABCA3-/- no se detecta la proteína surfactante madura de SP-C, de manera similar que en nuestro animal LXR $\alpha\beta$ -/-, quien reduce significativamente su expresión también. Por tanto, es muy probable que la naturaleza aberrante de los cuerpos lamelares LXR $\alpha\beta$ -/- sea debido a regulación deficiente de la expresión de ABCA3, SP-C y SP-B.

Como se ha indicado anteriormente, es posible que el reciclaje del material surfactante esté afectado en el animal  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ . Es importante apuntar que en el pneumocito tipo II existen dos vías biosintéticas del principal componente del surfactante, la DPPC, y de los fosfolípidos en general; son la vía *de novo* (Vía de Kennedy y Weiss) (Kennedy & Weiss, 1956) y la vía del reciclaje o remodelación (Ciclo de Land) (Lands, 1958). Mediante la primera, los glicerofosfolípidos son sintetizados a partir del glicerol-3-fosfato. A través de la segunda, los grupos acilo de la posición sn-2 de fosfolípidos son rápidamente recambiados mediante una reacción concertada entre una fosfolipasa  $A_2S$  ( $PLA_2S$ , phospholipase A2) y una lisofosfatidil aciltransferasa (LPLATs, lysophospholipid acyltransferase) que vuelve a esterificar un nuevo ácido graso. Estudios *in vitro* han estimado que entre el 55-75% de la fosfatidilcolina saturada (DPPC) es sintetizada por la vía de la remodelación (den Breejen, Batenburg, & van Golde, 1989; Mason & Nellenbogen, 1984). De hecho, algunos trabajos más recientes corroboran esta idea, demostrando incluso que existe una interrelación entre ambas vías, necesaria para la correcta homeostasis del surfactante (Butler & Mallampalli, 2010). En nuestro caso hemos analizado dos de las lisofosfatidil aciltransferasas potencialmente afectadas en el genotipo  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ , LPCAT3, recientemente identificada como gen diana de LXR (Ishibashi et al., 2013; Rong et al., 2013) y LPCAT1, la cual se expresa específicamente en el retículo endoplasmático de los pneumocitos tipo II (Bridges et al., 2010). En ambos casos la expresión de estas enzimas disminuye por debajo del 50% en pneumocitos  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  con respecto al animal WT.

LPCAT3 tiene preferencia como sustrato a los ácidos insaturados principalmente araquidónico (AA) (Pérez-Chacón et al., 2010; Shindou et al., 2009). La reducción de la expresión de LPCAT3 implica que se produzcan menos reacilaciones en los lisofosfolípidos con el donante AA, si bien esto no se traduce en una acumulación exacerbada del AA, sino en una ligera disminución de este ácido graso (Tabla 4). Esto se explica porque parte de esta molécula es destinada hacia la fracción de lípido neutro. Probablemente lo que ocurre es que existe demanda para la síntesis de esteres del colesterol y sea el AA uno de los ácidos grasos preferentes para esta esterificación. En cuanto a LPCAT1 tiene preferencia como sustrato a las lisofosfatidilcolinas (PC) frente a los demás lisofosfolípidos y las cadenas de tamaño medio de acil-CoA saturadas (C6-C14) como donante de acilo, como el palmitato, quedando manifiesta su importancia en el remodelado de la DPPC del material surfactante (Chen et al., 2006; Nakanishi et al., 2006). Sin duda una reducción tan importante en la expresión de LPCAT1 en  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  debe afectar a la producción de la DPPC en los pneumocitos tipo II. En este sentido comprobamos en nuestro análisis de la composición del material surfactante que el componente principal, DPPC, experimenta una ligera caída (Tabla 4).

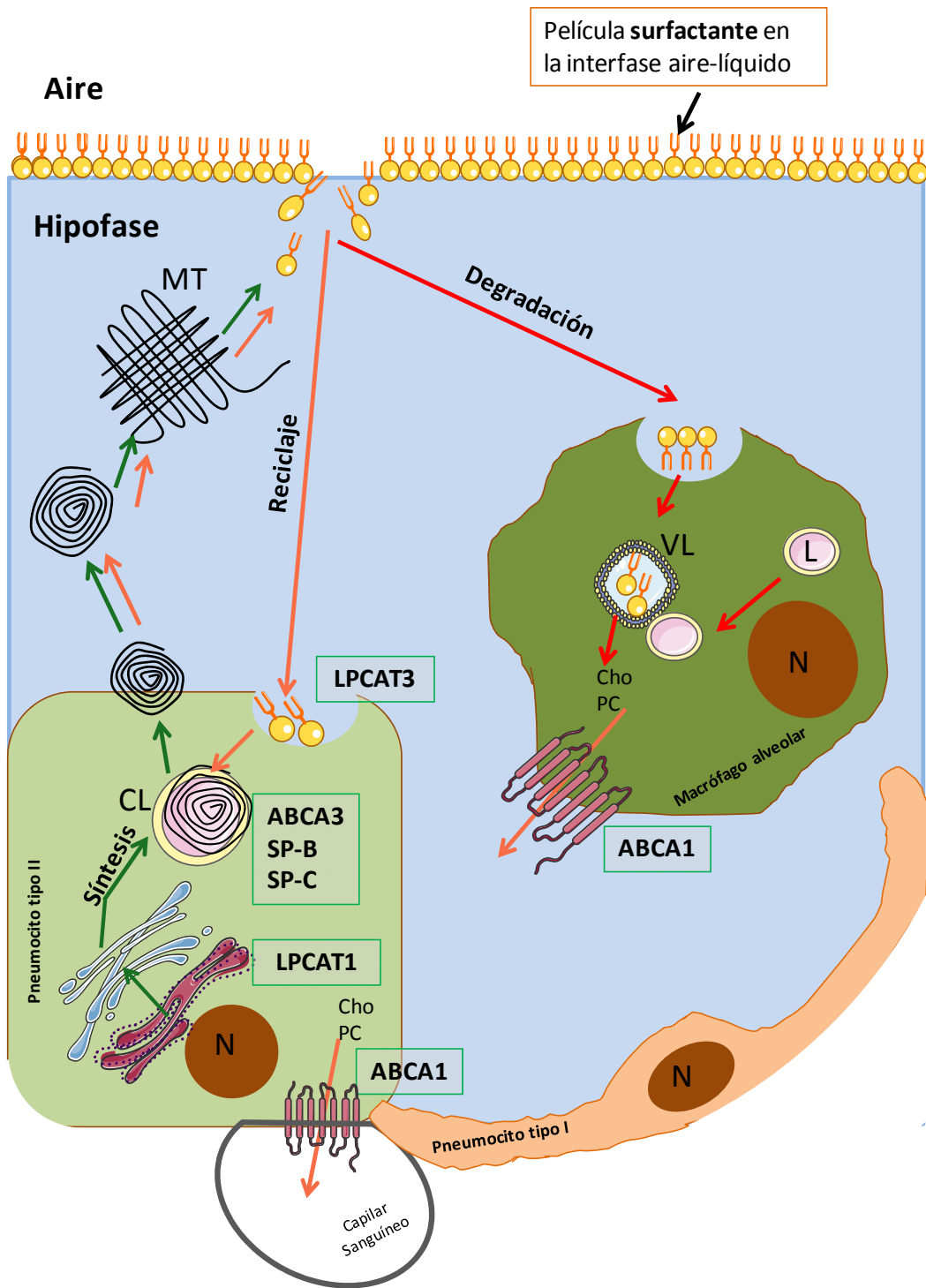


---

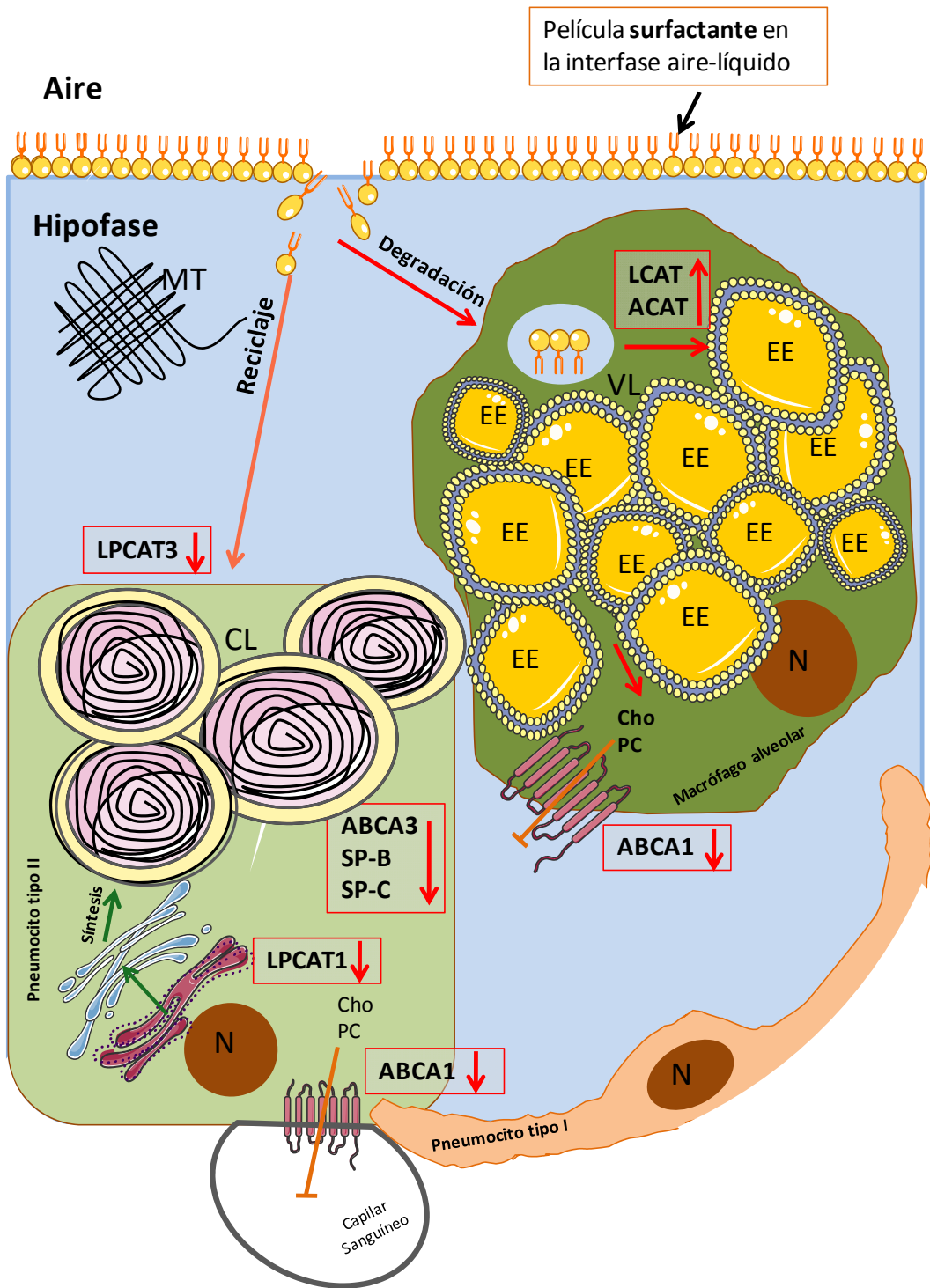
Estos cambios en el BALF del animal LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>, sumados a los anteriormente citados, en cuanto a la relación LNT/LPT (lípidos neutros totales/lípidos polares totales) y a los niveles de fosfatidilglicerol (PG) (Tabla 4), apuntan a que los ratones LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> puedan estar sufriendo cierto grado de hipoxia, si bien, la composición global del material surfactante debe ser lo suficientemente equilibrada para que los animales sean capaces, aunque no sabemos en que condiciones, de ventilar sus pulmones y en definitiva, respirar.

En resumen, en este trabajo de tesis doctoral los resultados expuestos aportan nuevos conocimientos sobre la implicación de la regulación dependiente de LXR en la fisiología pulmonar. En concreto, el estudio detallado de los principales tipos celulares involucrados en la síntesis, reciclaje y degradación del material surfactante, así como de su composición lipídica, han puesto de manifiesto que la alteración en la expresión de varios genes implicados en estas funciones, algunos bajo control de LXR, afectan profundamente a estos procesos.

Modelo propuesto ilustrado en las páginas 120-121 y texto explicativo en la página 122.



**Figura 38. Metabolismo surfactante en los animales WT.** A través de la vía biosintética, la enzima LPCAT1, en el RE, es importante en la generación de DPPC del surfactante pulmonar. En la membrana de los cuerpos lamelares, se encuentran el transportador ABCA3, que gestiona la entrada y salida de especies lipídicas. En su interior, las proteínas SP-B y SPC se encargan de perturbar las altamente empaquetadas capas lipídicas de surfactante para una correcta extensión una vez se encuentren en la hipofase. La película surfactante puede ser reciclada (70-85% del total), en neumocito tipo II, LPCAT3 está implicada en este reciclaje reciclando fosfolípidos. Por otro lado, puede ser catabolizado por los macrófagos alveolares cuando el material surfactante deba ser eliminado. N, núcleo; CL, cuerpo lamelar; MT, mielina tubular; VL, vesícula lipídica; L, lisosoma; Cho, colesterol; PC, fosfolípidos; EE, esteres de esterol.



**Figura 39. Metabolismo surfactante en los animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ .** Los neumocitos tipos II  $LXR\alpha\beta^{-/-}$  aumentan su volumen celular y presentan cuerpos lamelares aberrantes en su citoplasma. Esto se puede deber, en parte, a la deficiencia en la expresión de  $ABCA3$ ,  $SP-B$  y  $SP-C$  importantes en la gestión de las especies lipídicas en los cuerpos lamelares. Además hemos visto que las lisofosfatidil aciltransferasas  $LPCAT1$  y  $LPCAT3$ , esta última bajo control de  $LXR$ , también se expresan menos, y son muy importantes en el reciclaje de los fosfolípidos del material surfactante. Los macrófagos alveolares se convierten en células espumosas, acumulando vacuolas lipídicas en el citoplasma. N, núcleo; CL, cuerpo lamelar; MT, mielina tubular; VL, vesícula lipídica; L, lisosoma; Cho, colesterol; PC, fosfolípidos EE, esteres de estero.

### **Propuesta de modelo del papel de LXR en la fisiología del pulmón**

El fenotipo pulmonar mostrado por los animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ , revela que estos ratones presentan severas alteraciones en el metabolismo lipídico. Los dos tipos celulares estudiados, pneumocito tipo II y macrófago alveolar, presentan serios cambios morfológicos y bioquímicos. La incapacidad de los macrófagos alveolares para catabolizar los lípidos, promueve su acumulación en el espacio alveolar, y en consecuencia puede suponer una mayor carga para la vía del reciclaje por parte del pneumocito tipo II. Con los datos expuestos podemos concluir que, si bien ambos tipos celulares se encuentran alterados en los animales  $LXR\alpha\beta^{-/-}$ , el macrófago alveolar no parece jugar un papel primordial. Por su parte, es posible que los pneumocitos tipo II, en gran parte debido a una menor expresión en los genes fundamentales en la gestión y reciclaje del material surfactante, no sean capaces de llevar a cabo esta labor correctamente.

# **CONCLUSIONES**



---

## CONCLUSIONES

Las principales conclusiones extraídas de los resultados obtenidos en este trabajo son:

- 1 Los animales LXR $\alpha\beta$ -/- desarrollan una enfermedad pulmonar inflamatoria progresiva y dependiente de la edad, que se caracteriza por inflamación, lipidosis, acumulación de células inmunes y fibrosis, y que en muchos aspectos recuerda a la proteinosis alveolar pulmonar.
- 2 A nivel celular, los principales tipos celulares afectados en el pulmón del animal LXR $\alpha\beta$ -/- son, el macrófago alveolar, que aumenta su número y tamaño, transformándose en una célula espumosa, y el pneumocito tipo II, que se presenta hipertrófico y con cuerpos lamelares aberrantes.
- 3 Los receptores LXR se encuentran transcripcionalmente activos en el pulmón. La ausencia de LXR en estas células modifica la expresión de genes relacionados con, el establecimiento de un proceso inflamatorio, el metabolismo lipídico y la homeostasis del material surfactante.
- 4 La deficiencia de los receptores LXR, provoca, por un lado, la formación y acumulación de inclusiones lipídicas en el macrófago alveolar, desplazando el contenido en fosfolípidos proveniente del catabolismo del material surfactante. Y por otro, en el pneumocito tipo II, provoca una alteración en la expresión de los genes que codifican para proteínas que componen dicho material.
- 5 El rasgo fenotípico más llamativo que desarrollan los pulmones LXR $\alpha\beta$ -/- es la lipidosis, en concreto, se detecta una marcada esteatosis o acumulación de ésteres del colesterol, tanto en el tejido pulmonar como en el fluido broncoalveolar. Los pulmones presentan, además, un perfil lipídico aberrante, que debiera de afectar a las propiedades biofísicas del material surfactante y a las capacidades pulmonares de los animales LXR $\alpha\beta$ -/-.
- 6 Los experimentos de trasplante de médula ósea, demuestran que la alteración provocada por la ausencia de LXR en el macrófago alveolar, contribuye, pero no es la causa, del fenotipo pulmonar en el animal LXR $\alpha\beta$ -/-, y en consecuencia, que otros tipos celulares no provenientes de la médula ósea, como el pneumocito tipo II, contribuyen a desencadenar este fenotipo.
- 7 Mediante el uso de un modelo in vitro de co-cultivo de células MLE-12 con fluido broncoalveolar procedente de animales LXR $\alpha\beta$ -/-, pudimos demostrar que la actividad de LXR es importante para la captación de especies lipídicas por parte del pneumocitos tipo II. La inhibición de la actividad de LXR, podría provocar una utilización deficiente del material surfactante, y por ende, promover la acumulación de su contenido lipídico, congestionando el espacio alveolar.
- 8 El aislamiento de los pneumocitostipo II del pulmón de animales LXR $\alpha\beta$ -/- permitió detectar defectos en la expresión de los genes ABCA1, ABCG1, SREBP-1c, LPCAT1, LPCAT3,

SP-B, SP-C y ABCA3. Es muy probable que estas alteraciones transcripcionales se traduzcan en cambios en el contenido del material surfactante, lo que supondría una modificación de sus propiedades tensoactivas.



# **BIBLIOGRAFÍA**



- 
- A-Gonzalez, N., Bensinger, S. J., Hong, C., Beceiro, S., Michelle, N., Zelcer, N., ... Castrillo, A. (2010). Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of LXR. *Immunity*, *31*(2), 245–258. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.018. Apoptotic
- A-Gonzalez, N., Guillen, J. a, Gallardo, G., Diaz, M., de la Rosa, J. V, Hernandez, I. H., ... Castrillo, A. (2013). The nuclear receptor LXR $\alpha$  controls the functional specialization of splenic macrophages. *Nature Immunology*, (June). doi:10.1038/ni.2622
- Amin, R. S., Wert, S. E., Baughman, R. P., Tomashefski, J. F., Noguee, L. M., Brody, A. S., ... Whitsett, J. A. (2001). Surfactant protein deficiency in familial interstitial lung disease. *The Journal of Pediatrics*, *139*(1), 85–92. doi:10.1067/mpd.2001.114545
- Baldán, A., Gomes, A. V, Ping, P., & Edwards, P. a. (2008). Loss of ABCG1 results in chronic pulmonary inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *180*(5), 3560–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292583>
- Baldán, A., Tarr, P., Vales, C. S., Frank, J., Shimotake, T. K., Hawgood, S., & Edwards, P. a. (2006). Deletion of the transmembrane transporter ABCG1 results in progressive pulmonary lipodosis. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(39), 29401–10. doi:10.1074/jbc.M606597200
- Ban, N., Matsumura, Y., Sakai, H., Takanezawa, Y., Sasaki, M., Arai, H., & Inagaki, N. (2007). ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(13), 9628–34. doi:10.1074/jbc.M611767200
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., ... Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, *18*, 767–811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767
- Batenburg, J. J. (1992). Surfactant phospholipids : synthesis and storage Surfactant phospholipids : synthesis. *American Journal of Physiology-Lung and Celular and Molecular Physiology*.
- Batenburg, J. J., & Haagsman, H. P. (1998). The lipids of pulmonary surfactant: dynamics and interactions with proteins. *Progress in Lipid Research*, *37*(4), 235–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10193527>
- Besnard, V., Xu, Y., & Whitsett, J. a. (2007). Sterol response element binding protein and thyroid transcription factor-1 (Nkx2.1) regulate Abca3 gene expression. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *293*(6), L1395–405. doi:10.1152/ajplung.00275.2007
- Bienenstock, J., & Befus, A. D. (1980). Mucosal immunology. *Immunology*, *41*(2), 249–70. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1458175&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Birrell, M. a, Catley, M. C., Hardaker, E., Wong, S., Willson, T. M., McCluskie, K., ... Belvisi, M. G. (2007). Novel role for the liver X nuclear receptor in the suppression of lung inflammatory responses. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(44), 31882–90. doi:10.1074/jbc.M703278200
-

- Blau, H., Riklis, S., Van Iwaarden, J. F., McCormack, F. X., & Kalina, M. (1997). Nitric oxide production by rat alveolar macrophages can be modulated in vitro by surfactant protein A. *The American Journal of Physiology*, 272(6 Pt 1), L1198–204. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9227523>
- Borron, P., McIntosh, J. C., Korfhagen, T. R., Whitsett, J. A., Taylor, J., & Wright, J. R. (2000). Surfactant-associated protein A inhibits LPS-induced cytokine and nitric oxide production in vivo. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 278(4), L840–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10749762>
- Botas, C., Poulain, F., Akiyama, J., Brown, C., Allen, L., Goerke, J., ... Hawgood, S. (1998). Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20), 11869–74. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21732&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Brasch, F., Johnen, G., Winn-Brasch, A., Guttentag, S. H., Schmiel, A., Kapp, N., ... Ochs, M. (2004). Surfactant protein B in type II pneumocytes and intra-alveolar surfactant forms of human lungs. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 30(4), 449–58. doi:10.1165/rcmb.2003-0262OC
- Brasch, F., Ten Brinke, A., Johnen, G., Ochs, M., Kapp, N., Müller, K. M., ... Bühling, F. (2002). Involvement of cathepsin H in the processing of the hydrophobic surfactant-associated protein C in type II pneumocytes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 26(6), 659–70. doi:10.1165/ajrcmb.26.6.4744
- Bridges, J. P., Ikegami, M., Brill, L. L., Chen, X., Mason, R. J., & Shannon, J. M. (2010). LPCAT1 regulates surfactant phospholipid synthesis and is required for transitioning to air breathing in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(5). doi:10.1172/JCI38061.1736
- Brussino, L., Badiu, I., Sciascia, S., Bugiani, M., Heffler, E., Guida, G., ... Rolla, G. (2010). Oxidative stress and airway inflammation after allergen challenge evaluated by exhaled breath condensate analysis. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 40(11), 1642–7. doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03604.x
- Butler, P. L., & Mallampalli, R. K. (2010). Cross-talk between remodeling and de novo pathways maintains phospholipid balance through ubiquitination. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(9), 6246–58. doi:10.1074/jbc.M109.017350
- Cao, G., Liang, Y., Broderick, C. L., Oldham, B. A., Beyer, T. P., Schmidt, R. J., ... Etgen, G. J. (2003). Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 1131–6. doi:10.1074/jbc.M210208200
- Cardoso, W. V., & Kotton, D. N. (2008). Specification and patterning of the respiratory system. *StemBook*, 1–18. doi:10.3824/stembook.1.10.1

- 
- Castrillo, A., Joseph, S. B., Marathe, C., Mangelsdorf, D. J., & Tontonoz, P. (2003). Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(12), 10443–9. doi:10.1074/jbc.M213071200
- Castrillo, A., & Tontonoz, P. (2004). Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 455–80. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.012103.134432
- Chander, A., & Fisher, A. B. (1990). Regulation of lung surfactant secretion. *The American Journal of Physiology*, 258(6 Pt 1), L241–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2163206>
- Chawla, a, Repa, J. J., Evans, R. M., & Mangelsdorf, D. J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5548), 1866–70. doi:10.1126/science.294.5548.1866
- Chen, J. W., Dodia, C., Feinstein, S. I., Jain, M. K., & Fisher, A. B. (2000). 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(37), 28421–7. doi:10.1074/jbc.M005073200
- Chen, X., Hyatt, B. a, Mucenski, M. L., Mason, R. J., & Shannon, J. M. (2006). Identification and characterization of a lysophosphatidylcholine acyltransferase in alveolar type II cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(31), 11724–9. doi:10.1073/pnas.0604946103
- Cheong, N., Zhang, H., Madesh, M., Zhao, M., Yu, K., Dodia, C., ... Shuman, H. (2007). ABCA3 is critical for lamellar body biogenesis in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 23811–7. doi:10.1074/jbc.M703927200
- Clark, J. C., Wert, S. E., Bachurski, C. J., Stahlman, M. T., Stripp, B. R., Weaver, T. E., & Whitsett, J. a. (1995). Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17), 7794–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=41232&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Conkright, J. J., Apsley, K. S., Martin, E. P., Ridsdale, R., Rice, W. R., Na, C.-L., ... Weaver, T. E. (2010). Nedd4-2-mediated ubiquitination facilitates processing of surfactant protein-C. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 42(2), 181–9. doi:10.1165/rcmb.2009-0058OC
- Cosgrove, J. P., Church, D. F., & Pryor, W. A. (1987). The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 22(5), 299–304. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3600206>
- Crouch, E. (1998a). Collectins and pulmonary host defense. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 19(2), 177–201. doi:10.1165/ajrcmb.19.2.140
-

- Crouch, E. (1998b). Structure, biologic properties, and expression of surfactant protein D (SP-D). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1408(2-3), 278–89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9813367>
- Crouch, E., & Wright, J. R. (2001). Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annual Review of Physiology*, 63, 521–54. doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.521
- Dalen, K. T., Ulven, S. M., Bamberg, K., Gustafsson, J.-A., & Nebb, H. I. (2003). Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 48283–91. doi:10.1074/jbc.M302287200
- Den Breejen, J. N., Batenburg, J. J., & van Golde, L. M. (1989). The species of acyl-CoA in subcellular fractions of type II cells isolated from adult rat lung and their incorporation into phosphatidic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1002(3), 277–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2713380>
- Dietl, P., & Haller, T. (2005). Exocytosis of lung surfactant: from the secretory vesicle to the air-liquid interface. *Annual Review of Physiology*, 67(10), 595–621. doi:10.1146/annurev.physiol.67.040403.102553
- Dobbs, L. G., & Gonzalez, R. F. (2002). Isolation and Culture of Pulmonary Alveolar Epithelial Type II Cells, 8, 277–301.
- Elliott, M. R., Chekeni, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A., Walk, S. F., ... Ravichandran, K. S. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, 461(7261), 282–6. doi:10.1038/nature08296
- Ferguson, J. S., Voelker, D. R., McCormack, F. X., & Schlesinger, L. S. (1999). Surfactant protein D binds to Mycobacterium tuberculosis bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(1), 312–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10384130>
- Filgueiras, O. M., & Possmayer, F. (1990). Purification and characterization of a phospholipase A2 associated with rabbit lung microsomes: some evidence for its mitochondrial origin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1046(3), 258–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2223865>
- Fisher, A. B., & Dodia, C. (2001). Lysosomal-type PLA2 and turnover of alveolar DPPC. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 280(4), L748–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238016>
- Fitzgerald, M. L., Xavier, R., Haley, K. J., Welti, R., Goss, J. L., Brown, C. E., ... Freeman, M. W. (2007). ABCA3 inactivation in mice causes respiratory failure, loss of pulmonary surfactant, and depletion of lung phosphatidylglycerol. *Journal of Lipid Research*, 48(3), 621–32. doi:10.1194/jlr.M600449-JLR200
- Forman, B. M., Ruan, B., Chen, J., Schroepfer, G. J., & Evans, R. M. (1997). The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- 
- America*, 94(20), 10588–93. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=23411&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Foster, C., Aktar, A., Kopf, D., Zhang, P., & Guttentag, S. (2004). Pepsinogen C: a type 2 cell-specific protease. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286(2), L382–7. doi:10.1152/ajplung.00310.2003
- Fowler, A. J., Sheu, M. Y., Schmutz, M., Kao, J., Fluhr, J. W., Rhein, L., ... Feingold, K. R. (2003). Liver X receptor activators display anti-inflammatory activity in irritant and allergic contact dermatitis models: liver-X-receptor-specific inhibition of inflammation and primary cytokine production. *The Journal of Investigative Dermatology*, 120(2), 246–55. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12033.x
- Ganter, C. C., Ganter, C. G., Jakob, S. M., & Takala, J. (2006). Pulmonary capillary pressure. A review. *Minerva Anestesiologica*, 72(1-2), 21–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407804>
- Garmany, T. H., Moxley, M. A., White, F. V., Dean, M., Hull, W. M., Whitsett, J. A., ... Hamvas, A. (2006). Surfactant composition and function in patients with ABCA3 mutations. *Pediatric Research*, 59(6), 801–5. doi:10.1203/01.pdr.0000219311.14291.df
- Ghisletti, S., Huang, W., Ogawa, S., Pascual, G., Lin, M., Willson, T. M., ... Glass, C. K. (2008). Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPAR $\gamma$ . *Molecular Cell*, 25(1), 57–70.
- Glass, C. K. (2006). Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(3). doi:10.1172/JCI27913.556
- Glass, C. K., & Saijo, K. (2010). Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(5), 365–376. doi:10.1038/nri2748
- Glasser, S. W., Senft, A. P., Whitsett, J. a, Maxfield, M. D., Ross, G. F., Richardson, T. R., ... Korfhagen, T. R. (2008). Macrophage dysfunction and susceptibility to pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in surfactant protein C-deficient mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(1), 621–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18566429>
- Glasser, S. W., Witt, T. L., Senft, A. P., Baatz, J. E., Folger, D., Maxfield, M. D., ... Korfhagen, T. R. (2009). Surfactant protein C-deficient mice are susceptible to respiratory syncytial virus infection. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 297(1), L64–72. doi:10.1152/ajplung.90640.2008
- Gobran, L. I., Xu, Z. X., & Rooney, S. A. (1998). PKC isoforms and other signaling proteins involved in surfactant secretion in developing rat type II cells. *The American Journal of Physiology*, 274(6 Pt 1), L901–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9609728>
-

- 
- Goerke, J. (1998). Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1408(2-3), 79–89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9813251>
- Gong, H., He, J., Lee, J. H., Mallick, E., Gao, X., Li, S., ... Xie, W. (2009). Activation of the liver X receptor prevents lipopolysaccharide-induced lung injury. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(44), 30113–21. doi:10.1074/jbc.M109.047753
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews. Immunology*, 5(12), 953–64. doi:10.1038/nri1733
- Günther, A., Ruppert, C., Schmidt, R., Markart, P., Grimminger, F., Walmrath, D., & Seeger, W. (2001). Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. *Respiratory Research*, 2(6), 353–64. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=64803&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Guo, L., Johnson, R. S., & Schuh, J. C. (2000). Biochemical Characterization of Endogenously Formed Eosinophilic Crystals in the Lungs of Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 275(11), 8032–8037. doi:10.1074/jbc.275.11.8032
- Haagsman, H. P., Sargeant, T., Hauschka, P. V, Benson, B. J., & Hawgood, S. (1990). Binding of calcium to SP-A, a surfactant-associated protein. *Biochemistry*, 29(38), 8894–900. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2271565>
- Haagsman, H. P., White, R. T., Schilling, J., Lau, K., Benson, B. J., Golden, J., ... Clements, J. A. (1989). Studies of the structure of lung surfactant protein SP-A. *The American Journal of Physiology*, 257(6 Pt 1), L421–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2610270>
- Hartshorn, K. L., Crouch, E., White, M. R., Colamussi, M. L., Kakkanatt, A., Tauber, B., ... Sastry, K. N. (1998). Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria. *The American Journal of Physiology*, 274(6 Pt 1), L958–69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9609735>
- Hartshorn, K. L., Crouch, E., White, M. R., Eggleton, P., Tauber, A. I., Chang, D., & Sastry, K. (1994). Evidence for a protective role of pulmonary surfactant protein D (SP-D) against influenza A viruses. *The Journal of Clinical Investigation*, 94(1), 311–9. doi:10.1172/JCI117323
- Hartshorn, K. L., White, M. R., Shepherd, V., Reid, K., Jensenius, J. C., & Crouch, E. (1997). Mechanisms of anti-influenza activity of surfactant proteins A and D: comparison with serum collectins. *The American Journal of Physiology*, 273(6 Pt 1), L1156–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9435570>
- Haslett, C. (1999). Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160(5 Pt 2), S5–11. doi:10.1164/ajrccm.160.supplement\_1.4
-



- 
- Haven, N., Rooney, S. A., Young, L., & Mendelson, C. R. (1994). Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.
- Hawgood, S., Ochs, M., Jung, A., Akiyama, J., Allen, L., Brown, C., ... Poulain, F. R. (2002). Sequential targeted deficiency of SP-A and -D leads to progressive alveolar lipoproteinosis and emphysema. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283(5), L1002–10. doi:10.1152/ajplung.00118.2002
- Herzog, E. L., Brody, A. R., Colby, T. V, Mason, R., & Williams, M. C. (2008). Knowns and unknowns of the alveolus. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(7), 778–82. doi:10.1513/pats.200803-028HR
- Hickling, T. P., Sim, R. B., & Malhotra, R. (1998). Induction of TNF-alpha release from human buffy coat cells by *Pseudomonas aeruginosa* is reduced by lung surfactant protein A. *FEBS Letters*, 437(1-2), 65–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804173>
- Hindinger, C., Hinton, D. R., Kirwin, S. J., Atkinson, R. D., Burnett, M. E., Bergmann, C. C., & Stohman, S. A. (2006). Liver X receptor activation decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience Research*, 84(6), 1225–34. doi:10.1002/jnr.21038
- Huffnagle, G. B., Boyd, M. B., Street, N. E., & Lipscomb, M. F. (1998). IL-5 is required for eosinophil recruitment, crystal deposition, and mononuclear cell recruitment during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection in genetically susceptible mice (C57BL/6). *The Journal of Immunology*, 160, 2393–2400.
- Ikegami, M., Korfhagen, T. R., Bruno, M. D., Whitsett, J. A., & Jobe, A. H. (1997). Surfactant metabolism in surfactant protein A-deficient mice. *The American Journal of Physiology*, 272(3 Pt 1), L479–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9124605>
- Ikegami, M., Korfhagen, T. R., Whitsett, J. A., Bruno, M. D., Wert, S. E., Wada, K., & Jobe, A. H. (1998). Characteristics of surfactant from SP-A-deficient mice. *The American Journal of Physiology*, 275(2 Pt 1), L247–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9700084>
- Ikegami, M., Na, C.-L., Korfhagen, T. R., & Whitsett, J. a. (2005). Surfactant protein D influences surfactant ultrastructure and uptake by alveolar type II cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 288(3), L552–61. doi:10.1152/ajplung.00142.2004
- Ishibashi, M., Varin, A., Filomenko, R., Lopez, T., Athias, A., Gambert, P., ... Masson, D. (2013). Liver x receptor regulates arachidonic acid distribution and eicosanoid release in human macrophages: a key role for lysophosphatidylcholine acyltransferase 3. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(6), 1171–9. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300812
- Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R., & Mangelsdorf, D. J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*, 383(6602), 728–31. doi:10.1038/383728a0
-

- Jenkins, R. W., Canals, D., & Hannun, Y. A. (2009). Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cellular Signalling*, 21(6), 836–46. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3488588&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Johansson, J., & Curstedt, T. (1997). Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 244(3), 675–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9108235>
- Joseph, S. B., Bradley, M. N., Castrillo, A., Bruhn, K. W., Mak, P. A., Pei, L., ... Tontonoz, P. (2004). LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell*, 119(2), 299–309. doi:10.1016/j.cell.2004.09.032
- Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. a, Mangelsdorf, D. J., & Tontonoz, P. (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nature Medicine*, 9(2), 213–9. doi:10.1038/nm820
- Joseph, S. B., Laffitte, B. A., Patel, P. H., Watson, M. A., Matsukuma, K. E., Walczak, R., ... Tontonoz, P. (2002). Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(13), 11019–25. doi:10.1074/jbc.M111041200
- Joseph, S. B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M. A., Collins, A. R., Laffitte, B. A., ... Tontonoz, P. (2002). Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7604–9. doi:10.1073/pnas.112059299
- Kabha, K., Schmegner, J., Keisari, Y., Parolis, H., Schlepper-Schaeffer, J., & Ofek, I. (1997). SP-A enhances phagocytosis of Klebsiella by interaction with capsular polysaccharides and alveolar macrophages. *The American Journal of Physiology*, 272(2 Pt 1), L344–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9124386>
- Kalina, M., Blau, H., Riklis, S., & Kravtsov, V. (1995). Interaction of surfactant protein A with bacterial lipopolysaccharide may affect some biological functions. *The American Journal of Physiology*, 268(1 Pt 1), L144–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7840221>
- Kennedy, E., & Weiss, S. (1956). The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *The Journal of Biological Chemistry*, 1(222), 193–214.
- Kliwer, S. a. (1999). Orphan Nuclear Receptors: Shifting Endocrinology into Reverse. *Science*, 284(5415), 757–760. doi:10.1126/science.284.5415.757
- Knapp, S., Leemans, J. C., Florquin, S., Branger, J., Maris, N. a, Pater, J., ... van der Poll, T. (2003). Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167(2), 171–9. doi:10.1164/rccm.200207-698OC
- Korf, H., Beken, S. Vander, Romano, M., Steffensen, K. R., Stijlemans, B., Gustafsson, J.-åke, ... Huygen, K. (2009). Liver X receptors contribute to the protective immune response against

- 
- Mycobacterium tuberculosis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6). doi:10.1172/JCI35288.1626
- Korfhagen, T. R., Bruno, M. D., Ross, G. F., Huelsman, K. M., Ikegami, M., Jobe, A. H., ... Whitsett, J. A. (1996). Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9594–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38473&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Korfhagen, T. R., LeVine, A. M., & Whitsett, J. A. (1998). Surfactant protein A (SP-A) gene targeted mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1408(2-3), 296–302. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9813377>
- Kosmider, B., Messier, E. M., Chu, H. W., & Mason, R. J. (2011). Human alveolar epithelial cell injury induced by cigarette smoke. *PLoS One*, 6(12), e26059. doi:10.1371/journal.pone.0026059
- Kulmacz, R. J. (1998). Cellular regulation of prostaglandin H synthase catalysis. *FEBS Letters*, 430(3), 154–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9688529>
- Kuroki, Y., & Akino, T. (1991). Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(5), 3068–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1993679>
- Kuroki, Y., Gasa, S., Ogasawara, Y., Makita, A., & Akino, T. (1992). Binding of pulmonary surfactant protein A to galactosylceramide and asialo-GM2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 299(2), 261–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1444464>
- Kuroki, Y., Gasa, S., Ogasawara, Y., Shiratori, M., Makita, A., & Akino, T. (1992). Binding specificity of lung surfactant protein SP-D for glucosylceramide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 187(2), 963–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1530650>
- Laffitte, B. A., Chao, L. C., Li, J., Walczak, R., Hummasti, S., Joseph, S. B., ... Tontonoz, P. (2003). Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5419–24. doi:10.1073/pnas.0830671100
- Laffitte, B., Repa, J., Joseph, S., Wilpitz, D., Kast, H., Mangelsdorf, D. J., & Tontonoz, P. (2001). LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(2), 507–12. doi:10.1073/pnas.021488798
- Lands, W. (1958). Metabolism of glycerolipides; a comparison of lecithin and triglyceride synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 231(2), 883–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13539023>
-

- 
- Lauber, K., Blumenthal, S. G., Waibel, M., & Wesselborg, S. (2004). Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Molecular Cell*, *14*(3), 277–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15125832>
- Lauber, K., Bohn, E., Kröber, S. M., Xiao, Y., Blumenthal, S. G., Lindemann, R. K., ... Wesselborg, S. (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*, *113*(6), 717–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809603>
- Lehmann, J. M., Kliewer, S. A., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Oliver, B. B., Su, J. L., ... Willson, T. M. (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(6), 3137–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013544>
- Levin, N., Bischoff, E. D., Daige, C. L., Thomas, D., Vu, C. T., Heyman, R. A., ... Schulman, I. G. (2005). Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *25*(1), 135–42. doi:10.1161/01.ATV.0000150044.84012.68
- Lim, B. L., Wang, J. Y., Holmskov, U., Hoppe, H. J., & Reid, K. B. (1994). Expression of the carbohydrate recognition domain of lung surfactant protein D and demonstration of its binding to lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *202*(3), 1674–80. doi:10.1006/bbrc.1994.2127
- Listenberger, L. L., & Brown, D. A. (2007). Fluorescent detection of lipid droplets and associated proteins. *Current Protocols in Cell Biology / Editorial Board, Juan S. Bonifacino ... [et Al.], Chapter 24, Unit 24.2*. doi:10.1002/0471143030.cb2402s35
- Lorenz, R. (1966). Weibel, E. R.: Morphometry of the Human Lung. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963; 151 S., 109 Abb., DM 36,-. *Biometrische Zeitschrift*, *8*(1-2), 143–144. doi:10.1002/bimj.19660080155
- Maeda, Y., Davé, V., & Whitsett, J. A. (2007). Transcriptional Control of Lung Morphogenesis, 219–244. doi:10.1152/physrev.00028.2006.
- Maina, J. N., & West, J. B. (2005). Thin and Strong ! The Bioengineering Dilemma in the Structural and Functional Design of the Blood-Gas Barrier, (91), 811–844. doi:10.1152/physrev.00022.2004.
- Mak, P. A., Laffitte, B. A., Desrumaux, C., Joseph, S. B., Curtiss, L. K., Mangelsdorf, D. J., ... Edwards, P. A. (2002). Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(35), 31900–8. doi:10.1074/jbc.M202993200
- Mangelsdorf, D. J., & Evans, R. M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, *83*(6), 841–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521508>
- Mason, R. J., & Nellenbogen, J. (1984). Synthesis of saturated phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol by freshly isolated rat alveolar type II cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, *794*(3), 392–402. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6743672>
-

- 
- Mason, R. J., & Voelker, D. R. (1998). Regulatory mechanisms of surfactant secretion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1408(2-3), 226–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9813343>
- Matthay, M. A., Fukuda, N., Frank, J., Kallet, R., Daniel, B., & Sakuma, T. (2000). Alveolar epithelial barrier. Role in lung fluid balance in clinical lung injury. *Clinics in Chest Medicine*, 21(3), 477–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11019721>
- Matute-Bello, G., Lee, J. S., Frevert, C. W., Liles, W. C., Sutlief, S., Ballman, K., ... Martin, T. R. (2004). Optimal timing to repopulation of resident alveolar macrophages with donor cells following total body irradiation and bone marrow transplantation in mice. *Journal of Immunological Methods*, 292(1-2), 25–34. doi:10.1016/j.jim.2004.05.010
- McNeish, J., Aiello, R. J., Guyot, D., Turi, T., Gabel, C., Aldinger, C., ... Francone, O. L. (2000). High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 4245–50. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=18215&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mendelson, C. R., & Boggaram, V. (1991). Hormonal control of the surfactant system in fetal lung. *Annual Review of Physiology*, 53, 415–40. doi:10.1146/annurev.ph.53.030191.002215
- Messier, E. M., Mason, R. J., & Kosmider, B. (2012). Efficient and rapid isolation and purification of mouse alveolar type II epithelial cells. *Experimental Lung Research*, 38(7), 363–73. doi:10.3109/01902148.2012.713077
- Mitchell, J. A., Larkin, S., & Williams, T. J. (1995). Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochemical Pharmacology*, 50(10), 1535–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7503754>
- Mitro, N., Mak, P. A., Vargas, L., Godio, C., Hampton, E., Molteni, V., ... Saez, E. (2007). The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature*, 445(7124), 219–23. doi:10.1038/nature05449
- Miyazaki, T., Hirokami, Y., Matsushashi, N., Takatsuka, H., & Naito, M. (1999). Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(2), 413–22. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192994&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Momoeda, K., Hirota, K., Utsuki, T., Tsuchida, Y., Hanaoka, K., & Iwamori, M. (1996). Developmental changes of neutral glycosphingolipids as receptors for pulmonary surfactant protein SP-A in the alveolar epithelium of murine lung. *Journal of Biochemistry*, 119(6), 1189–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8827457>
- Mulugeta, S., Gray, J. M., Notarfrancesco, K. L., Gonzales, L. W., Koval, M., Feinstein, S. I., ... Shuman, H. (2002). Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22147–55. doi:10.1074/jbc.M201812200
-

- Nakanishi, H., Shindou, H., Hishikawa, D., Harayama, T., Ogasawara, R., Suwabe, A., ... Shimizu, T. (2006). Cloning and characterization of mouse lung-type acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1). Expression in alveolar type II cells and possible involvement in surfactant production. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(29), 20140–7. doi:10.1074/jbc.M600225200
- Naureckas, E. T., Hershenson, M. B., Abe, M. K., Kelleher, M. D., Florio, C., Heisler, S. I., ... Solway, J. (1995). Bronchoalveolar lavage fluid from immature rats with hyperoxia-induced airway remodeling is mitogenic for airway smooth muscle. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 12(3), 268–74. doi:10.1165/ajrcmb.12.3.7873192
- Naureckas, E. T., Ndukwu, I. M., Halayko, a J., Maxwell, C., Hershenson, M. B., & Solway, J. (1999). Bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic subjects is mitogenic for human airway smooth muscle. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160(6), 2062–6. doi:10.1164/ajrccm.160.6.9903131
- O'Brien, A. D., Standiford, T. J., Christensen, P. J., Wilcoxon, S. E., & Paine, R. (1998). Chemotaxis of alveolar macrophages in response to signals derived from alveolar epithelial cells. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 131(5), 417–424. doi:10.1016/S0022-2143(98)90142-1
- O'Regan, A. (2003). The Role of osteopontin in lung disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 14(6), 479–488. doi:10.1016/S1359-6101(03)00055-8
- Ogasawara, Y., Kuroki, Y., & Akino, T. (1992). Pulmonary surfactant protein D specifically binds to phosphatidylinositol. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(29), 21244–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1400434>
- Osanai, K., Mason, R. J., & Voelker, D. R. (2001). Pulmonary surfactant phosphatidylcholine transport bypasses the brefeldin A sensitive compartment of alveolar type II cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1531(3), 222–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325613>
- Osanai, K., Tsuchihara, C., Hatta, R., Oikawa, T., Tsuchihara, K., Iguchi, M., ... Toga, H. (2006). Pulmonary surfactant transport in alveolar type II cells. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 11 Suppl, S70–3. doi:10.1111/j.1440-1843.2006.00813.x
- Peet, D. J., Turley, S. D., Ma, W., Janowski, B. a, Lobaccaro, J. M., Hammer, R. E., & Mangelsdorf, D. J. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*, 93(5), 693–704. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9630215>
- Pérez-Chacón, G., Astudillo, A. M., Ruipérez, V., Balboa, M. a, & Balsinde, J. (2010). Signaling role for lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 in receptor-regulated arachidonic acid reacylation reactions in human monocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(2), 1071–8. doi:10.4049/jimmunol.0902257
- Perez-Gil, J. (2010). El Sistema del Surfactante Pulmonar. *Investigación Y Ciencia*, 38–45.

- 
- Pérez-Gil, J. (2008). Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(7-8), 1676–95. doi:10.1016/j.bbamem.2008.05.003
- Pérez-Gil, J., & Keough, K. M. (1998). Interfacial properties of surfactant proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1408(2-3), 203–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9813327>
- Pérez-Gil, J., & Weaver, T. E. (2010). Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25(3), 132–41. doi:10.1152/physiol.00006.2010
- Plat, J., Nichols, J. A., & Mensink, R. P. (2005). Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *Journal of Lipid Research*, 46(11), 2468–76. doi:10.1194/jlr.M500272-JLR200
- Postle, A. D., Heeley, E. L., & Wilton, D. C. (2001). A comparison of the molecular species compositions of mammalian lung surfactant phospholipids. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 129(1), 65–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369534>
- Repa, J. J. (2000a). Regulation of Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers. *Science*, 289(5484), 1524–1529. doi:10.1126/science.289.5484.1524
- Repa, J. J. (2000b). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRBeta. *Genes & Development*, 14(22), 2819–2830. doi:10.1101/gad.844900
- Repa, J. J., Berge, K. E., Pomajzl, C., Richardson, J. A., Hobbs, H., & Mangelsdorf, D. J. (2002). Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18793–800. doi:10.1074/jbc.M109927200
- Repa, J. J., & Mangelsdorf, D. J. (2000). The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 459–81. doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.459
- Robinson-Rechavi, M., & Laudet, V. (2003). Bioinformatics of nuclear receptors. *Methods in Enzymology*, 364, 95–118. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14631841>
- Rong, X., Albert, C. J., Hong, C., Duerr, M. A., Chamberlain, B. T., Tarling, E. J., ... Tontonoz, P. (2013). LXRs regulate ER stress and inflammation through dynamic modulation of membrane phospholipid composition. *Cell Metabolism*, 18(5), 685–97. doi:10.1016/j.cmet.2013.10.002
- Rooney, S. a. (2001). Regulation of surfactant secretion. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 129(1), 233–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369548>
- Sasmono, R. T., & Williams, E. (2012). Generation and Characterization of MacGreen Mice, the Cfs1r-EGFP Transgenic Mice, 844, 157–176. doi:10.1007/978-1-61779-527-5
-

- Schelenz, S., Malhotra, R., Sim, R. B., Holmskov, U., & Bancroft, G. J. (1995). Binding of host collectins to the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*: human surfactant protein D acts as an agglutinin for acapsular yeast cells. *Infection and Immunity*, *63*(9), 3360–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=173462&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Schneeberger, E. E. (1978). Structural basis for some permeability properties of the air–blood barrier. *Federation Proceedings*, *37*(11), 2471–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/357179>
- Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., ... Shan, B. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes & Development*, *14*(22), 2831–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=317060&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Schürch, S., Green, F. H., & Bachofen, H. (1998). Formation and structure of surface films: captive bubble surfactometry. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1408*(2-3), 180–202. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9813315>
- Serrano, A. G., & Pérez-Gil, J. (2006). Protein-lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system. *Chemistry and Physics of Lipids*, *141*(1-2), 105–18. doi:10.1016/j.chemphyslip.2006.02.017
- Shapiro, S. D., & Senior, R. M. (1999). Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *20*(6), 1100–2. doi:10.1165/ajrcmb.20.6.f151
- Sharma, A. K., Fernandez, L. G., Awad, A. S., Kron, I. L., & Laubach, V. E. (2007). Proinflammatory response of alveolar epithelial cells is enhanced by alveolar macrophage-produced TNF- $\alpha$  during pulmonary ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *293*(1), L105–13. doi:10.1152/ajplung.00470.2006
- Shibata, Y., Berclaz, P. Y., Chroneos, Z. C., Yoshida, M., Whitsett, J. a, & Trapnell, B. C. (2001). GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity*, *15*(4), 557–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11672538>
- Shindou, H., Hishikawa, D., Harayama, T., Yuki, K., & Shimizu, T. (2009). Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research. *Journal of Lipid Research*, *50* Suppl, S46–51. doi:10.1194/jlr.R800035-JLR200
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, *150*(1), 76–85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7
- Smoak, K., Madenspacher, J., Jeyaseelan, S., Williams, B., Dixon, D., Poch, K. R., ... Fessler, M. B. (2008). Effects of liver X receptor agonist treatment on pulmonary inflammation and host defense. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *180*(5), 3305–12. Retrieved from



---

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2430066&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Stolley, J. M., Gong, D., Farley, K., Zhao, P., Cooley, J., Crouch, E. C., ... Remold-O'Donnell, E. (2012). Increased surfactant protein D fails to improve bacterial clearance and inflammation in serpinB1<sup>-/-</sup> mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *47*(6), 792–9. doi:10.1165/rcmb.2012-0145OC
- Stone, K. C., Mercer, R. R., Gehr, P., Stockstill, B., & Crapo, J. D. (1992). Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *6*(2), 235–43. doi:10.1165/ajrcmb/6.2.235
- Tabas, I. (1999). Secretory sphingomyelinase. *Chemistry and Physics of Lipids*, *102*(1-2), 123–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001566>
- Takamoto, M., Ovington, K. S., Behm, C. A., Sugane, K., Young, I. G., & Matthaei, K. I. (1997). Eosinophilia, parasite burden and lung damage in *Toxocara canis* infection in C57Bl/6 mice genetically deficient in IL-5. *Immunology*, *90*(4), 511–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1456701&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tangirala, R. K., Bischoff, E. D., Joseph, S. B., Wagner, B. L., Walczak, R., Laffitte, B. a, ... Schulman, I. G. (2002). Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(18), 11896–901. doi:10.1073/pnas.182199799
- Ten Brinke, A., van Golde, L. M. G., & Batenburg, J. J. (2002). Palmitoylation and processing of the lipopeptide surfactant protein C. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1583*(3), 253–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176392>
- Terasaka, N., Hiroshima, A., Ariga, A., Honzumi, S., Koieyama, T., Inaba, T., & Fujiwara, T. (2005). Liver X receptor agonists inhibit tissue factor expression in macrophages. *The FEBS Journal*, *272*(6), 1546–56. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04599.x
- Tino, M. J., & Wright, J. R. (1999). Surfactant proteins A and D specifically stimulate directed actin-based responses in alveolar macrophages. *The American Journal of Physiology*, *276*(1 Pt 1), L164–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887069>
- Tontonoz, P., & Mangelsdorf, D. J. (2003). Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *17*(6), 985–93. doi:10.1210/me.2003-0061
- Trapnell, B. C., Carey, B. C., Uchida, K., & Suzuki, T. (2009). Pulmonary alveolar proteinosis, a primary immunodeficiency of impaired GM-CSF stimulation of macrophages. *Current Opinion in Immunology*, *21*(5), 514–21. doi:10.1016/j.coi.2009.09.004
- Trapnell, B. C., & Whitsett, J. a. (2002). Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annual Review of Physiology*, *64*, 775–802. doi:10.1146/annurev.physiol.64.090601.113847

- Ueno, T., Linder, S., Na, C.-L., Rice, W. R., Johansson, J., & Weaver, T. E. (2004). Processing of pulmonary surfactant protein B by napsin and cathepsin H. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16178–84. doi:10.1074/jbc.M312029200
- Umesono, K., Murakami, K. K., Thompson, C. C., & Evans, R. M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell*, 65(7), 1255–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1648450>
- Van Golde, L. M., Batenburg, J. J., & Robertson, B. (1988). The pulmonary surfactant system: biochemical aspects and functional significance. *Physiological Reviews*, 68(2), 374–455. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3282243>
- Van Iwaarden, J. F., Pikaar, J. C., Storm, J., Brouwer, E., Verhoef, J., Oosting, R. S., ... van Strijp, J. A. (1994). Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides. *The Biochemical Journal*, 303 ( Pt 2, 407–11. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1137342&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(2), 112–24. doi:10.1038/nrm2330
- Veldhuizen, E. J., & Haagsman, H. P. (2000). Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1467(2), 255–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11030586>
- Veldhuizen Ruud, Nag Kaushik, Orgeig Sandra, P. F. (1998). The role of lipids in pulmonary surfactant 1998.pdf. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1408, 90–108.
- Venkateswaran, A., Laffitte, B. A., Joseph, S. B., Mak, P. A., Wilpitz, D. C., Edwards, P. A., & Tontonoz, P. (2000). Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 12097–102. doi:10.1073/pnas.200367697
- Voorhout, W. F., Veenendaal, T., Haagsman, H. P., Verkleij, A. J., van Golde, L. M., & Geuze, H. J. (1991). Surfactant protein A is localized at the corners of the pulmonary tubular myelin lattice. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 39(10), 1331–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1940306>
- Voyno-Yasenetskaya, T. A., Dobbs, L. G., Erickson, S. K., & Hamilton, R. L. (1993). Low density lipoprotein- and high density lipoprotein-mediated signal transduction and exocytosis in alveolar type II cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9), 4256–60. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=46485&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Weaver, T. E., Na, C.-L., & Stahlman, M. (2002). Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Seminars in Cell &*

- 
- Developmental Biology*, 13(4), 263–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12243725>
- Whitsett, J. a, Wert, S. E., & Weaver, T. E. (2010). Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annual Review of Medicine*, 61, 105–19. doi:10.1146/annurev.med.60.041807.123500
- Willy, P. J., & Mangelsdorf, D. J. (1997). Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes & Development*, 11(3), 289–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9030682>
- Willy, P. J., Umesono, K., Ong, E. S., Evans, R. M., Heyman, R. A., & Mangelsdorf, D. J. (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes & Development*, 9(9), 1033–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7744246>
- Wright, J. R. (1997). Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiological Reviews*, 77(4), 931–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9354809>
- Wright, J. R., & Dobbs, L. G. (1991). Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. *Annual Review of Physiology*, 53, 395–414. doi:10.1146/annurev.ph.53.030191.002143
- Yan, Z., & Hansson, G. K. (2007). Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunological Reviews*, 219, 187–203. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00554.x
- Yu, S. H., & Possmayer, F. (1998). Interaction of pulmonary surfactant protein A with dipalmitoylphosphatidylcholine and cholesterol at the air/water interface. *Journal of Lipid Research*, 39(3), 555–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9548588>
- Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R., & Tontonoz, P. (2009). LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5936), 100–4. doi:10.1126/science.1168974
- Zelcer, N., Khanlou, N., Clare, R., Jiang, Q., Reed-Geaghan, E. G., Landreth, G. E., ... Tontonoz, P. (2007). Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver x receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25), 10601–6. doi:10.1073/pnas.0701096104
- Zissel, G., Ernst, M., Rabe, K., Papadopoulos, T., Magnussen, H., Schlaak, M., & Müller-Quernheim, J. (2000). Human alveolar epithelial cells type II are capable of regulating T-cell activity. *Journal of Investigative Medicine : The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 48(1), 66–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10695271>
-

