



**Centro de Investigación Biomédica  
de La Rioja**



**Centro de Investigación del Cáncer**



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**FUNCIÓN DE IGF1 E IGF1R EN EL DESARROLLO DEL PULMÓN DE  
RATÓN: MECANISMOS DE ACCIÓN DE IGF1 EN EL DESARROLLO  
PRENATAL E IMPLICACIÓN DE IGF1R EN LA DIFERENCIACIÓN DEL  
EPITELIO PULMONAR**

**Rosete Sofia das Dores Pais**

**Salamanca 2013**



**D. JOSÉ MANUEL GARCÍA PICHEL**, Doctor en Ciencias Biológicas e Investigador Contratado por la Fundación Rioja Salud en el Centro de Investigación Biomédica de la Rioja (CIBIR) de Logroño,

**CERTIFICA:**

Que el trabajo realizado bajo mi dirección por la Licenciada en Biología **ROSETE SOFIA DAS DORES PAIS** titulado: **“Función de IGF1 e IGF1R en el desarrollo del pulmón de ratón: mecanismos de acción de IGF1 en el desarrollo prenatal e implicación de IGF1R en la diferenciación del epitelio pulmonar”**, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmo la presente en Salamanca a 4 de Diciembre de 2013.

Fdo. Dr. José M. García Pichel



**D. CARMEN GUERRERO**, Doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular de la Universidad de Salamanca

**CERTIFICA:**

Que el trabajo realizado bajo mi dirección por la Licenciada en Biología **ROSETE SOFIA DAS DORES PAIS** titulado: **“Función de IGF1 e IGF1R en el desarrollo del pulmón de ratón: mecanismos de acción de IGF1 en el desarrollo prenatal e implicación de IGF1R en la diferenciación del epitelio pulmonar”**, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmo la presente en Salamanca a 4 de Diciembre de 2013.

Fdo. Dra. Carmen Guerrero



Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR) y financiado por Fundación Rioja Salud.

Consejería de Salud y Servicios Sociales.

Gobierno de La Rioja.

La Rioja, España.



A mis padres, a mi hermana,

por seguirme y creer siempre en mi  
aunque eso signifique no estar con ellos



"La ignorancia genera confianza más frecuentemente que el conocimiento. Son aquellos que saben poco, y no esos que saben más, quienes tan positivamente afirman que este o aquel problema nunca será resuelto por la ciencia".

Charles Darwin



## AGRADECIMIENTOS

Por fin ha llegado el momento de los agradecimientos, el punto final de todo el proceso que ha supuesto esta tesis. Espero no olvidar a nadie de todos los que me habéis apoyado y que me habéis ayudado, de distinta forma, para que finalmente escribiese esta tesis. A todos vosotros GRACIAS. Para mí, esta tesis no ha sido sólo un aprendizaje a nivel científico, también ha sido un gran aprendizaje a nivel personal. En el centro me he sentido muy bien, muy arropada y muy querida. Gracias por las palabras de ánimo y por vuestras sonrisas.

Hoy no estaría aquí sin mis padres. Me orientaron profesionalmente para que finalmente llegase aquí, me apoyaron siempre en mis decisiones y me animaron con su interés y su pasión por todo lo que hago. Gracias.

Tengo que agradecerle mucho también a José, mi director de tesis, por el apoyo que me ha brindado en estos últimos años. Sin su orientación, estímulo, inspiración y constancia, mi tesis no sería hoy lo que es. Gracias por darme la oportunidad de realizar esta tesis y de vivir todas estas experiencias. Gracias por tus consejos, pero sobre todo, gracias por tu apoyo y tu guía personal en este camino. Tampoco se me olvida todo tu apoyo a nivel emocional, que me ha ayudado en los momentos más difíciles.

A mi tutora de Tesis, la Dra. Carmen Guerrero, gracias por su apoyo y dedicación en esta Tesis. Sin su implicación no habría sido posible realizarla.

Valle, desde ese primer día mío en el laboratorio, donde empecé a trabajar contigo, nos han pasado muchas cosas: nos hemos ilusionado juntas, sufrido decepciones. Tengo muchísimas cosas que agradecerte porque siempre has estado a mi lado, tanto a nivel profesional como personal, me siento realmente afortunada de que nuestros caminos un día se cruzaran. He tenido la suerte de tenerte como apoyo cuando lo he necesitado sin pedírtelo, de darme el empujoncito que me hacía falta y el tirón de orejas cuando era necesario. Así que por un sinfín de motivos, gracias Valle y espero que sigas siendo la persona increíble que he conocido.

Iciar e Iñaki, gracias por ser como unos papis dentro del laboratorio y por enseñarme actitudes científicas de gran valor para mí. Y aunque creo que a veces no os lo he sabido expresar, muchísimas gracias por los momentos personales que llevo guardados en mi corazón. Iciar, la compañera de grupo, la madre, la amiga, con su cuaderno interminable, ánimo que un día lo lograrás! Para mí desde el momento que llegaste cambiaron muchas cosas. Estoy muy agradecida por todo lo que he aprendido de ti, por toda esa ayuda que me has ofrecido siempre, por hacer simples las cosas que parecían más complicadas y poner algo de luz cuando lo veía todo oscuro. Siempre te he considerado un ejemplo de vida, aunque contigo he aprendido que hijos ¡NO! Los tuyos sí, pero en tu casa. Iñaki, gracias por todas las revisiones, por ese punto crítico que tantas veces me ha hecho falta, y por todo lo que he aprendido de ti. Sin tu implicación esto no habría sido posible. Gracias por compartir parte de

esa magia que te ilusiona cada día. Tengo mucho que agradecerte. Desde el principio viste en mí más potencial del que yo veía, creíste en mí sin motivos y sin conocerme mucho.

Raquel, ese osito de peluche llegado desde Tudela ya al final de mi jornada, gracias por ser como eres, aportando esos momentos de cariño y ternura que tanto bien me han hecho. Gracias por ser mi amiga. Iciar, Iñaki y Raquel, además de todo lo que he dicho, habeis sido mi paño de lágrimas en muchas ocasiones.

Mi grande amigo Alberto de Luís, no sabría cómo agradecerte todos los momentos que hemos compartido tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por apoyarme y escucharme, por nuestras largas conversaciones sobre todo en las largas noches de “cañitas” y por cuando sin hablar nos hemos entendido. No olvidaré jamás las cervezas de los jueves que tanto eché en falta cuando te marchaste. Gracias por compartir conmigo tu pasión por la ciencia, tus inquietudes y tus conocimientos, tus críticas siempre constructivas, las risas, pero lo más importante: gracias por tu amistad y tu cariño, sobretodo me lo has demostrado cuando más lo he necesitado, y sé que aunque el futuro nos lleve por caminos que se separen siempre nos tendremos el uno al otro. En este largo camino lleno de piedras que hemos vivido, creo que los dos hemos aprendido mucho estos años. En definitiva, gracias por tu amistad, un regalo de valor incalculable. Gracias por soportarme en algunos momentos y por esas “tonterías” que hemos tenido. Y aun sabiendo que me quedo corta (porque los cumplidos nunca están de más cuando se trata de hablar de ti) mil millones de gracias.

Bego, gracias por todas esas “broncas” aunque sólo te hiciera caso un 10% de las veces, pero siempre te escuchaba. Te deseo mucha suerte, aunque sé que no te va a hacer falta.

Resú, esa mujer, amiga y la segunda madre que he encontrado en tierras riojanas. Gracias por haber entrado en mí vida y llenarla de alegría, sonrisas, ilusiones. Tus consejos, tus experiencias han sido muy importantes para mí desarrollo como mujer. Me hiciste ver que con voluntad podemos todo. Por cierto, sin olvidar tu comida, gracias por preocuparte siempre de mí. Te llevaré por vida.

A todos mis compañeros con los que he compartido el laboratorio, me habéis prestado ayuda y conocimientos cuando los he necesitado: Laura, Bea, Eva, Josune, Sonia, Judit y Luis. Nunca se borrarán de mi memoria los almuerzos, las horas de la comida, los cafés de después de comer. Tengo muy buenos recuerdos de los años que compartí aquí y no sabría con cual quedarme. Al personal del animalario, Laura, Raluca y Hector, gracias por cuidar mis ratoncitos. Tampoco me olvido de aquellas personas que en algún momento se cruzaron nuestras vidas en este laboratorio pero ya no están aquí: el grupo del Dr. Miguel Morales (Miguel, Germán, Emilio, Lilian, Gadea, Nuria y Patricia) y el grupo de Araclon Biotech (Anuska, Virginia, Maria, Mari, Diego) que se llevaron un pedacito de mi corazón en la maleta y además de vuestro apoyo, también me habéis ofrecido vuestra amistad, vuestra alegría, vuestro cariño: a vosotros muchísimas gracias y suerte en vuestra nueva etapa. También me gustaría hacer extensivo este agradecimiento a todos los compañeros del centro por su aportación a la

experiencia que ha llevado a la escritura de esta tesis en especial a Laura Pérez, gracias por tu inmensa sonrisa, eres un ejemplo de fuerza y entereza admirable. Me alegro mucho de haberte encontrado por el camino “mi pañuelito de lágrimas”.

En el terreno personal, fuera de aquí, también he tenido mucha suerte, porque me he rodeado de gente que, además de quererme y aceptarme, me ha comprendido totalmente, me ha respetado y me ha apoyado siempre en mi trabajo. Tengo que agradecerle a Ascen, Ángeles, Mari Luz, Ricardo, Román, Albert, Lorena, Lara, Urbina, Patri, Sheyla y Bea, por vuestros ánimos y vuestro apoyo, pero en especial a Ascen por todo lo que hemos compartido, por tu amistad. Gracias por ser tú, por quererme, por alegrarte por mí, por entenderme siempre, por estar siempre que te he necesitado, por ser mi amiga desde siempre, por tu confianza, por darme siempre ánimos en todo, por ser cómo eres.

Às minhas princesas, Leninha, Sílvia, e Joana, grandes amigas do Curso de biologia, são a minha vida, com vocês sinto-me completa e irei até ao fim do mundo sempre que seja necessário. Juntas vivemos grandes momentos que nunca esquecerei, desde os primeiros meses do Curso até o dia de hoje. Fomo-nos conhecendo e devagarinho demonstraram-me como cresce a nossa amizade, tanto nos bons como nos maus momentos. Obrigado por me darem a oportunidade de errar e de aprender destes erros. Obrigado pelos vossos sermões (alguns bem merecidos), conseguiram fazer-me rir inclusive nos momentos de maior stress. Comigo viveram os momentos de estudo durante o curso, sofreram a maior parte desta tese, e apoiaram-me em muitos dos meus sonhos, se bem que não os partilhámos como queríamos, e sobretudo suportaram a minha atarefada agenda, assim como a distância que nos separava. Obrigado por tentarem tranquilizar-me quando me fez falta, obrigado por relevarem o meu nervosismo, apoiando-me quando me sentia dececionada e triste, e por me aguentarem via skype quando chegava stressada a casa com as minhas últimas novidades. Ainda que não pudesse estar muito tempo sem vos ver e as visitas a Portugal sempre terminavam em Coimbra ou Soure, o facto de não vos ter aqui bem pertinho de mim foi muito difícil, senti muitas saudades vossas durante este 4 anos. Vivemos tanta coisa juntas, vocês são parte desta tese. Um muito obrigado por tudo o que nós sabemos. AMO-VOS!!

Aos meus amigos, alguns mais presentes na minha vida nestes momentos que outros. Os nossos caminhos cruzaram-se durante a adolescência, e ainda que por vezes parece que cada um siga o seu próprio caminho, eu sei que sempre estiveram e estão aí: Marco, Fernando e André. Obrigado por suportarem o meu mau génio quando não o entendiam, obrigado por todos estes momentos acumulados ano atrás ano de amizade e por terem feito realidade esta amizade tao bonita.

Deixei para o final as pessoas mais importantes para mim durante estes anos e durante... sempre. Isto não tira protagonismo e importância ao resto, mas tenho a certeza de que entendem... Aos meus pais, Alberto Rogério e Maria Helena, que além do que já disse anteriormente, tenho que agradecer-vos o facto de terem estado sempre comigo, de me terem orientado tão bem durante toda a minha vida, que tenham sido um exemplo tao importante

para mim. Obrigado por esperarem sempre de mim tudo o que posso dar e por se orgulharem com todas as minhas conquistas. Assim, uma vez mais, AMO-VOS MUITO. À minha irmã Ana, obrigado por transmitir-me essa segurança em mim e conseguir que libertasse essa energia interior que necessitava à muito tempo e que só tu conseguiste. Também te agradeço por me teres tirado a venda dos olhos e por fazer-me ver a realidade quando necessitei, de permanecer ao meu lado e por todos esses momentos inesquecíveis que partilhamos. Obrigado por tudo o que tu e eu sabemos, por fazeres brilhar os meus olhos no escuro. Amo-te muito e quero dedicar-te esta tese também, tu deste-me as forças para que a acabasse. À minha família, que sempre me apoiou e sofreu (e posso assegurar que sofreram bastante comigo) tentando com que a minha vida fosse mais fácil. Eles não só partilharam os meus sonhos desde que era pequena até ao presente, se não que também fizeram realidade todos aqueles que estavam ao seu alcance. Podia passar o resto da minha vida agradecendo-lhes pois são os máximos responsáveis desta tese e da minha pessoa.

Hoy escribo esta gran lista de agradecimientos y me pongo algo melancólica. Por otro lado, a nivel personal tengo todavía más cosas que agradecer. Y en general, quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han pasado por mi vida durante estos años y me han ayudado con una palabra amable o de ánimo. A los que quizás no estén aquí reflejados y deberían estarlo, perdonadme el descuido. Muchas gracias a todos. Para acabar me gustaría dejar una frase con la que me tropecé en el transcurso de esta tesis y en la cual veo reflejada mi vida y sobretudo los últimos años...

“La vida no es esperar a que pase la tormenta, es aprender a bailar bajo la lluvia”.

Gracias por enseñarme a bailar bajo la lluvia





## **ABREVIATURAS**



<b>AEC1</b>	del inglés alveolar epithelial type 1 cells
<b>AEC2</b>	del inglés alveolar epithelial type 2 cells
<b>ABC</b>	del inglés <i>Avidin- Biotin Peroxidase Comple</i>
<b>ADC</b>	Adenocarcinoma
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido Desoxirribonucleico complementario
<b>al</b>	zona alveolar
<b>ARNm</b>	Ácido Ribonucleico mensajero
<b>Aqp5</b>	del inglés <i>Aquaporin 5</i>
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ATF1</b>	del inglés <i>activating transcription factor 1</i>
<b>BAC</b>	del inglés <i>Bacterial artificial chromosome</i>
<b>BADJ</b>	del inglés <i>bronchial alveolar conduct junction</i>
<b>BPD</b>	del inglés <i>Bronchopulmonary displasia</i>
<b>BrdU</b>	Bromodeoxiuridina
<b>BSA</b>	del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>bt</b>	bronquiolo terminal
<b>CCSP</b>	del inglés <i>Clara cell secretory protein</i>
<b>CC10</b>	del inglés <i>Clara cells 10 kDa secretory protein</i>
<b>CE</b>	Carcinoma Epidermoide
<b>CGRP</b>	del inglés <i>calcitonin gene-related peptide</i>
<b>ClaraV</b>	del inglés <i>variant clara cells</i>
<b>CNTF</b>	del inglés <i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
<b>COPD</b>	del inglés <i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
<b>Cre</b>	Cre recombinase
<b>CTGF</b>	del inglés <i>Connective Tissue Growth Factor</i>
<b>CYR61</b>	del inglés <i>Cysteine-Rich 61</i>
<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobencidina
<b>DABCO</b>	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>dNTP</b>	Didesoxinucleótido trifosfato
<b>DPT</b>	del inglés <i>dermatopontin</i>
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>E</b>	día de desarrollo embrionario
<b>ECL</b>	del inglés <i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<b>EDTA</b>	del inglés <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<b>EGF</b>	del inglés <i>Epidermal Growth Factor</i>
<b>EGFP</b>	del inglés <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
<b>EGFR</b>	del inglés <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
<b>EGR1</b>	del inglés <i>Early Growth Response 1</i>
<b>ERK</b>	del inglés <i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
<b>FDR</b>	del inglés <i>False Discovery Rate</i>
<b>FGF</b>	del inglés <i>Fibroblast Growth Factor</i>
<b>FGFR</b>	del inglés <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
<b>FGF18</b>	fibroblast growth factor 18
<b>fl</b>	del inglés <i>floxed</i> con un gen o fragmento de ADN flanqueado por dos secuencias <i>loxP</i>

## Abreviaturas

---

<b>Gas5</b>	del inglés <i>growth arrest specific 5</i>
<b>GH</b>	del inglés <i>Growth Hormone</i>
<b>GRB</b>	del inglés <i>Growth factor Receptor-Bound protein</i>
<b>GZMA</b>	del inglés <i>granzyme A</i>
<b>HALI</b>	del inglés <i>Hyperoxic Acute Lung Injury</i>
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina y Eosina
<b>HIF</b>	del inglés <i>Hypoxia Inducible Factor</i>
<b>HIN1</b>	del inglés <i>High in normal-1</i>
<b>HRP</b>	del inglés Horseradish Peroxidase
<b>H2-Aa</b>	del inglés <i>histocompatibility 2, class II antigen A, alpha</i>
<b>Icam</b>	intercellular adhesion molecule
<b>ICQ</b>	Inmunocitoquímica
<b>IGFs</b>	del inglés <i>Insulin-like Growth Factors</i>
<b>IGFBP</b>	del inglés <i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein</i>
<b>IGF1</b>	del inglés <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
<b>IGF2</b>	del inglés <i>Insulin-like Growth Factor 2</i>
<b>IGF1R</b>	del inglés <i>Insulin-like Growth Factor 1 Receptor</i>
<b>IGF2R</b>	del inglés <i>Insulin-like Growth Factor 2 Receptor</i>
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>Ins</b>	Insulina
<b>Insr</b>	del inglés <i>Insulin Receptor</i>
<b>IRR</b>	del inglés <i>Insulin-Related Receptor</i>
<b>IRS</b>	del inglés <i>Insulin Receptor Substrate</i>
<b>Itgb6</b>	del inglés <i>integrin beta 6</i>
<b>Jun</b>	del inglés <i>Jun oncogene</i>
<b>Kb</b>	kilobase
<b>KO</b>	del inglés <i>knock out</i>
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>KLF</b>	del inglés <i>Krupple-Like Factor</i>
<b>LacZ</b>	del inglés <i>bacterial enzyme <math>\beta</math>-galactosidase</i>
<b>LMEFs</b>	del inglés <i>Lung Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
<b>loxP</b>	secuencia de recombinación de la recombinasa Cre
<b>M6P</b>	Manosa-6-fosfato
<b>MAPK</b>	del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
<b>MEK/MAPKK</b>	del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i>
<b>MM</b>	Marcador Molecular
<b>Msln</b>	del inglés <i>mesothelin</i>
<b>MUc5ac</b>	del inglés <i>mucin 5, subtypes A and C</i>
<b>NE</b>	Neuroendocrine cells
<b>NEBS</b>	del inglés <i>Neuroendocrine bodies</i>
<b>NFIB</b>	del inglés <i>Nuclear Factor I/B</i>

<b>NSCLC</b>	del inglés <i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>
<b>Nur77</b>	del inglés <i>nuclear hormone receptor NUR/77</i>
<b>Nkx2.1</b>	del inglés <i>homeobox protein Nkx-2.1</i>
<b>P</b>	día postnatal (referido a la edad de los ratones)
<b>p38</b>	del inglés <i>p38 kinasa</i>
<b>pAKT</b>	del inglés <i>phosphorylated AKT</i>
<b>pERK</b>	del inglés <i>phosphorylated Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
<b>PBST</b>	del inglés <i>Phosphate Buffer Saline Tween</i>
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCNA</b>	del inglés <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
<b>PCR</b>	del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PDGF</b>	del inglés <i>platelet-derived growth factor beta</i>
<b>PECAM</b>	del inglés <i>Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PI3K</b>	del inglés <i>Phosphoinositide-3 Kinase</i>
<b>PGP9,5</b>	del inglés <i>neuron cytoplasmic protein 9.5</i>
<b>Plat</b>	del inglés <i>plasminogen activator</i>
<b>PH</b>	del inglés <i>Plekstrin Homologue</i>
<b>PL</b>	del inglés <i>placental lactogen</i>
<b>ProSPC</b>	del inglés <i>Propeptide Surfactant Protein C</i>
<b>PVDF</b>	del inglés <i>Polyvinylidene Fluoride</i>
<b>pSRC</b>	del inglés <i>phosphorylated SRC</i>
<b>pSTAT-3</b>	del inglés <i>phosphorylated STAT-3</i>
<b>pSTAT</b>	del inglés <i>phosphorylated Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
<b>qRT-PCR</b>	del inglés <i>quantitative RT-PCR</i>
<b>Ref</b>	referencia
<b>ROS</b>	del inglés <i>Reactive oxygen species</i>
<b>RT</b>	del inglés <i>Reverse transcriptase</i>
<b>RT-PCR</b>	del inglés <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
<b>SCLC</b>	del inglés <i>Small Cell Lung Cancer</i>
<b>SDR</b>	Síndrome de Distrés Respiratorio
<b>SDS</b>	del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
<b>SDS-PAGE</b>	del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
<b>SftpC</b>	del inglés <i>surfactant protein C</i>
<b>SH2</b>	del inglés <i>Src-homology-2 domains</i>
<b>Slfn1</b>	del inglés <i>schlafen 1</i>
<b>Smad</b>	Combinación de las palabras procedentes del inglés <i>mothers against decapentaplegic (MAD)</i> and the <i>C. elegans</i> protein SMA
<b>Scgb1a1</b>	del inglés <i>secretoglobin, family 1A, member 1 (uteroglobin)</i>
<b>SOS</b>	del inglés <i>Son Of Sevenless homolog</i>
<b>SPC</b>	del inglés <i>Surfactant Protein C</i>
<b>STAT</b>	del inglés <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
<b>STAT3</b>	del inglés <i>Signal Transducers and Activators of Transcription 3</i>
<b>TAE</b>	del inglés <i>Tris-Acetate-EDTA</i>
<b>TBS-T</b>	del inglés <i>Tris Buffered Saline-Tween</i>
<b>TdT</b>	del inglés <i>Terminal deoxinucleotidyle Transferase</i>
<b>TE</b>	Tris EDTA
<b>TGF</b>	del inglés <i>Transforming growth factor</i>

## Abreviaturas

---

TKI	del inglés <i>Tyrosine-kinase inhibitor</i>
T <sub>m</sub>	del inglés <i>Melting Temperature</i>
TTF-1	del inglés <i>Tyroid Transcription Factor-1</i>
T1 $\alpha$	del inglés <i>transmembrane glycoprotein E11</i>
VEGF <sub>A</sub>	del inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
WNT	del inglés <i>Wingless-Type MMTV integration site family</i>
WT	del inglés <i>Wild type</i>
YAC	del inglés <i>Yeast artificial chromosome</i>

## RESUMEN

En esta tesis se ha estudiado la implicación funcional de la señalización de los IGFs a través de su receptor de alta afinidad, el IGF1R, en la organogénesis y en el mantenimiento de la homeostasis del pulmón de ratón. Por una parte se ha analizado la acción molecular de IGF1 en el desarrollo pulmonar embrionario caracterizando el fenotipo pulmonar del ratón mutante deficiente de *Igf1*. Para ello se compararon los rasgos moleculares y celulares distintivos de los ratones mutantes *Igf1*<sup>-/-</sup> frente a sus controles normales *Igf1*<sup>+/+</sup>. En una segunda parte se ha iniciado el estudio de la función de IGF1R en la diferenciación y regeneración del epitelio respiratorio. En este caso se generaron dos líneas de ratones mutantes condicionales de este gen en el epitelio respiratorio, uno con delección generalizada de *Igf1r* en todo el epitelio y la otra con su delección exclusiva en las células de Clara, y posteriormente se analizaron preliminarmente sus pulmones. Para realizar todos estos estudios se han empleado combinaciones de múltiples técnicas experimentales de Biología Molecular y Celular e Histopatología, como: i) qRT-PCR, y *Western blot* o tinciones inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, para la determinación de niveles de expresión génica a nivel de ARNm y de proteína, respectivamente, tanto de genes del sistema IGF/Ins como de genes marcadores de proliferación y diferenciación específicos de diferentes tipos celulares del pulmón; ii) *Western blot* para la evaluación de cambios de activación por fosforilación de proteínas señalizadoras; y iii) cultivos primarios de células derivadas del pulmón de ratón (células mesenquimales embrionarias o de colonias de células madre de pulmón adulto) y cultivos organotípicos de lóbulos pulmonares de ratones prenatales, para evaluar el efecto de la adición exógena de los IGFs sobre la morfología y cambios de expresión génica.

La primera parte de este trabajo ha permitido demostrar que IGF1 está involucrado en la organogénesis prenatal del pulmón, siendo necesario para su crecimiento y para la diferenciación de diferentes tipos celulares pulmonares, sobre todo del septo alveolar. Además se han identificado vías moleculares (ERK2) y nuevos genes reguladores diana de su acción (como los factores de transcripción Nfib, Klf2 y FoxM1, y las proteínas matricelulares Cyr61 y Ctgf). En la segunda parte del trabajo, los datos preliminares obtenidos de los ratones mutantes condicionales de *Igf1r* en el epitelio pulmonar apuntan a que el receptor de IGFs está implicado en la correcta diferenciación de las células epiteliales del pulmón adulto, ya que su ausencia retrasa la diferenciación de sus precursores a células de diferente linaje epitelial, y en concreto afectando a la regeneración de las células de Clara bronquiolares después de su ablación con naftaleno.

## ABSTRACT

In this work we studied the functional involvement of IGFs signaling through its high affinity receptor, IGF1R, during organogenesis and the maintenance of homeostasis of the mouse lung. On the one hand the molecular action of IGF1 was analyzed during lung embryonic development by characterizing the pulmonary phenotype of IGF1-deficient mutant mice. To get this aim we compared molecular features and cellular hallmarks between the *Igf1*<sup>-/-</sup> mutant mice and their normal controls (*Igf1*<sup>+/+</sup>). In a second part, we initiated the preliminary study of IGF1R function in epithelial cell differentiation and regeneration in the adult mouse lung. For this purpose, two lines of conditional mouse mutants of this gene in the respiratory epithelium were generated, one with a generalized deletion of *Igf1r* in the entire epithelium, and the other with its specific deletion in Clara cells. and then their lungs were preliminarily examined, To perform all these studies we used combinations of multiple experimental techniques in Histopathology and Molecular and Cellular Biology such as: i) qRT-PCR and Western blot or immunocytochemical and immunohistochemical staining for determination of gene expression levels at the mRNA or protein level, respectively, of both IGF/Ins system genes and specific markers to determine proliferation or differentiation of different pulmonary cell types; ii) Western blot to assess changes in activation by phosphorylation of signaling proteins; and iii) primary cell cultures derived from mouse lungs (embryonic mesenchymal cells or adult lung stem cell colonies) and organotypic cultures of lung lobes from prenatal mouse embryos to evaluate the effect of exogenously added IGFs on the morphology and gene expression changes.

The first part of this work demonstrates that IGF1 is involved in organogenesis of the prenatal lung, being necessary for its growth and differentiation of different pulmonary cell types, especially in the alveolar septum, and identifies molecular pathways (ERK2) and new target regulatory genes (e.g. Nfib, KLF2 and FoxM1 transcription factors, and Cyr61 and CTGF matricellular proteins). Preliminary data from the second part of this study suggest that IGF1R is involved in the proper differentiation of adult lung epithelial cells, since its absence delays the differentiation of precursor cells of different epithelial lineage, particularly affecting the regeneration of bronchiolar Clara cells after their ablation with naphthalene.

# ÍNDICE



<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. El pulmón de mamíferos: organización histológica, crecimiento y desarrollo embrionario.....</b>	<b>3</b>
1.1. Organización histológica del pulmón: el epitelio respiratorio .....	4
1.2. Crecimiento y regeneración pulmonar: nichos y células madre .....	7
1.3. Desarrollo embrionario del pulmón de ratón y su paralelismo con el humano .....	9
<b>2. La función de los IGFs en el pulmón .....</b>	<b>14</b>
2.1. El sistema de los IGFs: componentes, señalización y función .....	14
2.2. Los IGFs en el desarrollo pulmonar .....	19
2.2.1. Expresión de los IGFs durante la organogénesis del pulmón .....	19
2.2.2. Funciones de IGFs en desarrollo pulmonar: los ratones mutantes .....	20
2.3. Los IGFs en el mantenimiento de la homeostasis pulmonar: participación en la reparación del daño, fibrosis y cáncer .....	25
2.3.1. Los IGFs en la homeostasis del pulmón humano .....	25
2.3.2. Los IGFs en modelos murinos de daño, regeneración y tumores .....	28
<b>3. Ratones mutantes condicionales: los ratones <i>Igf1r<sup>fl/fl</sup></i> y transgénicos con expresión de la recombinasa <i>Cre</i> en el epitelio respiratorio .....</b>	<b>30</b>
3.1. Los ratones mutantes con el gen <i>Igf1r</i> floxeado o <i>Igf1r<sup>fl/fl</sup></i> .....	32
3.2. Los ratones transgénicos <i>CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup></i> expresan <i>Cre</i> en las células de Clara del epitelio respiratorio .....	35
3.3. Los ratones transgénicos <i>Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup></i> expresan <i>Cre</i> en múltiples tipos celulares del epitelio respiratorio .....	36
<b>4. Los modelos de daño y regeneración epitelial pulmonar en ratón .....</b>	<b>37</b>
4.1. Ablación y regeneración de las células de Clara con la administración intraperitoneal única de naftaleno. ....	39
4.2. Hiperoxia .....	40
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
<b>1. Generación y mantenimiento de las colonias de ratones mutantes .....</b>	<b>49</b>
1.1. La colonia de ratones mutantes para <i>Igf1</i> .....	49
1.1.1. Obtención de embriones y disección de pulmones prenatales en los ratones mutantes para <i>Igf1</i> .....	49
1.2. Modelos de ratones mutantes condicionales deficientes en <i>Igf1r</i> en el epitelio respiratorio .....	50
1.2.1. Generación de ratones mutantes condicionales de <i>Igf1r</i> en las células de Clara del pulmón: los mutantes <i>CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup></i> .....	51
1.2.2. Generación de los ratones mutantes condicionales de <i>Igf1r</i> en todo el epitelio respiratorio: los ratones <i>Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup></i> .....	52
1.3. Genotipado de los ratones mutantes .....	53
1.3.1. Extracción de ADN genómico .....	53
1.3.2. Genotipado de ratones por PCR.....	54
<b>2. Análisis funcional no invasivo de la función respiratoria .....</b>	<b>57</b>
<b>3. Modelos de daño y regeneración pulmonar en los ratones mutantes condicionales.....</b>	<b>57</b>
3.1. Daño y regeneración pulmonar por exposición de los ratones a hiperoxia .....	57
3.2. Daño y regeneración de las células de Clara por administración intraperitoneal única de naftaleno.....	58
<b>4. Cultivos de los explantes de embriones de la colonia <i>Igf1</i> .....</b>	<b>58</b>

<b>5. Cultivos celulares derivados de pulmón .....</b>	<b>59</b>
5.1. Cultivos primarios de células mesenquimales pulmonares derivadas de colonias de ratones <i>Igf1</i> .....	59
5.2. Generación y cultivo de líneas celulares de fibroblastos inmortalizados derivados de ratones mutantes en <i>Igf1</i> .....	60
5.3. Cultivos de líneas celulares tumorales de pulmón humano.....	60
5.4. Aislamiento y cultivo de células madre pulmonares derivadas de ratones mutantes condicionales de <i>Igf1r</i> .....	60
<b>6. Obtención y análisis de proteínas de pulmones, organocultivos y cultivos celulares .....</b>	<b>62</b>
6.1. Obtención de lisados de proteínas de los cultivos celulares.....	62
6.2. Cuantificación de proteínas .....	63
6.3. Análisis por <i>Western blot</i> .....	64
<b>7. Histología e Inmunodetección en las células y tejidos .....</b>	<b>65</b>
7.1. Inmunocitoquímica (ICQ).....	65
7.2. Preparación de tejidos para la histología y las tinciones inmunohistoquímicas (IHQ) .....	66
7.3. Tinción de Hematoxilina y Eosina .....	67
7.4. Tinciones inmunohistoquímicas de fluorescencia (IHQ) .....	67
7.5. Tinciones inmunohistoquímicas con peroxidasa (DAB) .....	69
7.6. Determinación de la proliferación celular mediante inmunodetección de Bromodeoxiuridina (BrdU) en ratones adultos .....	70
<b>8. Determinación de la proliferación celular por incorporación de MTS.....</b>	<b>71</b>
<b>9. Obtención y análisis de ARN .....</b>	<b>72</b>
9.1. Extracción de ARN total .....	72
9.2. Síntesis de ADNc por transcripción inversa .....	73
9.3. PCR cuantitativa a tiempo real.....	73
<b>10. Análisis estadístico .....</b>	<b>75</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>77</b>
<b>1. Perfiles de expresión de genes del sistema de IGF/Ins durante el desarrollo del pulmón en el ratón .....</b>	<b>79</b>
<b>2. Caracterización fenotípica de pulmón prenatal en ratones mutantes <i>Igf1</i><sup>-/-</sup> .....</b>	<b>80</b>
2.1. Validación de la expresión diferencial de ARNm de genes reguladores en los pulmones <i>Igf1</i> <sup>-/-</sup> .....	81
2.2. Expresión de los IGFs en los pulmones E18,5 mutantes <i>Igf1</i> <sup>-/-</sup> .....	83
2.3. Expresión y niveles de activación de mediadores de la señalización de IGFs en el pulmón de los ratones mutantes <i>Igf1</i> <sup>-/-</sup> .....	85
2.4. Efecto de IGF1 sobre la morfogénesis, la maduración del septo alveolar y sobre los niveles de expresión de genes reguladores en pulmones prenatales cultivados <i>ex vivo</i> ... ..	86
2.5. El tratamiento con corticosterona induce maduración del septo alveolar pero no rescata la viabilidad postnatal de los ratones <i>Igf1</i> <sup>-/-</sup> .....	90
<b>3. Efecto de los IGFs sobre la expresión de genes reguladores (diana de IGF1) en diferentes tipos celulares del pulmón: estudio <i>in vitro</i> sobre células mesenquimales de pulmones prenatales de ratón y en líneas celulares derivadas de tumores epiteliales humanos.....</b>	<b>91</b>
3.1. Efecto de IGF1 sobre la expresión de genes reguladores diana de IGF1 en LMEFs derivados de embriones <i>Igf1</i> <sup>+/+</sup> e <i>Igf1</i> <sup>-/-</sup> .....	92

3.2. Efecto del IGF1 sobre la expresión de genes reguladores en células mesenquimales primarias derivadas de pulmones embrionarios .....	95
3.3. Estudio del efecto de IGF1 sobre la expresión de genes reguladores en la línea celular tumoral de origen humana H1299.....	99
<b>4. Expresión de IGF1R en pulmón de ratón adulto.....</b>	<b>103</b>
<b>5. Generación y estudio preliminar del fenotipo pulmonar de ratones mutantes condicionales de IGF1R en el epitelio respiratorio .....</b>	<b>106</b>
5.1. Generación y caracterización preliminar del fenotipo pulmonar de los mutantes condicionales de IGF1R en las células de Clara .....	107
5.1.1. La regeneración de las células de Clara está alterada en los animales mutantes <i>CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup></i> .....	111
5.1.2. La hiperoxia altera la regeneración de las células de Clara que carecen de IGF1R .....	113
5.1.3. Aumento en el contenido de células indiferenciadas en las colonias de células madre de ratones <i>CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup></i> cultivadas <i>in vitro</i> .....	115
5.2. Generación y caracterización preliminar del fenotipo pulmonar en los ratones mutantes condicionales de IGF1R en todo el epitelio respiratorio .....	119
5.2.1. Aumento de células indiferenciadas en las colonias de células madre de los ratones <i>Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup></i> cultivadas <i>in vitro</i> .....	124
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>129</b>
<b>1. Expresión de los genes del sistema IGF/Ins en el pulmón de ratón: IGF1R aunque posee una expresión constitutiva, ésta es más alta en células del epitelio respiratorio .....</b>	<b>131</b>
<b>2. Acción de IGF1 en el desarrollo y maduración del pulmón embrionario.....</b>	<b>132</b>
2.1 La deficiencia de IGF1 en los pulmones E18,5 causa alteración de la expresión de genes reguladores a nivel proteico, aumentando la expresión de Nfib y reduciendo la de Klf2, Egr1 y Ctgf .....	133
2.2. Expresión y señalización intracelular diferencial del sistema IGF/Ins en los ratones mutantes para <i>Igf1<sup>-/-</sup></i> .....	136
2.3. IGF1 induce la morfogénesis, maduración del septo y alteraciones de los niveles de expresión de genes reguladores en los pulmones prenatales cultivados <i>ex vivo</i> .....	138
2.4. Los factores de transcripción Nfib, Klf2 y Egr1 y la proteínas matricelulares Cyr61 y Ctgf son genes diana de IGF1 en el desarrollo pulmonar .....	140
2.5. El tratamiento con corticosterona induce maduración del septo pero no la viabilidad postnatal de los ratones mutantes para <i>Igf1<sup>-/-</sup></i> .....	142
2.6. Efecto diferencial de IGF1 sobre la expresión de genes reguladores en células pulmonares de origen mesenquimal embrionario y epitelial .....	142
<b>3. Fenotipo de los ratones mutantes condicionales de <i>Igf1r</i> en el epitelio pulmonar .</b>	<b>146</b>
3.1. La carencia de IGF1R en las células epiteliales altera la diferenciación epitelial en los bronquiolos terminales .....	148
3.2. IGF1R es necesario para una adecuada regeneración del epitelio bronquiolar terminal tras el daño.....	150
3.3. La falta de IGF1R en el epitelio pulmonar genera colonias más grandes de células madre cultivadas <i>in vitro</i> incrementando el número de progenitores indiferenciados .....	154
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>161</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>165</b>



# **INTRODUCCIÓN**



## 1. El pulmón de mamíferos: organización histológica, crecimiento y desarrollo embrionario

Los mamíferos se caracterizan por tener dos pulmones bien desarrollados que les permiten realizar su característica respiración pulmonar. Estos órganos son estructuras anatómicas de origen embrionario endodérmico pertenecientes al aparato respiratorio ubicados en la caja torácica, delimitados a ambos lados por el mediastino, y posteriormente por el diafragma, músculo que con su distensión y contracción facilita la entrada y salida de gases. Los pulmones son huecos y están cubiertos por una doble membrana lubricada llamada pleura. En ellos la sangre recibe oxígeno desde el aire y a su vez desprenden el dióxido de carbono (Weibel, 1973; Maina and West, 2005; Fredberg and Kamm, 2006). El intercambio de gases entre el aire y la sangre (hematosis) ocurre en los alveolos, sacos ciegos que están rodeados de capilares sanguíneos localizados en la parte más distal de las vías respiratorias (Breeze and Wheeldon, 1977; Ten Have-Opbroek, 1981). En humanos los pulmones adultos tienen alrededor de 500 millones de alveolos, formando una superficie total de alrededor de 140 m<sup>2</sup> (aproximadamente la superficie de una pista de tenis), generando una capacidad pulmonar que oscila entre 4.000-6.000 cm<sup>3</sup> (Angus and Thurlbeck, 1972).

Aunque su estructura varía entre diferentes especies, los pulmones están compuestos por varios lóbulos pulmonares, independientes funcionalmente.

El acceso del aire desde el exterior hasta los alveolos pulmonares ocurre primero por las vías respiratorias superiores, entrando por la boca o las fosas nasales, pasando a la faringe y laringe, y después pasa a las vías inferiores, primero por la tráquea y bronquios, y ya en el pulmón desde los bronquiolos a los alveolos. Los bronquiolos, que carecen de cartílago se ramifican en bronquiolos terminales y bronquiolos respiratorios que finalmente desembocan en los alveolos, que son las unidades funcionales de intercambio gaseoso del pulmón (<http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/hlw/system.html>) (Spooner and Wessells, 1970).

Además de las funciones respiratorias de intercambio gaseoso por los alveolos y su conducción por las vías aéreas, los pulmones realizan otras funciones relevantes. Así, se encargan de la defensa contra partículas, contaminantes y patógenos que entran por estas vías mediante la secreción de moco o de células especializadas como los macrófagos. También participan en la detoxificación de contaminantes y fármacos, tarea desempeñada sobre todo por las células de Clara, y colaboran en diferentes acciones de regulación metabólica y de homeostasis del organismo, por ejemplo controlando la hidratación, presión arterial y pH, o ejerciendo de elementos filtradores o de reservorio de sangre (Travis et al., 1999; Moskwa et al., 2007; Holt et al., 2008; Rada and Leto, 2008). Debido a su delicada estructura y a la extensísima superficie que ocupan, las vías respiratorias son muy propensas a ser dañadas, y consecuentemente a generar enfermedades respiratorias muy relevantes a nivel sanitario. Por lo que después de las patologías vasculares, las enfermedades respiratorias como el asma,

EPOC, bronquiolitis obliterans, fibrosis y cáncer de pulmón, son las que generan mayor mortalidad y morbilidad en pacientes en todo el mundo, manteniendo un auge continuo, con mayor ritmo si cabe en los países desarrollados (Knight and Holgate, 2003; Lopez et al., 2006; Crystal et al., 2008). El conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que dirigen el desarrollo normal del pulmón y que participan en la génesis y progresión de sus patologías contribuye a optimizar tanto los protocolos de prevención como las técnicas de diagnóstico, y sobre todo a mejorar y personalizar su tratamiento. En los últimos quince años, los avances en la investigación en este campo han sido relevantes, encontrándose múltiples componentes y vías moleculares de señalización celular que participan en el normal desarrollo y crecimiento del sistema respiratorio, y cuya alteración o desregulación contribuye a la patogénesis pulmonar. Entre estos componentes moleculares se encuentran los factores de crecimiento relacionados con la insulina, IGFs (Insulin Like Growth Factors) y su sistema de señalización celular.

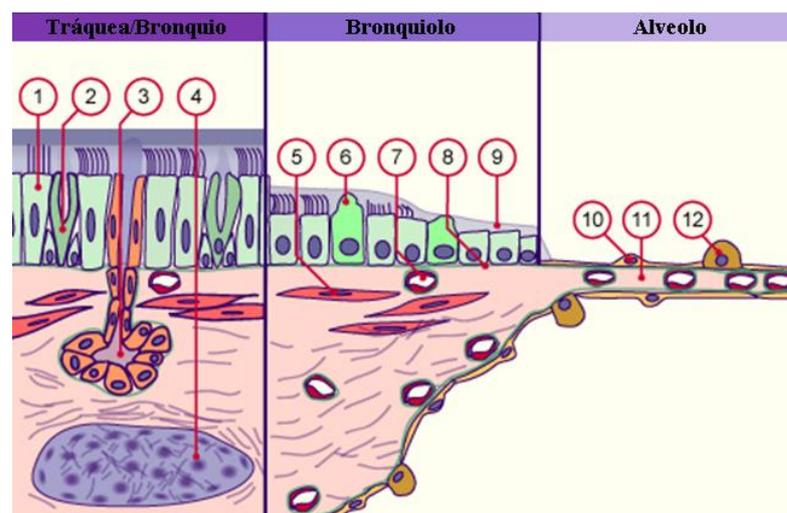
### **1.1. Organización histológica del pulmón: el epitelio respiratorio**

En la Figura 1 se representa esquemáticamente la organización estructural de los diferentes tipos celulares del árbol respiratorio inferior humano.

El lumen de las vías aéreas está recubierto por una capa de células de origen endodérmico que forma el epitelio respiratorio. En las vías respiratorias inferiores más proximales (tráquea y bronquios) este epitelio está formado principalmente por una población mixta de células columnares ciliadas y de células secretoras de moco o goblet cells. En las vías proximales hay grupos de células neuroendocrinas (NE), que se sitúan en pequeños focos recubiertas de otras células epiteliales. En los bronquiolos también se encuentra otro tipo de células secretoras, las células de Clara, que aunque son escasas en humanos, son muy abundantes en roedores. Los sacos alveolares distales se encuentran formados fundamentalmente por neumocitos de tipo 1, también denominados células alveolares de tipo 1 (AEC1) y los neumocitos de tipo 2 o células alveolares de tipo 2 (AEC2), en íntimo contacto con el endotelio de los abundantes capilares (Breeze and Wheeldon, 1977; Berube et al., 2010). El intersticio pulmonar contiene varios linajes celulares de origen mesenquimal donde se incluyen los fibroblastos, miofibroblastos y células del músculo liso. Los vasos están formados por poblaciones de células endoteliales arteriales, venosas y capilares, y vasos linfáticos, que junto con las células de músculo liso y otras células especializadas forman las paredes de los vasos sanguíneos. En el pulmón existen neuronas tanto del sistema simpático como del parasimpático, que inervan las vías aéreas y los vasos sanguíneos. También pueden identificarse macrófagos pulmonares especializados en el intersticio pulmonar y en los alveolos, acompañados por otras células de tipo inflamatorio. Aparte de la conducción y del intercambio gaseoso, el epitelio funcional de las vías respiratorias constituye la primera línea de defensa para eliminar partículas y microorganismos. Esta función se realiza o bien por el moco

generado por las células secretoras y removidas por las células ciliadas, o bien mediante la inmunoregulación y detoxificación del surfactante, presente sobre todo en la zona alveolar, por células como las de Clara presentes en la tráquea, bronquios y bronquiolos. Éstas últimas responsables de la producción de la proteína de Clara (CCSP), muy abundante en el moco y reguladora de respuestas inflamatorias.

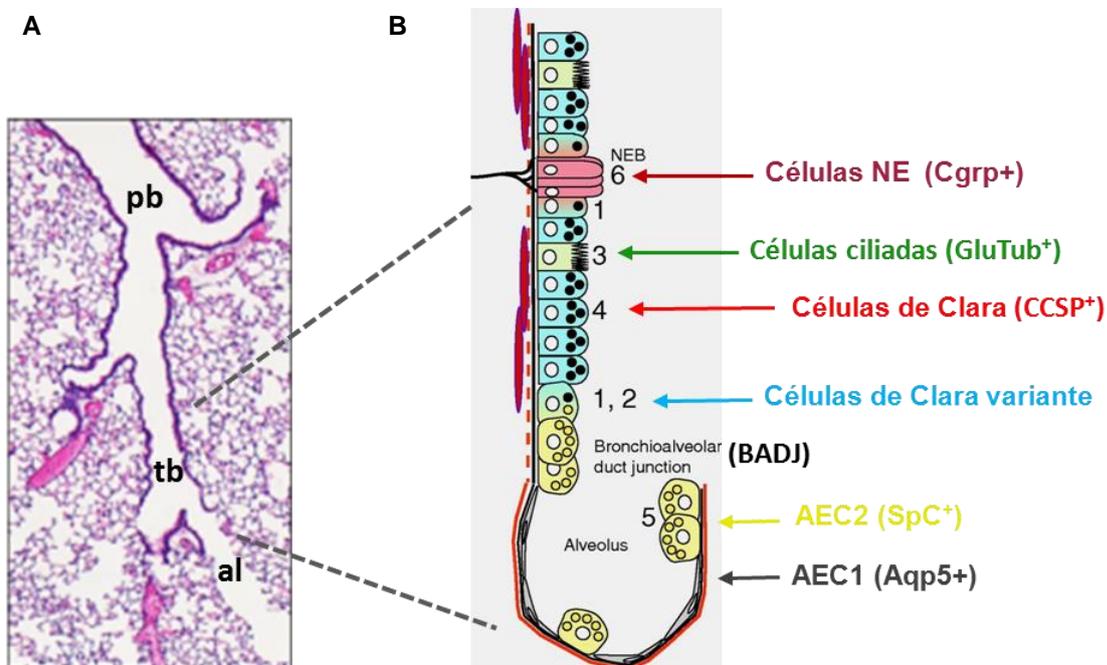
Adicionalmente, y como se describirá más adelante, en el epitelio pulmonar existen nichos de células madre con posibilidad de proliferar y diferenciarse en diferentes linajes epiteliales. Estas células madre pulmonares son muy relevantes para mantener la autoregeneración normal del epitelio y para su reparación tras un daño, pero también en la génesis y progresión de enfermedades pulmonares, incluyendo las neoplasias (Evans et al., 1978; Perl et al., 2005; Rawlins et al., 2008; Stripp, 2008; Ware, 2008; Giangreco et al., 2009; Rawlins et al., 2009b; Snyder et al., 2009; Rock et al., 2011).



**Figura 1. Tipos celulares y estructuras que se encuentran en las vías inferiores del árbol respiratorio humano adulto.** 1, célula columnar ciliada; 2, célula caliciforme secretora de moco; 3, glándula; 4, cartílago; 5, músculo liso; 6, célula de Clara; 7, capilar; 8, membrana basal; 9, surfactante; 10, neumocito de tipo 1; 11, septo alveolar; 12, neumocito de tipo 2. Nótese el cambio progresivo en la arquitectura tisular y en la composición celular a lo largo del eje próximo-distal.

Las células del epitelio respiratorio poseen características diferenciales que las identifican a nivel morfológico, celular y molecular (Wuenschell et al., 1996). Aunque la distribución y proporción de estos tipos celulares es semejante en todos los mamíferos, donde mejor se conocen es en roedores, sobre todo en ratones (Rawlins et al., 2008; Morrissey and Hogan, 2010). En el ratón, el epitelio de la zona bronquiolar más distal hasta la zona de confluencia bronquio-alveolar (BADJ) es de tipo cúbico. Progresa a columnar en los bronquiolos proximales, y es pseudoestratificado en los bronquios y tráquea (Warburton et al., 2000; Eramo et al., 2010; Morrissey and Hogan, 2010; Warburton et al., 2010) (Figura 2). En estos animales, el epitelio está constituido fundamentalmente por las células ciliadas, que expresan los marcadores Foxj1 y Tubulina IV acetilada, y por las células secretoras, células de

Clara que secretan la proteína de Clara (Scgb1a1/CCSP/CC10) (Possmayer, 1988) y las mucosecretoras que expresan Muc5ac. En esta zona, y dispuestas en pequeños grupos, se encuentran las células NE que expresan CGRP y Pgp9.5 (Gould et al., 1983). En la zona del epitelio alveolar del pulmón las células alveolares AEC1 son planas y recubren la mayor parte de superficie respiratoria pulmonar, son post-mitóticas y expresan las proteínas T1 $\alpha$  y Aqp5, mientras que las AEC2 son cúbico-redondeadas, expresan Ttf1 (Nkx2.1) y secretan el surfactante, una mezcla de lípidos y proteínas surfactantes (SPA, SPB, SPC y SPD), y poseen capacidad de proliferar (Rishi et al., 1995; Funaki et al., 1998; Costa et al., 2001; Williams, 2003). Esta compleja organización anatómica del pulmón se genera durante la organogénesis pulmonar siguiendo un programa predeterminado genéticamente, y guiado a nivel molecular por mecanismos celulares y moleculares que todavía no se conocen con detalle.



**Figura 2. Tipos de células epiteliales presentes en pulmón de ratón y sus marcadores moleculares.** A. Histología del pulmón de ratón. B. Dibujo esquemático de los diferentes tipos de células epiteliales del pulmón y sus marcadores típicos. Las células de Clara expresan la proteína secretora de clara (CCSP/Scgb1a1/CC10) (rojo), son abundantes en la región distal bronquiolar (4). Las células de Clara variantes son los presuntos precursores epiteliales de los bronquiolos (azul) (1,2). Las células ciliadas (verde) (3) son menos abundantes en las vías aéreas distales. Las células alveolares tipo 2 (5) o AEC2 se consideran precursores de las células epiteliales y de las células alveolares de tipo 1 o AEC1 que están presentes en la zona epitelial alveolar (Rawlins and Hogan, 2006; Morrissey and Hogan, 2010). bp, bronquiolo proximal; bt, bronquiolo terminal; al, zona alveolar; BADJ,

*bronchioalveolar duct junction; NEB, neuroendocrine bodies.*

## 1.2. Crecimiento y regeneración pulmonar: nichos y células madre

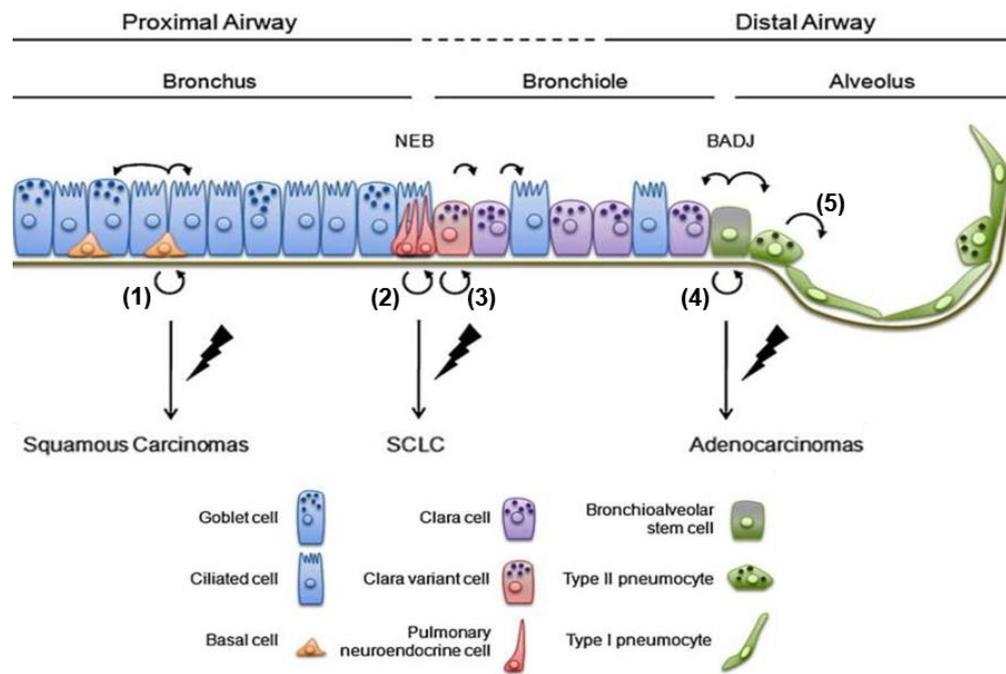
A lo largo de la vida, los organismos multicelulares deben generar nuevas células para mantener la integridad de sus tejidos, aunque la capacidad de reparación tras el daño del tejido puede fallar después de lesiones repetidas y con la edad. El pulmón adulto es un órgano vital y complejo que normalmente tiene tasas de renovación muy lentas y es uno de los pocos órganos que tiene una relación directa con el exterior. Las células epiteliales que recubren las vías respiratorias están constantemente expuestas a posibles agentes tóxicos y agentes patógenos, y por lo tanto debe ser capaz de responder rápida y eficazmente al daño (Volckaert et al., 2011; Vaughan and Chapman, 2013). Aunque el epitelio pulmonar adulto pertenece al grupo de los que se auto-regenera lentamente, se han identificado en el pulmón de ratones y de pacientes células madre progenitoras dispuestas en localizaciones concretas o nichos con capacidad de proliferar y diferenciarse siguiendo una jerarquía de linajes celulares (Allen and Spiteri, 2002; Rawlins and Hogan, 2006; Rawlins et al., 2008; Kajstura et al., 2011; Kadzik and Morrissey, 2012; Longmire et al., 2012; Mou et al., 2012) (Figura 3). Estos hipotéticos nichos de células madres pulmonares se corresponderían con las células basales de los bronquios, las células de los cuerpos neuroendocrinos (NEB), las células de Clara variantes (ClaraV) asociadas a los NEBs de los bronquiolos, las células de la zona de confluencia BADJ o células ClaraV del BADJ y, finalmente, las células AEC2. Una de las hipótesis más aceptadas sobre el linaje de las células epiteliales pulmonares sostiene que las células madre basales se pueden diferenciar en células mucosecretoras, células de Clara y células ciliadas; que las células ClaraV sirven de progenitoras de las células de Clara y de las células ciliadas bronquiolares, por último que las ClaraV del BADJ (CCSP<sup>+</sup>/Pro-SPC<sup>+</sup>) también generarían las AEC2 del epitelio alveolar. Adicionalmente, las células de Clara podrían trans-diferenciarse a células mucosecretoras y ciliadas en las vías aéreas, y las AEC2 poseerían la capacidad de generar las AEC1 en la zona alveolar. Por su parte, las células precursoras de los NEB constituirían un linaje neuroendocrino independiente del resto de tipos epiteliales pulmonares (Snyder et al., 2009; Eramo et al., 2010; Morrissey and Hogan, 2010; Rock et al., 2010; Sullivan et al., 2010) (Figura 3).

El proceso de regeneración celular del epitelio pulmonar adquiere una importancia adicional durante la reparación del tejido pulmonar después de sufrir un daño, sobre todo cuando éste es prolongado o crónico, ya que la reparación de este daño de una forma anómala puede resultar en una enfermedad respiratoria relevante. Un ejemplo lo constituyen los bebés y pacientes con síndrome de distrés respiratorio cuando se tratan con hiperoxia (respiración en concentraciones altas de oxígeno) para mantener su oxigenación adecuada. Si la hiperoxia es

corta, ésta causa daños epiteliales y endoteliales agudos que afectan sobre todo al epitelio alveolar, y que son fácilmente reparables. Sin embargo, si la exposición al oxígeno es prolongada puede generar edema pulmonar intersticial, con proliferación de células epiteliales y mesenquimales y posterior deposición de fibrina en focos del intersticio, que finalmente puede generar una displasia bronco-pulmonar. En el caso de las enfermedades respiratorias crónicas como el asma, EPOC, *bronquiolitis obliterans* y fibrosis, su origen está en diferentes tipos de daño prolongado del epitelio respiratorio, del mesénquima y de la vascularización. Este daño crónico genera un remodelado epitelio-mesenquima atípico con consecuencias devastadoras. Este remodelado se inicia con un descenso en el número de células de Clara, con hiperplasias y metaplasias de células mucosecretoras, prosigue con un engrosamiento de la membrana basal y del intersticio mesenquimal, e hipertrofia del músculo liso subepitelial. El proceso finalmente resulta en una generación de extensos nódulos fibróticos e inflamación generalizada del pulmón. Este daño e inflamación crónico inhibe a su vez la reparación/regeneración y la diferenciación epitelial normal a partir de las células progenitoras, generando un círculo vicioso de establecimiento y empeoramiento progresivo de la enfermedad (Tomasek et al., 2002; Kalluri and Neilson, 2003; Friedman, 2004; Wynn, 2007). Este efecto bien conocido en el epitelio bronquial y bronquiolar, también es extensible al compartimento alveolar cuando ocurre un daño crónico alveolar en las células AEC1 y AEC2 (Wynn, 2008). Según lo expuesto, las células madre epiteliales del pulmón poseen relevancia en el mantenimiento de la homeostasis de este órgano. Otro aspecto muy notable de la biología de estas células es su implicación en el origen del cáncer de pulmón. La acumulación de mutaciones en su ADN puede generar una célula madre cancerígena con capacidad de dividirse incontroladamente que la capacitaría para generar neoplasias pulmonares. Es más, se postula que dependiendo del nicho de células progenitoras afectado se originarían diferentes tipos de tumores primarios pulmonares: los escamosos o epidermoides a partir de las células basales bronquiales, los de células pequeñas (SCLC) a partir de células madre de los NEB, y los adenocarcinomas a partir de las células Clara variantes (Snyder et al., 2009; Eramo et al., 2010) (Figura 3).

En la zona alveolar las lesiones pulmonares provocan sobre todo muerte de las células AEC1, pero también conllevan lesiones en el intersticio y en el endotelio. Estas lesiones generan edema intersticial y la producción de citoquinas que inducen una respuesta inflamatoria aguda reclutando células inflamatorias, principalmente macrófagos. Secretan factores de crecimiento como TGFs, PDGFs, FGFs e IGF1, que inducen proliferación masiva de fibroblastos y células AEC2, vasculogénesis aberrante e inflamación crónica. Los fibroblastos se diferencian en miofibroblastos, que a su vez son grandes productores de IGF1 y retroalimentan una mayor proliferación y diferenciación de los fibroblastos. Si el daño continúa, se genera y progresa la fibrosis pulmonar que se caracteriza por un engrosamiento de los septos alveolares debido a la proliferación y diferenciación de fibroblastos, y su continua deposición de fibrina y colágeno generando una cicatrización persistente y finalmente fibrosis (Krein et al., 2003; Yamashita et al., 2005).

Sin embargo poco se conoce de los mecanismos moleculares de señalización que ocurren durante la auto-regeneración y regeneración tras daño en el pulmón adulto. Se supone que al menos en parte, estos mecanismos son comunes a los ocurridos durante la morfogénesis y diferenciación del pulmón fetal, y por lo tanto cabe suponer que los IGFs también son participantes activos.



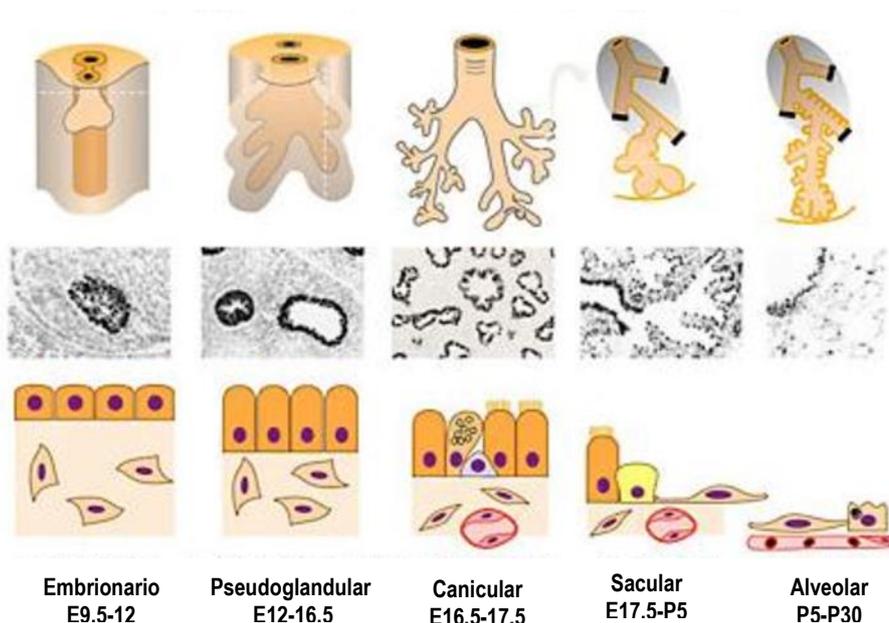
**Figura 3. Tipos celulares del epitelio pulmonar, sus hipotéticos nichos de células madre de auto-renovación e iniciación tumoral, y sus linajes celulares.** Arriba se representan los diferentes tipos celulares epiteliales que se organizan en las vías respiratorias según el esquema de abajo. Los hipotéticos nichos de células madre en el epitelio pulmonar adulto son: las células basales bronquiales (1); las células de los cuerpos neuroendocrinos (NEB) (2); las células de Clara variantes (ClaraV) asociadas a los NEBs de los bronquiolos (3); las células del BADJ (4); y las células alveolares de tipo 2 (AEC2) (5). También se representan sus linajes celulares, mediante flechas: las células basales generarían células de Clara, ciliadas y mucosecretoras en los bronquios, las Clara variantes de los NEB, células de Clara y ciliadas en los bronquiolos; y las Clara variante de los BADJ, células de Clara y ciliadas de los bronquiolos terminales, y también células alveolares. Las mutaciones en los distintos nichos de células madre originarían los diferentes tipos de tumores primarios pulmonares, las células basales serían el origen de los tumores escamosos o epidermoides, las de los NEB tumores de células pequeñas (SCLC) y los de las Clara variantes adenocarcinomas. (Eramo et al., 2010; Morrissey and Hogan, 2010). Modificado de (Sullivan et al., 2010).

### 1.3. Desarrollo embrionario del pulmón de ratón y su paralelismo con el humano

El pulmón de los mamíferos no comienza a funcionar hasta el momento del nacimiento. Sus componentes celulares mayoritarios son el epitelio alveolar y los vasos sanguíneos, cuya compleja interacción es fundamental para el desarrollo y función normal del pulmón. En su desarrollo participan de forma interrelacionada la morfogénesis del epitelio y del mesenquima, y la vasculogénesis, procesos que van acoplados a la diferenciación celular, maduración bioquímica y crecimiento físico. La organogénesis pulmonar se inicia en el periodo embrionario

con un proceso de morfogénesis donde predomina la ramificación de los conductos aéreos y se culmina postnatalmente con la alveolización o maduración de los alveolos.

El desarrollo embrionario del pulmón de ratón sigue cuatro etapas fetales principalmente morfogénicas denominadas: embrionaria, pseudoglandular, canalicular y sacular; y una etapa postnatal denominada alveolar (Figura 4). El periodo embrionario se inicia en el día embrionario E9,5 cuando el primordio pulmonar se genera desde el surco laringotraqueal mediante interacciones mesénquima-epitelio, en particular entre el mesodermo esplácnico y células epiteliales (derivados del endodermo del intestino anterior), que inducen la proliferación celular, la migración y la diferenciación, derivando en una ramificación morfogénica inicial del árbol respiratorio. En el estadio pseudoglandular, entre E12 y E16,5, mediante procesos morfogénicos de ramificación dicotómica, se desarrolla el árbol bronquial que está formado por células epiteliales indiferenciadas yuxtapuestas al mesodermo esplácnico; en el estadio canalicular, entre E16,5-E17,5, se inicia la formación de los sacos alveolares terminales y la vascularización; y en el estadio sacular, entre E17,5 y el quinto día después del nacimiento o día posnatal P5, el número de sacos terminales y de vasos sanguíneos aumenta considerablemente y se produce una diferenciación de células AEC1 y AEC2, que ya posibilita la respiración del neonato. Finalmente en el denominado estadio alveolar, que se inicia a partir de P5 y termina en P30, los sacos alveolares terminales se desarrollan y se forman los septos alveolares secundarios para generar los alveolos maduros (Ten Have-Opbroek, 1981) (Warburton et al., 2000) (Figuras 4 y 5).

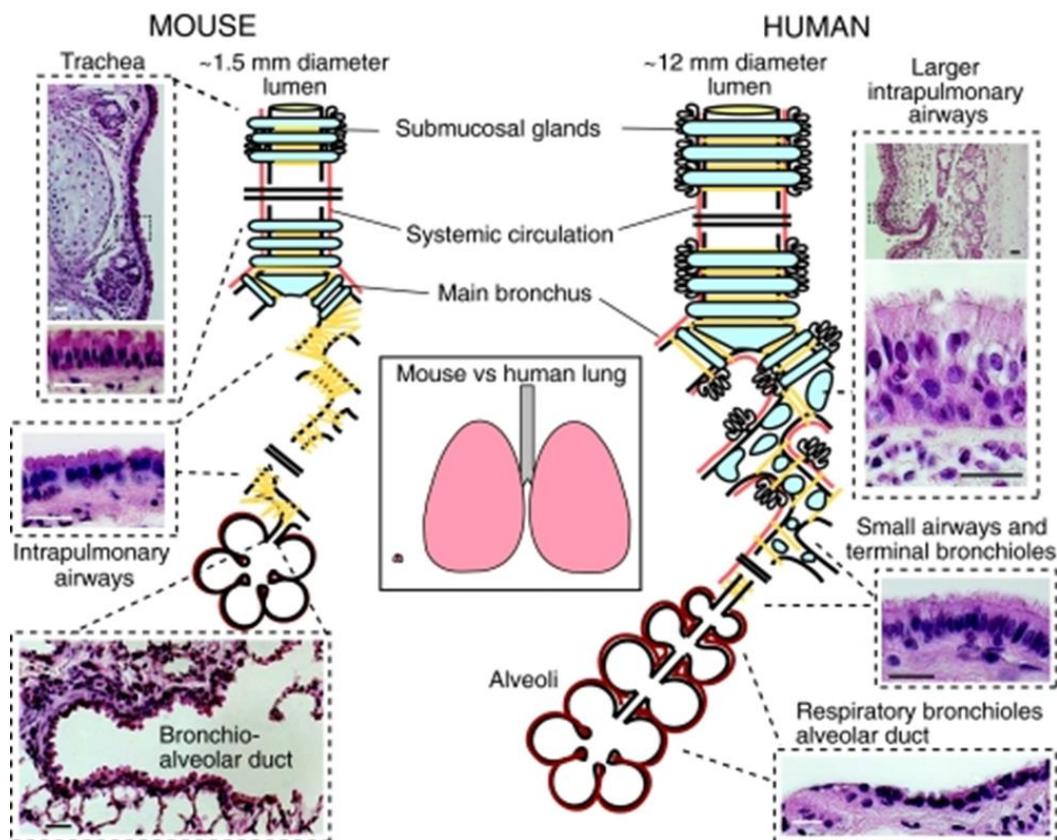


**Figura 4. Fases cronológicas y eventos clave durante el desarrollo de pulmón murino.** Clasificación de las fases del desarrollo prenatal y postnatal basada en características histológicas del pulmón. (<http://www.cincinnatichildrens.org/research/divisions/p/pulmonary-bio/labs/whitsett/projects/>)

En las tres etapas tempranas, que se extienden desde que se inicia su especificación en E9,5 hasta E17,5 el primordio pulmonar prolifera activamente y se organiza en una estructura epitelial tubular con ramificaciones dicotómicas rodeadas de acúmulos de células mesenquimales. Durante este periodo, el epitelio se mantiene relativamente indiferenciado con una forma cúbica o columnar que expresa desde E10 en adelante de forma casi generalizada el factor de transcripción Ttf1/Nkx2.1. A partir de E14 también expresa la proteína de las células de Clara aunque en una baja proporción (Zhou et al., 1996b).

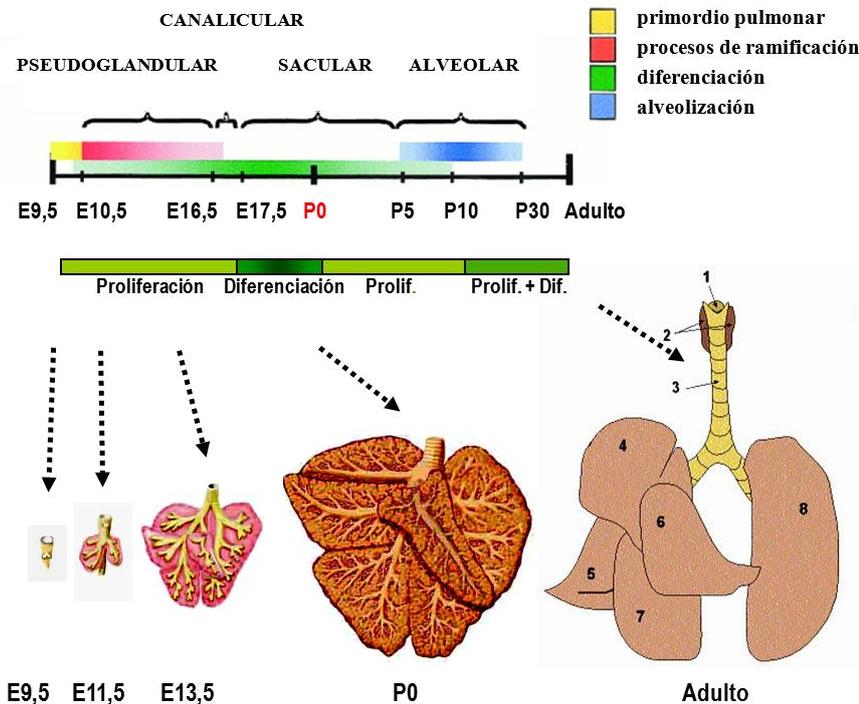
Como los ratones nacen alrededor de E19, el estadio sacular es uno de los más críticos del desarrollo pulmonar. En cuestión de minutos los pulmones pasan de ser órganos relativamente pasivos a realizar la compleja función fisiológica del intercambio de gases de las vías aéreas a los hematíes de la sangre (respiración). Durante este estadio el septo alveolar de la zona distal sufre una fuerte remodelación que afecta al mesénquima, vasos sanguíneos y al epitelio. Las regiones periféricas de los sacos alveolares se dilatan, la proporción de mesénquima se reduce y la vascularización sufre una profunda remodelación. La tasa de proliferación de las células decrece en este período y su diferenciación prevalece. Durante la subsecuente maduración en los días E18,5-E19, el septo alveolar se vuelve más fino debido a una reducción en la proporción de células mesenquimales, y los capilares sanguíneos tienden a disponerse de forma alineada y adheridos a las células epiteliales que bordean el lumen alveolar. El epitelio alveolar se diferencia rápidamente para formar dos tipos de células, las AEC2 y las AEC1. En este periodo sacular, las AEC2 se mantienen con forma cuboidal y son las responsables de la producción y secreción del surfactante pulmonar, una mezcla heterogénea de fosfolípidos y cuatro apoproteínas surfactantes (SP) (A, B, C y D) (Zhou et al., 1996b; Mendelson, 2000). Las AEC1 son células muy planas, que no se dividen y se responsabilizan del intercambio de gases entre los espacios aéreos y los capilares sanguíneos que se sitúan íntimamente unidos a ellas. Durante este estadio, las AEC1 aumentan en proporción revistiendo las paredes alveolares para permitir el intercambio gaseoso (Ten Have-Opbroek, 1981; Chinoy, 2003). En paralelo ocurre la remodelación de la microvasculatura y se minimiza la barrera aire-sangre en el septo alveolar mediante la fusión de las membranas basales de las AEC1 y las células del endotelio capilar. En esta fase también aumenta la diferenciación de células de Clara y de células ciliadas en las vías proximales. En el momento del nacimiento (P0), se producen cambios fisiológicos que desencadenan la expansión del tejido pulmonar, un aumento en el caudal respiratorio así como un aumento de células inmunes para contrarrestar la potencial llegada de patógenos. Durante este estadio, el número de células mesenquimales disminuye dramáticamente y los fibroblastos intersticiales aumentan significativamente la producción de material extracelular. Como consecuencia final, los sáculos terminales se dividen en múltiples alveolos maduros plenamente funcionales comunicados por poros. El epitelio alveolar diferenciado presenta un fenotipo molecular característico y por lo tanto expresa marcadores específicos muy útiles para los estudios de desarrollo y diferenciación del epitelio pulmonar. Al final de este proceso de desarrollo, el sistema

respiratorio está revestido con células epiteliales que poseen funciones pulmonares distintas, y que varían en su proporción y distribución desde el extremo proximal, hasta la zona alveolar distal (Ten Have-Opbroek, 1981; Warburton et al., 2000; Morrissey and Hogan, 2010; Warburton et al., 2010) (Figuras 1 y 3). Tras el nacimiento el desarrollo del pulmón continúa con la alveolización, etapa alveolar entre P5 y P30, proceso que conlleva un aumento del área para el intercambio gaseoso en los sáculos terminales mediante el desarrollo de nuevos septos muy estrechos (septos secundarios) que sucede durante la maduración de los sáculos respiratorios terminales a los conductos y sáculos alveolares definidos. Para que todos estos procesos ocurran adecuadamente las interacciones epitelio-mesénquima, la proliferación, diferenciación y destino celular están estrictamente regulados mediante mecanismos celulares y moleculares aun no del todo conocidos (Ten Have-Opbroek, 1981; Warburton et al., 2000; Morrissey and Hogan, 2010; Warburton et al., 2010).



**Figura 5. Esquema representativo de la estructura y de la organización epitelial del pulmón murino, y su correspondencia en humanos.** Panel de la izquierda: pulmón de ratón. La tráquea presenta un diámetro interno de ~1,5 mm, está revestida por un epitelio pseudoestratificado con cerca de un 55% de células ciliadas, 30% células basales, células secretoras y algunas células neuroendocrinas. En el ratón, hay aproximadamente de seis a ocho generaciones de ramificaciones de las vías respiratorias. En estas vías respiratorias, el epitelio es simple y columnar. Panel derecho: pulmón humano. La tráquea humana posee un promedio de diámetro interno de ~12 mm y presenta un epitelio pseudoestratificado. La generación de ramificaciones intrapulmonares es más abundante que en el ratón y los bronquiolos respiratorios están recubiertos por un epitelio cuboidal simple (Rock et al., 2010).

La histología y la fisiología del pulmón aunque poseen unos patrones similares varían entre diferentes especies de mamíferos. De esta forma la arquitectura alveolar y las vías respiratorias son distintas entre ratones y seres humanos (Shapiro, 2006; Ware, 2008). Una de las diferencias más notables entre humanos y murinos está en la extensión y organización del árbol respiratorio. Mientras que los ratones tienen 6-8 generaciones de ramificación de las vías respiratorias, en los humanos existen 20 o más (Metzger et al., 2008). La tráquea presenta un diámetro mucho más pequeño en ratones que en humanos, y aunque ambos poseen un epitelio pseudoestratificado, en ratones éste es constituido mayoritariamente por células ciliadas, aunque exprese también células basales, células secretoras y células neuroendocrinas. En humanos la proporción de células ciliadas, células secretoras y células basales en la tráquea es igual. En los bronquiolos del ratón el epitelio es simple y columnar, mientras que en humano el epitelio es simple y cuboidal. La mayoría de las células secretoras en los ratones tienen gránulos citoplasmáticos densos y superficies apicales en forma de cúpula que secretan altos niveles de proteína de Clara (Mercer et al., 1994), las células basales no existen y las *globet cells* son poco abundantes. En contraste en humanos las células de Clara se limitan a los bronquiolos de las vías respiratorias y las *globet cells* son el tipo de célula secretora predominante en la vía aérea traqueobronquial. En ambas especies el músculo liso rodea las vías respiratorias, pero en humanos éste junto con las placas de cartílago rodean las vías respiratorias intrapulmonares y se extienden más distalmente, mientras que en ratones no hay placas de cartílago, y los bronquiolos terminales que conducen al interior del conducto bronquio-alveolar tienen mayor proporción de células ciliadas. Además en ratones los bronquiolos terminales se abren directamente a los alveolos, mientras que en los seres humanos son los bronquiolos respiratorios los que terminan en los conductos alveolares y éstos a su vez desembocan en los alveolos (Mercer et al., 1994) (Figura 5). Asimismo, aunque, las cinco etapas del desarrollo del pulmón coinciden en nombre y evolución, en los humanos y en el ratón, se diferencian en cuanto a la extensión y relación con el periodo fetal. Así, mientras en humanos el estadio alveolar comienza en el útero y ya se encuentra muy avanzado en el momento del nacimiento, en murinos la alveolarización es un evento completamente postnatal (Burri, 2006). De este modo los ratones nacen con los pulmones en el estadio sacular, todavía inmaduros mientras que en los humanos el pulmón está ya en un estadio alveolar avanzado, y más maduro. No está de más añadir que en el desarrollo pulmonar humano en cada una de esas etapas existen posibilidades de malformaciones congénitas asociadas con el crecimiento anormal del pulmón (Kotecha, 2000; Joshi and Kotecha, 2007) (Figura 6).



**Figura 6. Etapas del desarrollo del pulmón de ratón, y su correspondencia en humanos.** En la parte superior se representan las cinco fases del desarrollo prenatal y postnatal del pulmón murino en relación a la edad en días embrionarios (E), o postnatales (P). Las barras y gradientes de color reflejan la progresión temporal de los eventos morfogenéticos clave según se indican en los códigos de colores. La barra verde inferior representa la relación de predominancia entre proliferación y diferenciación pulmonar. Los dibujos inferiores representan la morfología, no a escala, del pulmón de ratón en los estadios de la organogénesis que se indican. En el recuadro sombreado y en azul se representa la equivalencia de las etapas con el estadio de desarrollo pulmonar en humanos, expresado en semanas (S) durante el período fetal y en meses (M) en el período postnatal. P0 en ratón y S40 en humanos, ambos en rojo, indican el estadio de desarrollo en que se encuentra el pulmón en el momento del nacimiento. En el estadio adulto de ratón se enumeran diferentes partes: laringe (1), tiroides (2), tráquea (3), los lóbulos del pulmón derecho (4, craneal; 5, medio; 6, accesorio; y 7, caudal), y pulmón izquierdo (8) (Modificado de (Kaufman, 1999; Cardoso, 2000)).

## 2. La función de los IGFs en el pulmón

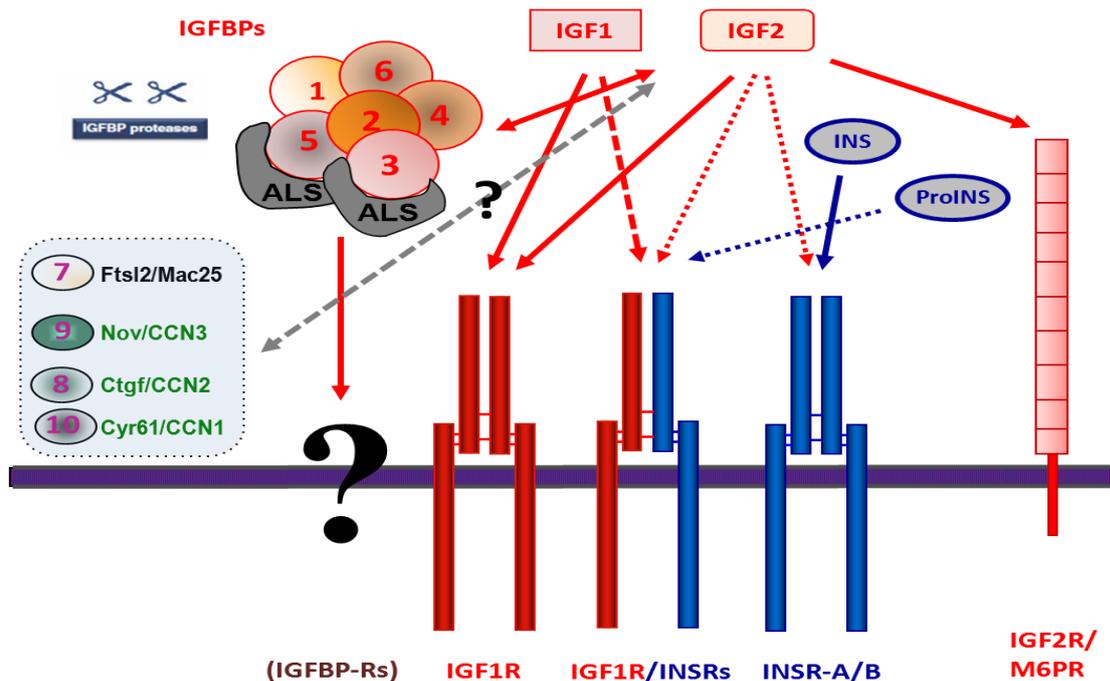
### 2.1. El sistema de los IGFs: componentes, señalización y función

El denominado sistema de señalización celular de IGFs/Ins incluye los ligandos IGF1, IGF2, insulina y proinsulina, sus receptores de membrana, el receptor de IGFs de tipo 1 (IGF1R), el receptor manosa 6-fosfato/receptor de IGF2 (IGF2R), el receptor de la insulina (InsR) y también un grupo de seis proteínas que unen IGFs o IGFbps de alta afinidad (IGFBP1-6) y sus proteasas (LeRoith et al., 1992; Le Roith, 2003; LeRoith and Roberts, 2003; Pollak, 2008; Massoner et al., 2010; Annunziata et al., 2011; Pollak, 2012) (Figura 7). Un

receptor adicional del sistema IGFs es el receptor relacionado con la insulina (Insrr). Sin embargo poco se sabe acerca de este receptor y de su ligando o ligandos (Shier and Watt, 1989; Klammt et al., 2005).

Los IGFs (IGF1 e IGF2) ejercen su acción al interactuar con IGF1R. La interacción de los ligandos con el receptor está estrechamente regulada por las IGFBPs que unen los IGFs específicamente con alta afinidad para controlar su biodisponibilidad por el receptor (Jones and Clemmons, 1995; Holly and Perks, 2006). IGF1R posee alta homología con el Insr, y está formado por dos subunidades  $\alpha$  extracelulares que reconocen los ligandos, y dos subunidades  $\beta$  ancladas a la membrana con una parte intracelular con actividad tirosina quinasa. La homología entre los receptores IGF1R e Insr permite la formación de receptores híbridos y la señalización cruzada de sus respectivos ligandos (Figura 7). IGF2R se comporta como un transportador de IGF2 que lo internaliza intracelularmente para su degradación en los lisosomas. Además se han descrito múltiples funciones supresoras tumorales (LeRoith et al., 1992; Le Roith, 2003; LeRoith and Roberts, 2003; Pollak, 2008; Massoner et al., 2010; Annunziata et al., 2011; Pollak, 2012).

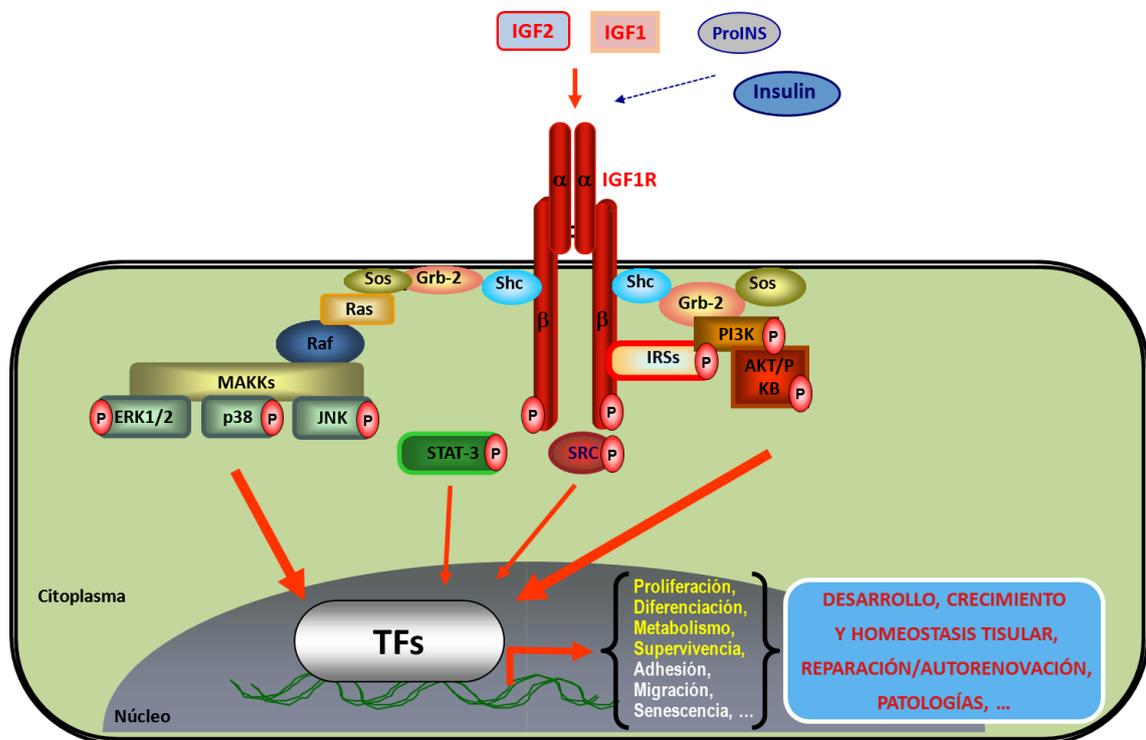
En este contexto y por la relevancia que tendrán en esta Tesis, vamos a introducir aquí las proteínas matricelulares Ftsl2/Mac25, Nov/CCN3, Ctgf/CCN2 y Cyr61/CCN1. Estas proteínas se consideraron en su día IGFBPs de baja afinidad denominándose IGFBP-7 a IGFBP-10, respectivamente (Figura 7), por poseer dominios estructurales muy semejantes a las IGFBP-1 a 6 de alta afinidad (Perbal, 2004; Holbourn et al., 2008; Rodgers et al., 2008; Holbourn et al., 2009). Estas proteínas tienen funciones reguladoras en células de diferentes tejidos. También han sido implicadas en el desarrollo del pulmón y en algunas de sus patologías como la fibrosis y cáncer. Sin embargo aunque su afinidad por los IGFs se ha estimado en 2-3 órdenes de magnitud inferior a las IGFBPs de alta afinidad, su capacidad para unirse a los IGFs y modular su actividad está todavía en discusión. (Kim et al., 1997; Brigstock, 2003; Chen and Lau, 2009).



**Figura 7. Interrelación funcional de los componentes señaladores del sistema de IGFs a nivel de la membrana celular, señalización cruzada con la vía de la insulina e hipotética relación con las IGFBPs de baja afinidad.** Los componentes del sistema IGFs se representan en rojo e incluyen los dos ligandos extracelulares IGF1 e IGF2, los receptores de membrana IGF1R e IGF2R, y las seis IGFBPs de alta afinidad que pueden interaccionar con la proteína Subunidad Ácido Lábil (ALS) y sus proteasas. En azul se representa la insulina (Ins), su precursor la pro-insulina (ProIns) y su receptor (InsR-A/B), que puede formar receptores híbridos con IGF1R (IGF1R/InsRs). Encuadrados en punteado se representan las proteínas matricelulares denominadas IGFBPs de baja afinidad 7 a 10. (Modificado de (LeRoith and Roberts, 2003; Pollak, 2008; Annunziata et al., 2011)).

Como se ha mencionado anteriormente la acción de los IGFs, en general modulada negativamente por las IGFBPs, se ejecuta a través de IGF1R. Después de unir el ligando, IGF1R se autofosforila y a su vez modifica y fosforila otros residuos de tirosina de las regiones que flanquean el dominio quinasa (Ullrich et al., 1986; Duan, 2002; Duan et al., 2010). Dichas tirosinas fosforiladas funcionan así como sitios de anclaje para proteínas con dominios SH2 como el sustrato del receptor de insulina (IRS) y otras proteínas adaptadoras como Shc. La fosforilación de estos adaptadores por IGF1R permite reclutar otros factores como Gbr2/SOS, que a su vez activan las vías de Ras/MAP quinasa y también la vía PI(3)K/Akt, cascadas importantes de transducción de señales de los IGFs (Adams et al., 2004; Cohen, 2006; Taniguchi et al., 2006; Laviola et al., 2007; Chitnis et al., 2008; Fukushima et al., 2012). Aunque las proteínas IRS y Shc integran la activación de estas dos cascadas, se han descrito otros factores, como las proteínas STAT3 o Grb10 que han demostrado interaccionar o estar involucrados de alguna forma en la acción de IGF1R (Morrione et al., 1996; He et al., 1998; Zong et al., 2000; Lim et al., 2004). Las dianas últimas de estas cascadas incluyen diferentes familias de factores de transcripción. La regulación de éstos proporciona el mecanismo mediante el cual la acción que los IGFs ejercen sobre la superficie de la célula puede dar lugar a cambios en la expresión génica que eventualmente modifican diferentes actividades celulares

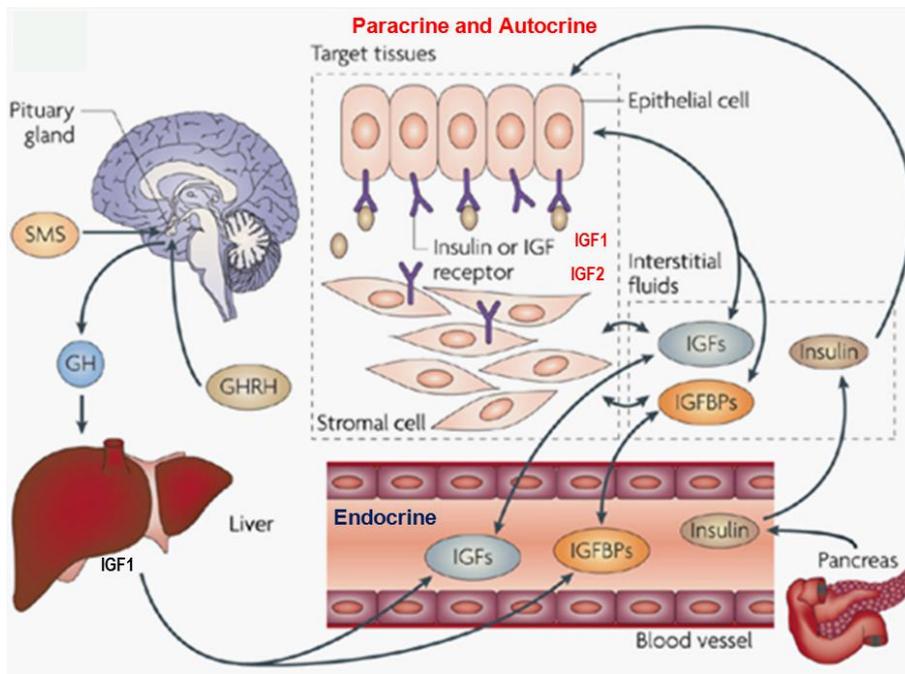
como proliferación, diferenciación y apoptosis, entre otras (LeRoith and Roberts, 2003; Pollak, 2008; Annunziata et al., 2011) (Figura 8).



**Figura 8. Vías de señalización canónicas mediadas por IGF1R, y respuestas celulares e implicaciones funcionales.** IGF1 e IGF2 se unen a IGF1R, iniciando la señalización principalmente a través de la ruta de las MAP quinasas y PI3 quinasa, que en general induce la estimulación de la progresión del ciclo celular, proliferación, inducción de la diferenciación celular, aumento de la traducción de proteínas y el crecimiento en cada momento de la célula, e inhibición de la apoptosis, resultando en un descenso de la supervivencia celular. Estas respuestas originan implicaciones funcionales durante el desarrollo, en la homeostasis tisular, reparación y autorenovación de los tejidos, y en sus patologías. Sin embargo estas acciones pueden cambiar dependiendo del tipo celular y de su "status quo". (Modificado de (LeRoith and Roberts, 2003)).

El funcionamiento del sistema de IGFs implica complejas redes reguladoras que operan en todo el organismo, a nivel tisular, celular y subcelular. Así IGF1 tiene características tanto de hormona circulante, como características de factor de crecimiento de tejidos. La mayor parte del IGF1 que se encuentra en la circulación es producido por el hígado. Inicialmente, se suponía que prácticamente todo el IGF1 se originaba en este órgano y era transportado por los mecanismos endocrinos a los sitios de acción. Sin embargo hoy se sabe que IGF1 también se sintetiza localmente en otros órganos donde los mecanismos de acción autocrinos o paracrinos locales son incluso más relevantes que su función endocrina. Los niveles endocrinos de IGFs producidos en el hígado están regulados postnatalmente por la hormona del crecimiento hipofisaria y desde hace tiempo se sabe que alteraciones en la producción de la hormona del

crecimiento en humanos afecta a los niveles circulantes de IGF1 en estadios postnatales (LeRoith and Yakar, 2007; Pollak, 2008) (Figura 9).



**Figura 9. Mecanismos de señalización de los IGFs y de la insulina a nivel del organismo.** Los IGFs (IGF1 e IGF2) pueden llegar a los tejidos de forma endocrina por la sangre unidos a las IGFFBPs. Su origen principal es el hígado, sobre todo en el caso de IGF1 que se produce bajo el control dominante de la hormona del crecimiento. En el caso de la insulina su única fuente es la endocrina, producida por el páncreas, mientras que los IGFs son también producidos por los propios tejidos en donde muy frecuentemente actúan de forma autocrina y paracrina a través de su receptor. GH, hormona del crecimiento; GHRH, Hormona liberadora de la GH; SMS, somatostatina (Pollak, 2008).

Los IGFs se expresan de forma auto/paracrina prácticamente en casi todos los tejidos durante el desarrollo embrionario, aunque su producción y disponibilidad está regulada de forma muy estricta en el tiempo y en distintos tipos celulares (LeRoith et al., 1992; LeRoith and Yakar, 2007; Annunziata et al., 2011). Se sabe que la acción de IGF1 resulta crucial en el desarrollo de ciertos órganos, entre ellos el pulmón, donde resulta crítico para su crecimiento y desarrollo normal. Además estimula la proliferación celular tal y como demuestran los estudios iniciales en fibroblastos de pulmón embrionario de rata (Stiles and Moats-Staats, 1989). IGF1 promueve la proliferación y el crecimiento celular, previene la apoptosis, estimula la diferenciación y también regula otros procesos como adhesión, migración, supervivencia y metabolismo en múltiples tipos celulares (Reiss et al., 1992; Pavelic et al., 2007; Duan et al., 2010; Kermani et al., 2012; O'Kusky and Ye, 2012). Durante la organogénesis prenatal de roedores se expresa en múltiples tejidos y órganos, incluyendo el pulmón, y posnatalmente también juega un papel muy importante en el crecimiento general del organismo (Klempt et al., 1992; Costa et al., 2001; Li et al., 2007; Maeda et al., 2007).

De manera similar a IGF1, IGF2 también se produce tanto en el hígado como en los tejidos extra hepáticos, pero su expresión no está estrechamente regulada por la hormona del crecimiento. IGF2 tiene acciones proliferativas y antiapoptóticas similares a las de IGF1 y también juega un papel fundamental en el crecimiento embrionario, como lo demuestran los estudios realizados en ratones *Igf2*<sup>-/-</sup>, que aunque sobreviven, siguen siendo más pequeños comparativamente a los de tipo salvaje (DeChiara et al., 1990; DeChiara et al., 1991; Silva et al., 2006). En condiciones normales *Igf2* no se expresa en los ratones después del nacimiento, sin embargo, en los humanos se expresa a lo largo de la vida y aunque su actividad está regulada por la impronta genómica, en la mayoría de los tejidos normales el gen se inactiva en el cromosoma heredado de la madre (Giannoukakis et al., 1993). También es un importante modulador del crecimiento y de la diferenciación del músculo y se ha demostrado que se sobreexpresa en la neoplasia colorrectal y en otros tipos de cáncer (Reeve et al., 1985; Pollak, 2008; Ren et al., 2008). La mayor parte de estas funciones se ejercen a través de IGF1R (Jones and Clemmons, 1995; LeRoith et al., 1995; Laviola et al., 2007).

Los ratones deficientes en *Igf1r* presentan un retraso en su crecimiento prenatal, exhibiendo múltiples anomalías en la diferenciación de sus tejidos, y se mueren al nacer (Liu et al., 1993). La alteración de IGF1R en tejidos o células específicas, tales como osteoblastos (Zhang et al., 2002), músculo esquelético (Fernandez et al., 2002), y células  $\beta$  (Kulkarni et al., 2002) reveló un papel esencial de la señalización de IGF1R en la diferenciación y el crecimiento. IGF1R también posee un importante papel en el proceso de envejecimiento. Esta línea de investigación adquirió importancia con los trabajos del grupo de la Dra. Cynthia Kenyon, que mostró que las mutaciones en el gen *daf-2*, único gen insulínico tipo 1 en *C. elegans* homólogo a los receptores de IGFs/Ins, podría duplicar la vida de esta especie de gusano (Dorman et al., 1995; Apfeld and Kenyon, 1998). Existen también evidencias experimentales que demuestran la relación entre la señalización mediada por *Igf1r* y la esperanza de vida en ratones (Dupont and Holzenberger, 2003a, b; Holzenberger et al., 2003; Narasimhan et al., 2009), aunque recientemente otros autores ponen en duda estos resultados (Bokov et al., 2011).

## 2.2. Los IGFs en el desarrollo pulmonar

### 2.2.1. Expresión de los IGFs durante la organogénesis del pulmón

La morfogénesis y diferenciación del pulmón son el resultado de la activación de una compleja red de moléculas de señalización en los diferentes tipos celulares que forman este órgano. La expresión local de estas señales moleculares determina el patrón de ramificación de las vías respiratorias y la presencia de los distintos tipos de células del árbol traqueobronquial y los alveolos durante el desarrollo embrionario. Entre éstas destacan moléculas con funciones reguladoras como factores de transcripción, factores de crecimiento extracelulares, moléculas de

la matriz y enzimas reguladoras de las cascadas de transducción de señales, y entre ellas también podemos incluir los IGFs (Ikeda et al., 1995; Zhou et al., 1996b; Warburton et al., 2000; Kalinichenko et al., 2001; Chinoy, 2003; Pollak, 2008; Warburton et al., 2010; Pollak, 2012).

Las proteínas del sistema de IGFs se expresan de forma endógena en el pulmón, y son importantes mitógenos que intervienen en el desarrollo y crecimiento pulmonar (Batchelor et al., 1995; Nagata et al., 2007). En el pulmón humano tanto durante el desarrollo como en el adulto, los IGFs se expresan en los diferentes tipos celulares mayoritarios de este órgano como epitelio, endotelio, mesénquima y células inflamatorias (Wallen and Han, 1994; Schuller et al., 1995; Retsch-Bogart et al., 1996; Srinivasan et al., 2002; Han et al., 2003; Krein et al., 2003; Delafontaine et al., 2004; Inanlou et al., 2005; Inanlou and Kablar, 2005; Warnken et al., 2010).

Estudios inmunohistoquímicos en el ratón han ratificado la existencia de la proteína IGF1 tanto en epitelio como en el área mesenquimal del pulmón de embriones E14,5, E16,5 y E18,5 (Wallen and Han, 1994; Schuller et al., 1995; Retsch-Bogart et al., 1996; Cao et al., 2003; Han et al., 2003; Inanlou and Kablar, 2005). Del mismo modo mediante el análisis de ARNm también se observó que *Igf1* se expresa tanto en células mesenquimales como en epiteliales. Varios autores describen la presencia de ARNm de *Igf1* en los pulmones embrionarios y postnatales en todas las edades, mientras que el ARNm de *Igf2* estaba presente sólo en los pulmones prenatales (Batchelor et al., 1995; Maitre et al., 1995; Schuller et al., 1995). Datos más recientes obtenidos mediante qPCR revelan la expresión de *Igf1* en el pulmón murino desde el día E11,5 hasta E18,5. Por su parte, aunque ubicua, la expresión del ARNm de *Igf1r* se ha descrito que es alta alrededor del día E18,5 (Nagata et al., 2007).

La presencia de ARNm de *Igfbp-2*, *-4* y *-5* se ha descrito en el pulmón embrionario de ratón desde el día E12,5 en adelante y dado que sus patrones de expresión cambian de forma dinámica durante el desarrollo embrionario, se ha sugerido que cada uno de estos genes puede tener una función concreta en el pulmón murino (Maitre et al., 1995; Schuller et al., 1995).

### 2.2.2. Funciones de IGFs en desarrollo pulmonar: los ratones mutantes

La relevancia de los IGFs durante el desarrollo y diferenciación de los diferentes tipos celulares pulmonares lo demuestran los fenotipos de los ratones mutantes *knockout* de estos genes.

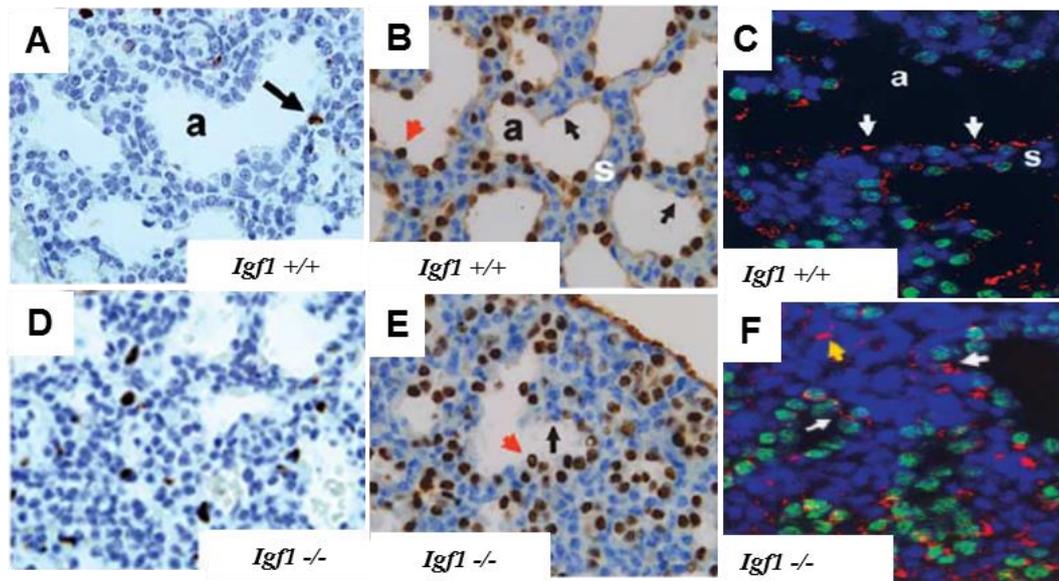
La eliminación funcional de los genes *Igf1r* e *Igf1* en ratones provoca un retraso del crecimiento embrionario y postnatal, con hipoplasia pulmonar marcada (Liu et al., 1993): un 45% del peso de los normales en el caso de los ratones deficientes de *Igf1r* y un 60% en los mutantes para *Igf1* e *Igf2* (Baker et al., 1993; Louvi et al., 1997). Los *Igf1r*<sup>-/-</sup> se mueren todos al nacer, mientras que en los *Igf1*<sup>-/-</sup> la mortalidad depende del fondo genético. Esta mortalidad postnatal se ha atribuido a un posible fallo respiratorio, apoyando la función del sistema IGF en

el desarrollo pulmonar (Liu et al., 1993; Powell-Braxton et al., 1993a; Pichel et al., 2003; Moreno-Barriuso et al., 2006; Pais, 2013).

Los ratones deficientes de IGF1R poseen un fenotipo pulmonar muy acusado, con pulmones muy hipoplásicos, y atelectáticos que posiblemente le causen insuficiencia respiratoria y su muerte, ya que evidencian síntomas de cianosis, respiración agónica e hipoxia (Liu et al., 1993; Holzenberger et al., 2000; Epaud et al., 2012). En un trabajo reciente del grupo del Dr. Holzenberger se describe en detalle la caracterización del fenotipo pulmonar en los embriones prenatales *Igf1r*<sup>-/-</sup>. Es importante destacar que, a diferencia del corazón, hígado y riñón, la relación del peso del pulmón con respecto al peso corporal está fuertemente reducida entre los estadios E17,5 y E19,5. Esta progresiva hipoplasia pulmonar está asociada a un aumento de la proliferación y de la apoptosis celular. A nivel histológico presenta un aspecto inmaduro, con una densificación del parénquima y reducción de espacios alveolares dando la impresión que el desarrollo pulmonar se detiene en el estadio cananicular, sin progresar al sacular. Este aumento en la proliferación y muerte celular afecta a las células endoteliales, mesenquimales y epiteliales, pero no está claro si la inactivación de IGF1R afecta a todos los compartimentos en la misma medida. La inmadurez prenatal de los ratones *Igf1r*<sup>-/-</sup> también está reflejada por los análisis de marcadores celulares específicos del pulmón que demuestran que los procesos de diferenciación del parénquima pulmonar se retrasan significativamente. A su vez, la densidad de células endoteliales es significativamente menor en el parénquima pulmonar de los ratones *Igf1r*<sup>-/-</sup>, poseen una red microvascular menos desarrollada, y el epitelio alveolar también es inmaduro con abundante presencia de células cubicas de tipo AEC2 y baja proporción de las AEC1. En estos animales el mesénquima entre sáculos es notablemente más grueso, el número de brotes acinares menor y los espacios aéreos saculares notablemente más pequeños. Por último los autores concluyen que la gran actividad mitótica observada en sus pulmones podría explicar la disminución del espacio de las vías respiratorias y el colapso alveolar (Liu et al., 1993; Epaud et al., 2012).

La mutación de *Igf1* en los ratones mutantes *Igf1*<sup>-/-</sup>, provoca también un retraso del crecimiento que afecta al esqueleto y a otros órganos. El crecimiento embrionario de estos ratones comienza a ralentizarse a partir de E12,5-E13,5 agravándose conforme avanza el desarrollo, de forma que el peso de los ratones mutantes *Igf1*<sup>-/-</sup> en el nacimiento es el 60% menos del peso del resto de los animales de la camada (Liu et al., 1993; Powell-Braxton et al., 1993b; Beck et al., 1995; Cheng et al., 1998; Pichel et al., 2003; Moreno-Barriuso et al., 2006). En un estudio comparativo de pesos de varios órganos durante el desarrollo postnatal los pulmones de los ratones *Igf1*<sup>-/-</sup> son los órganos que presentan el mayor déficit de peso (Wang et al., 1999). El fenotipo de estos ratones mutantes de *Igf1* es muy dependiente del fondo genético. Así, su mortalidad neonatal aumenta desde un 60% en fondos genéticos mixtos hasta un 100% en el fondo genético C57Bl/6. De igual forma el fenotipo pulmonar que es muy variable en fondos mixtos, se uniformiza en el fondo genético C57Bl/6 (Liu et al., 1993; Pichel et al., 2003; Moreno-Barriuso et al., 2006; Pais, 2013). Al igual que los embriones *Igf1r*<sup>-/-</sup>, los

*Igf1*<sup>-/-</sup> también muestran hipoplasia pulmonar y muscular, lo que también explicaría su dificultad respiratoria y la alta mortalidad (Powell-Braxton et al., 1993a; Pichel et al., 2003). El fenotipo pulmonar de los ratones mutantes *Igf1*<sup>-/-</sup> ha sido objeto de estudio por nuestro grupo de investigación durante los últimos años. Los pulmones de estos ratones presentan hipoplasia desproporcional con el resto de tejidos, mayor proliferación, y alteraciones en la maduración del epitelio alveolar, en la vascularización y en la maduración mesenquimal. Al igual que ocurría en los pulmones de los ratones *Igf1*<sup>r/-</sup> en los embriones de estos mutantes, los pulmones son muy compactos, con septos engrosados y espacios aéreos disminuidos y colapsados, lo que probablemente imposibilita la respiración al nacer. La red vascular se encuentra distribuida de forma más difusa por los engrosados septos alveolares donde se encuentran vasos sanguíneos más gruesos inmersos en regiones mesenquimales. De este modo conservan capilares de mayor diámetro no adheridos al epitelio alveolar y un aumento en la proporción de granulocitos pulmonares. La falta de remodelación capilar observada en los pulmones de los ratones *Igf1*<sup>-/-</sup> podría atribuirse a un deterioro y/o retraso en la diferenciación del mesénquima y endotelio. Las alteraciones en la diferenciación del epitelio en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> está reflejada por la reducción en la expresión de ARNm de marcadores de células AEC2 y AEC1. La presencia de células epiteliales con características de tipo 2 es elevada en éstos ratones, según lo evaluado por inmunotinción con los anticuerpos precursores Ttf1 y SPC. La expresión elevada de Ttf1 es indicativa de un retraso y/o maduración alveolar alterada, y la reducción de AQP5 y T1 $\alpha$  observada en estos animales es indicativo de un arresto en la diferenciación de las AEC1 (Moreno-Barriuso et al., 2006) (Figura 10). Además, estudios más recientes han demostrado que la carencia de *Igf1* en los ratones E18,5 provoca alteraciones en la expresión de laminina, colágeno y fibras elásticas, indicando alteraciones en la producción y organización de componentes de la matriz extracelular. La deposición de la laminina se aprecia más tenue y esporádicamente discontinua en la lámina basal de la zona mesenquimal. Las alteraciones en la distribución de colágeno se observa como una red proteica laxa. También se distingue una reducción del grosor de las fibras elásticas y del músculo liso en las arterias (Pais, 2013).



**Figura 10. Alteraciones en la proliferación, diferenciación de las células epiteliales alveolares y remodelación de la vascularización en los pulmones de embriones prenatales de ratones deficientes de *Igf1*.** Secciones transversales de pulmones de fetos de ratón en estadio embrionario terminal (E18,5) bien normales (*Igf1*<sup>+/+</sup>) (A-C), o mutantes para *Igf1* (*Igf1*<sup>-/-</sup>) (D-F) fueron inmunoteñidas para: la determinación de incorporación de BrdU (células marcadas en negro, flecha) en las células que se han dividido (A y D); para la expresión de Ttf1/Nkx2.1 (flechas rojas en B y E) un marcador de las células epiteliales alveolares AEC2, teñidas de marrón y para la expresión de CD31/PECAM, un marcador de células epiteliales (teñidas de rojo en C y F). En estas dos últimas figuras además se aprecia en verde células Ttf1+, en azul los núcleos marcados con DAPI, el epitelio alveolar (flechas blancas) y mesénquima (flechas amarillas). a, zona alveolar; s, septo. (Moreno-Barriuso et al., 2006).

Mediante el análisis molecular de la expresión transcripcional diferencial usando microarrays de ARN se han identificado grupos de genes con expresión dependiente de IGF1 durante la diferenciación pulmonar prenatal. Estos genes se corresponden con funciones biológicas de crecimiento celular y morfogénesis pulmonar, o con las vías de señalización de MAP-kinasa, Wnt, adhesión y defensa celular, e inflamación. Algunos de los genes con cambios más significativos de expresión y que además poseen capacidad reguladora, como factores de transcripción, factores de crecimiento, o factores de matriz extracelular, ya habían sido previamente implicados en el desarrollo pulmonar (Pais, 2013) (Tabla 1).

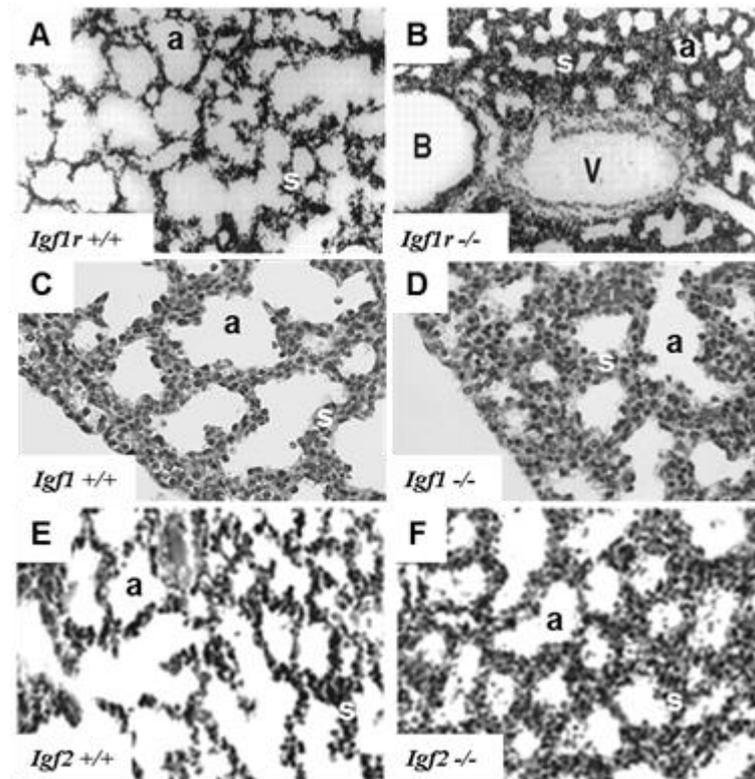
**Tabla 1. Genes reprimidos y sobreexpresados con FDR<0.10 en pulmones E18.5 *Igf1*<sup>-/-</sup> obtenidos del análisis de los microchips de Affimetrix (Pais, 2013).**

DOWNREGULATED GENES	UPREGULATED GENES
<b>ADHESION / ECM</b> - Plat (tPA), Dpt, Chi3l1, Itgb6*, Msln	<b>BIOSYNTHESIS</b> - Gas5*, Rpl30*, Rps9, Rps10, Rpl12*
<b>VASCULAR DEVELOP.</b> - Cyr61 (CCN1, Igfbp10)*, Klf2*, Ctgf (CCN2, Igfbp8)*, Vegfa*, Xlkd1	<b>INMUNITY / DEFENSE</b> - H2-Aa*, Gzma, Slfn1
<b>LUNG DEVELOPMENT</b> - Fgf18*, Aqp5	<b>STRESS</b> - Nsep1 (Yb-1), Map2k7 (Jnkk2), Hspa8*
<b>DEVELOPMENT</b> - Wnt7a*, Klf6*	<b>LUNG DEVELOPMENT</b> - Nfib*
<b>INMUNITY / DEFENSE</b> - Lcn2, Kitl*, Zfp36*	<b>OTHER</b> - Pcsk6 (Pace4), Upk3a, Cox7c, Bdh
<b>MAPK/STRESS</b> - Fos*, Nr4a1*, Jun*, Dusp1*, Egr1*	
<b>ERITROPOIESIS</b> - Slc4a1*, Gypa*, Eraf*	
<b>CALCIUM METABOLISM</b> - s100a14*, Dscr1	
<b>TUMOR SUPPRESSORS</b> - Scgb3a1 (HIN1)*, Btg2 (TIS21)*	
<b>OTHER</b> - PnpO, Fech, Mkm1, Slc25a37	

\* Genes cuya expresión ha sido validada mediante qRT-PCR

A diferencia de los ratones *Igf1*<sup>-/-</sup> e *Igf1r*<sup>-/-</sup>, los ratones deficientes de *Igf2* sobreviven al nacimiento, y aunque muestran un retraso del crecimiento fetal similar a los *Igf1*<sup>-/-</sup>, el fenotipo pulmonar prenatal es mucho menos acusado presentando una ligera reducción de espacios alveolares y septos alveolares algo gruesos y desorganizados, que tan sólo se manifiesta en los embriones nacidos de madres *Igf2*<sup>-/-</sup> (Figura 11F). Al contrario que en los *Igf1*<sup>-/-</sup>, los pulmones *Igf2*<sup>-/-</sup> no muestran diferencias en la tasa de proliferación pulmonar. Histológicamente estos pulmones muestran un ligero retraso en la maduración apreciable desde E17,5, estadio en el que muestran una apariencia pseudoglandular más densa, ligera disminución de espacios aéreos y septos con mesenquima más compacto, fenotipo similar al de los *Igf1*<sup>-/-</sup>. Curiosamente, en los pulmones prenatales de los embriones *Igf2*<sup>-/-</sup> la expresión de IGF1 es más elevada de lo normal que posiblemente pueda ser para compensar la falta de IGF2 y asegurar el desarrollo adecuado de pulmón y la supervivencia al nacer (Silva et al., 2006). Por último cabe mencionar que los niveles de corticosterona en el plasma de la madres gestantes de fenotipo *Igf2*<sup>-/-</sup> están disminuidos, indicando la importancia de que bajos niveles de corticosterona podrían afectar al nivel de maduración de los pulmones de su descendencia (Silva et al., 2006).

Todos estos datos obtenidos de los ratones mutantes demuestran que tanto los dos factores, IGF1 e IGF2, como su receptor, IGF1R, están implicados en el desarrollo pulmonar embrionario del ratón, controlando su crecimiento y maduración prenatal. Sin embargo el fenotipo más acusado de los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> y los niveles de IGF1 elevados en los pulmones *Igf2*<sup>-/-</sup> indican que IGF1 posee un papel más relevante que IGF2 en la organogénesis pulmonar.



**Figura 11. Fenotipo histológico de los pulmones prenatales de los ratones mutantes para *Igf1r*, *Igf1* e *Igf2*.** Secciones de pulmones de ratones normales (**A**, **C** y **E**) y de hermanos de camada mutantes deficientes de *Igf1r* (**B**) de *Igf1* (**D**) y de *Igf2* (**F**) teñidas con hematoxilina y eosina. A y B corresponden a ratones neonatos de un día (P0). C-F corresponden a embriones prenatales en el último día de gestación (E18,5). Nótese cómo los pulmones de los tres ratones mutantes presentan una reducción de los espacios aéreos (a) y engrosamiento de los septos alveolares (s). B, Bronquiolo; V, vaso sanguíneo. (A y B tomado de (Holzenberger et al., 2000); C y D tomado de (Moreno-Barriuso et al., 2006); y E y F tomado de (Silva et al., 2006). La magnificación de las microfotografías difiere entre A-B, C-D y E-F).

### 2.3. Los IGFs en el mantenimiento de la homeostasis pulmonar: participación en la reparación del daño, fibrosis y cáncer

#### 2.3.1. Los IGFs en la homeostasis del pulmón humano

Al igual que en ratones, los IGFs se expresan en el pulmón humano tanto durante el desarrollo como en estadios adultos, y la señalización por IGF1R desempeña un papel importante en la organogénesis y en la homeostasis del órgano adulto, contribuyendo a su autoregeneración, reparación y resistencia al daño, con implicación en diversas patologías respiratorias. La relevancia clínica y sanitaria que demuestra este tema, y las dudas y lagunas que quedan por resolver, hace que en la actualidad varios grupos de investigación se interesen con esta línea de investigación.

En humanos la deficiencia de *Igf1* también causa un fallo en el crecimiento corporal intrauterino y postnatal, sin embargo en investigaciones rutinarias, a ninguno de los pacientes estudiados se le ha descrito deficiencias respiratorias (Camacho-Hubner et al., 2002; Walenkamp and Wit, 2007). También se ha referido que la expresión de IGF1 está desregulada

en bebés nacidos muertos con síndromes de dificultad respiratoria y displasia broncopulmonar, y en fetos nacidos con hernia diafragmática congénita, todas ellas enfermedades caracterizadas por un grado de hipoplasia pulmonar severo e inmadurez del aparato respiratorio (Miyazaki et al., 1998; Nagata et al., 2007).

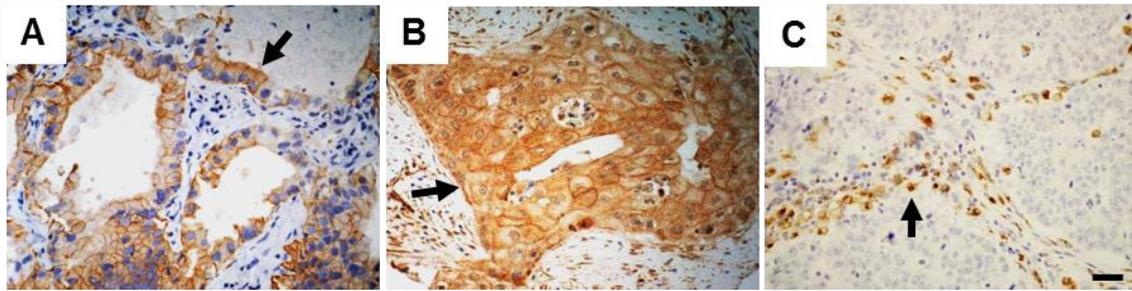
La relevancia del receptor IGF1R en el desarrollo de la vasculogénesis y angiogénesis del pulmón fetal humano lo certifican los experimentos de Han et al, que al tratar explantes de estos tejidos en cultivo in vitro con anticuerpos que bloquean la acción del IGF1R, observan que además de una reducción en el crecimiento, los explantes sufrían la pérdida de células endoteliales y un descenso de la expresión de VEGF (Han et al., 2003). Recientemente se han identificado varias mutaciones heterocigotas de IGF1R en humanos con la presentación de diversos grados de retraso intrauterino y también en el crecimiento postnatal (Raile et al., 2006; Walenkamp et al., 2006; Inagaki et al., 2007; Fang et al., 2009; Kruis et al., 2010). Uno de estos autores describe un paciente con una hipoplasia pulmonar derivada de la delección del brazo largo distal del cromosoma 15 que incluye el gen de *Igf1r* (Roback et al., 1991). Todos estos datos son consistentes con el hecho de que IGF1R también es un mediador esencial en el desarrollo del pulmón en humanos.

El desarrollo y el proceso de regeneración celular del epitelio pulmonar adquieren una relevancia adicional durante la reparación del tejido pulmonar después de sufrir un daño, sobre todo cuando éste es prolongado o crónico, ya que la reparación de este daño de una forma anómala puede dar lugar a una enfermedad respiratoria relevante. Por ejemplo, la terapia de oxígeno mediante ventilación mecánica con hiperoxia es necesaria para tratar a los pacientes con insuficiencia respiratoria, pero la exposición a altas concentraciones de oxígeno en el período neonatal, en prematuros con insuficiencia respiratoria tiene efectos no deseados sobre el pulmón, generando patologías como la displasia broncopulmonar (BPD). En los pulmones la hiperoxia causa inicialmente una lesión inflamatoria pulmonar aguda y posteriormente crónica, altera las cascadas de señalización que afectan el destino celular conduciendo en última instancia a daños o lesiones pulmonares agudas que se caracterizan por respuestas inflamatorias pronunciadas que contribuyen al desarrollo de la BPD. La fibrosis, otro caso de enfermedad respiratoria crónica, tiene su origen en diferentes tipos de daño prolongado del epitelio respiratorio. Es un proceso complejo que involucra la interacción de múltiples tipos celulares que contribuyen a la distorsión de la arquitectura pulmonar y a la pérdida de eficacia en el intercambio de gases (Rajski et al., 2010). La implicación de IGF1 e IGF1R en este tipo de patologías pulmonares humanas está avalada por alteraciones en la expresión pulmonar en pacientes con síndrome de deficiencia respiratoria, BDP sometidos a hiperoxia y con fibrosis pulmonar idiopática (Krein and Winston, 2002; Krein et al., 2003; Chetty et al., 2004; Zaher et al., 2007).

Múltiples estudios demuestran que los IGFs también tienen importantes implicaciones en la biología del cáncer de pulmón (Khandwala et al., 2000; Yu and Rohan, 2000;

Furstenberger and Senn, 2002; Pollak et al., 2004; Pollak, 2008; Werner and Bruchim, 2009; Yin et al., 2009; Dziadziuszko et al., 2010; Rajski et al., 2010; Gallagher and LeRoith, 2011; Shersher et al., 2011; Yang and Winslet, 2011; Pollak, 2012). Estudios epidemiológicos sugieren que altos niveles de IGF1 en la circulación contribuirían a aumentar de forma endocrina el riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer, entre ellos el de pulmón (Baserga et al., 1994; Yu and Rohan, 2000; Jerome et al., 2003; LeRoith and Roberts, 2003). Sin embargo, los datos experimentales más recientes apuntan a que la implicación de los IGFs en la oncogénesis y progresión de las neoplasias pulmonares en pacientes se realizaría principalmente según un modo de acción autocrino o paracrino dentro del propio tejido pulmonar (Kim et al., 2009; Huynh et al., 2011). Ya se conocía que habitualmente la expresión de los IGFs es elevada en muchas líneas celulares tumorales de pulmón (Nakanishi et al., 1988; Reeve et al., 1992; Quinn et al., 1996; Khandwala et al., 2000). Además, la sobreexpresión del IGF1R en estas líneas aumenta considerablemente su potencial metastático cuando se trasplantan en ratones (Nakanishi et al., 1988; Long et al., 1998; Friend et al., 2001). Por el contrario, las líneas celulares derivadas de carcinomas pulmonares con el gen *Igf1r* defectuoso, tratadas con anticuerpos anti-IGF1R, o que expresan ARNm anti-sentido, poseen menor capacidad de proliferación y más apoptosis tanto cultivadas in vitro, como después de ser trasplantadas en ratones desnudos (Nakanishi et al., 1988; Baserga et al., 1994; Furstenberger and Senn, 2002; Baserga et al., 2003; Pavelic et al., 2005).

En pacientes con cáncer de pulmón los IGFs también se expresan más en la zona pulmonar tumoral que en el tejido normal adyacente. Se ha descrito que la expresión de IGF1R, IGF1 e IGF2 se triplica en tumores de este tejido, observándose que en paralelo también ocurre una disminución proporcional de la apoptosis (Takanami et al., 1996; Pavelic et al., 2002). También se ha demostrado que entre los diferentes carcinomas pulmonares la expresión de ARNm y de la proteína de IGF1R es más elevada en los de tipo epidermoide que en los adenocarcinomas (Borczuk et al., 2003). Algunos resultados indican que la expresión de IGF1R no se asocia con la supervivencia y que incluso un alto número de copias de IGF1R (amplificación génica) conllevaría un valor pronóstico positivo de la enfermedad de (Dziadziuszko et al., 2010). Estudios ya realizados o en desarrollo de nuestro grupo también se enmarcarían en este contexto (Figura 12). Todos estos datos demuestran que los IGFs están muy implicados en la biología de los carcinomas pulmonares primarios, tanto en su génesis como en su progresión por su acción desde la zona tumoral, y posiblemente también de forma paracrina desde el estroma adyacente.



**Figura 12. Expresión de IGF1R en tumores no microcíticos de pulmones humanos.** Inmunodetección de IGF1R en muestras de tumores de pacientes diagnosticados con adenocarcinomas (A) o carcinomas escamosos (B y C). Las flechas apuntan a células con alta expresión de IGF1R. En C, aunque en las células tumorales no se aprecia presencia de IGF1R, éste sí se detecta en células de la parte estromal y no tumoral del tejido, como vasos sanguíneos y macrófagos (Pais, 2012).

Por último, y no menos importante, cabe mencionar que IGF1R también está implicado en la resistencia al tratamiento con quimioterapia de tumores pulmonares, tanto en los tratamientos clásicos, como en los nuevos tratamientos con fármacos dirigidos a dianas moleculares concretas, como es el caso del EGFR activado por mutación (Kim et al., 2009; Gualberto et al., 2011; Belani et al., 2012; Kim et al., 2012a; Pollak, 2012). Esta resistencia a la quimioterapia posee tal repercusión clínica que los IGFs, y sobre todo IGF1R, están siendo evaluados o recomendados en ensayos clínicos como dianas terapéuticas muy importantes en el cáncer de pulmón. En estos ensayos clínicos se valora si la co-administración de inhibidores de IGF1R reduce la resistencia o tolerancia a los tratamientos quimioterápicos en uso. Para el bloqueo de IGF1R existen múltiples fármacos en evaluación, que en su mayoría son anticuerpos monoclonales, dado que los inhibidores de la actividad tirosín kinasa (TKIs) anti-IGF1R también bloquean los receptores de insulina generando complicaciones metabólicas indeseables en los pacientes (Dziadziuszko et al., 2008; Kim et al., 2009; Yin et al., 2009; Gualberto et al., 2011; Belani et al., 2012; Pollak, 2012). Aunque la función de IGF1R en la resistencia a los tratamientos de tumores pulmonares no se discute, la función de IGF1 *per se* en este escenario podría no tener tanta relevancia como lo demuestran dos estudios publicados muy recientemente (Straussman et al., 2012; Wilson et al., 2012). En su conjunto todos estos datos experimentales revelan la importancia de la señalización de los IGFs a través de IGF1R en el establecimiento y mantenimiento del fenotipo transformante de las neoplasias pulmonares, y en participación de IGF1R en los mecanismos de resistencia a la quimioterapia tanto convencional como a los novedosos tratamientos dirigidos a dianas moleculares concretas.

### 2.3.2. Los IGFs en modelos murinos de daño, regeneración y tumores

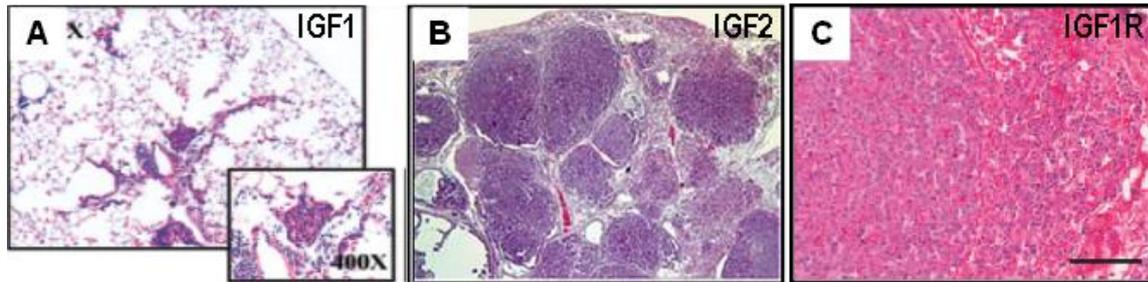
Está ampliamente demostrado que los modelos de daño alveolar por exposición a la hipoxia o de inducción de fibrosis generados en rata y ratón recapitulan la patología humana (Warner et al., 1998; Alejandro-Alcazar et al., 2007; Velten et al., 2010). Se ha demostrado

tanto en ratas como en ratones que IGF1, IGF2 e IGF1R aumentan su expresión en diferentes tipos celulares del pulmón, jugando un papel crucial en la proliferación y diferenciación de las células AEC2 a las AEC1 durante el remodelado alveolar tras el daño generado por hiperoxia (Han et al., 1996a; Han et al., 1996b; Chetty and Nielsen, 2002; Kim et al., 2012b). Narasaraju et al, estudiaron los cambios de expresión de genes del sistema IGF en la remodelación del pulmón de rata tras ser sometido a hiperoxia y observaron un aumento en la expresión del ARNm de IGF1, IGF2, e IGF1R a las 48 h de la lesión. Sin embargo, los niveles de proteína de estos componentes se mantuvieron elevados hasta el tercer día después de la recuperación, y eran muy abundantes en las células AEC2. Entre las IGFBPs, observaron que Igfbp5 era la que aumentaba los niveles de expresión de ARNm durante la lesión y en todos los puntos de tiempo de recuperación (Narasaraju et al., 2006). En otros estudios también se ha descrito que el ARNm de las IGFBP2 y 3 aumentaban en los pulmones de rata durante la fase de exposición a hiperoxia (Chetty et al., 2005). Del mismo modo, la exposición de ratas adultas a hiperoxia prolongada se ha asociado en el pulmón con un incremento en la inmunotinción de IGF1R en la vecindad de células que expresan IGF1 (Han et al., 1996b). Ahamed *et al*, observaron que la disminución de los niveles funcionales de IGF1R en ratones mutantes podría prevenir los efectos nocivos de la exposición al oxígeno en el pulmón (Ahamed et al., 2005). En conjunto, estas observaciones han llevado a sugerir que la señalización mediada por IGFs puede ser importante en la patogénesis de la lesión pulmonar inducida por oxígeno en animales modelo, y demuestran que la vía de señalización de IGF1R desempeña un papel crítico en la proliferación y diferenciación de epitelio alveolar durante la remodelación de tejidos tras el daño.

En este sentido Kim *et al.*, han demostrado recientemente que el tratamiento de ratones con un anticuerpo bloqueante de IGF1R denominado A12 mejoraba la supervivencia temprana en la lesión pulmonar inducida por bleomicina que genera fibrosis pulmonar. Si la sobre-expresión de IGF1 e IGF1R, tras lesiones de hiperoxia que causan fibrosis, contribuye a generar alteraciones patológicas pulmonares y al progreso de muchas enfermedades respiratorias, se deduce que la reducción de la expresión de IGFs o el bloqueo de la señalización por el receptor, redundaría en un menor daño pulmonar tras una lesión, y adicionalmente fundamentaría un posible abordaje del tratamiento de estas enfermedades. Efectivamente los experimentos con modelos animales, como los mencionados arriba concluyeron que la reducción de la expresión de IGFs o el bloqueo farmacológico del IGF1R pueden ser un estrategia para el tratamiento del daño alveolar y de la fibrosis pulmonar (Choi et al., 2009; Kim et al., 2012c).

Como se ha mencionado la vía de señalización de los IGFs se halla particularmente implicada en la tumorigénesis pulmonar. Esta implicación la corroboran una vez más algunos modelos animales. Así, la sobre-expresión de IGF1 e IGF2 en el pulmón de ratones transgénicos induce lesiones epiteliales premalignas, o adenocarcinomas de pulmón muy parecidos a los humanos (Moorehead et al., 2003; Frankel et al., 2005). Del mismo modo, la sobre-expresión de IGF1R en el epitelio pulmonar de ratones transgénicos también induce

tumores pulmonares, de tipo adenocarcinomas, generando niveles altos de expresión o activación de AKT, p38 $\alpha$  MAPK, CREB y ATF1 (Linnerth et al., 2009) (Figura 13).



**Figura 13. La sobreexpresión de IGFs en los pulmones de ratones transgénicos induce proliferación anómala del epitelio respiratorio o adenocarcinomas típicos.** A, La sobreexpresión de IGF1 en las células epiteliales AEC2 del compartimento alveolar induce hiperplasias adenomatosas (Frankel et al., 2005). B, La sobreexpresión generalizada de IGF2 en el pulmón de ratones transgénicos genera adenocarcinomas típicos con características semejantes al de los adenocarcinomas de pacientes humanos (Moorehead et al., 2003). C, La sobreexpresión de IGF1R en las células AEC2 también genera adenocarcinomas típicos (Linnerth et al., 2009).

### 3. Ratones mutantes condicionales: los ratones *Igf1<sup>fl/fl</sup>* y transgénicos con expresión de la recombinasa Cre en el epitelio respiratorio

Como ya se ha visto en algunos de los ejemplos mencionados anteriormente los ratones modificados genéticamente son herramientas clave para el estudio de la función génica y de las bases genéticas de las enfermedades, así como para la generación de modelos animales de múltiples patologías. En el ratón se puede generar dos tipos de modelos modificados genéticamente (transgénicos): los ratones transgénicos convencionales y los modelos de "gene targeting" o de mutagénesis dirigida del genoma por recombinación homóloga (<http://jaxmice.jax.org>).

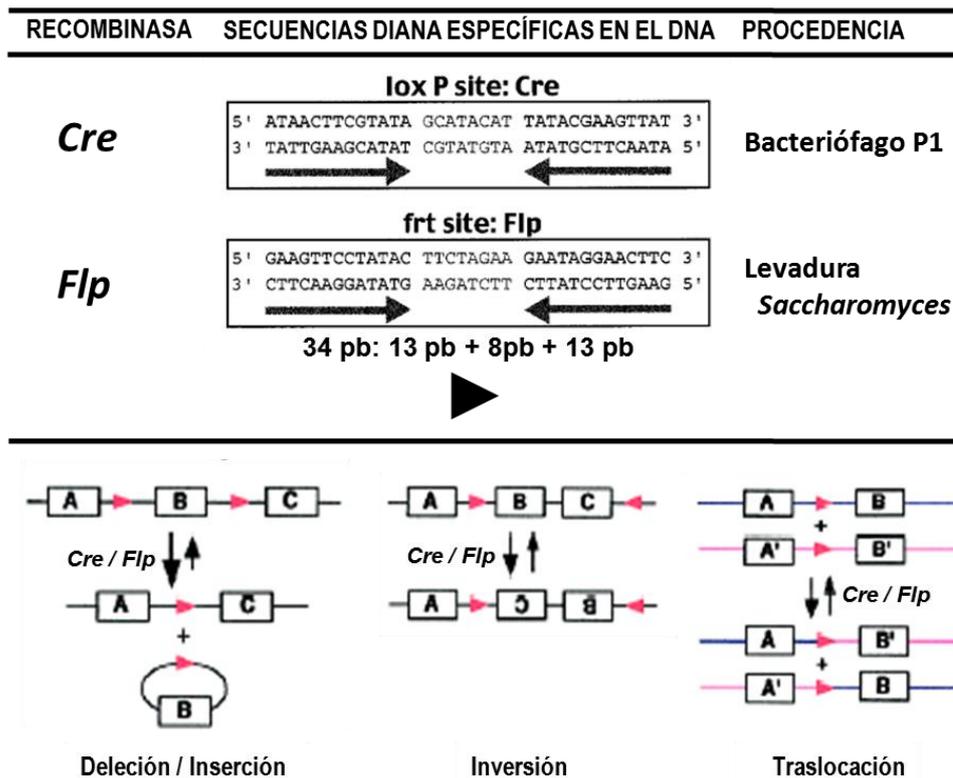
Los ratones transgénicos convencionales son portadores de un transgén (material genético externo) integrado al azar en su genoma. Son generalmente modelos de ganancia de función que conducen a la expresión de un nuevo gen o a la sobreexpresión de un gen ya existente. En este tipo de modelos se puede controlar con total precisión la estructura del "transgen" pero no la posición del genoma en que éste se integra. Generalmente se utilizan construcciones transgénicas compuestas por un promotor eucariótico y la secuencia codificante del gen de interés para expresar o sobreexpresar dicho gen en todas las células del ratón (expresión ubicua) o bien en un tejido concreto (expresión tejido-específica).

La técnica de generación de ratones mutantes mediante la mutagénesis dirigida (gene targeting) por recombinación homóloga se diferencia de los ratones transgénicos convencionales en que la integración del ADN que se introduce en el genoma se dirige a una posición concreta del mismo, con el objetivo de generar una mutación intencionada y previamente diseñada en dicha posición. En general se puede hablar de dos tipos de modelos

generados mediante gene targeting: los ratones *knockout* y los ratones *knockin*. Mientras en los primeros se inactiva un gen determinado en el genoma, en los segundos se introducen mutaciones dirigidas en la secuencia de un determinado gen. Respecto a sus aplicaciones, un ratón *knockout* es el mejor modelo para estudiar la función de un gen en el contexto fisiológico, analizando el fenotipo que resulta de la pérdida de su función. Los modelos *knockin* se utilizan sobre todo para reproducir en el ratón alteraciones genéticas tales como mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o inserciones que se encuentran en patologías humanas o que son relevantes para el estudio de la función génica (<http://www.genoway.com/products-services/custom-model-generation-services/knockin/knockin-mouse-models-overview.htm>).

La recombinación homóloga también permite dirigir la integración de sitios de reconocimiento de enzimas llamadas recombinasas específicas de sitio (site-specific recombinases) en cualquier posición en el genoma del ratón. Entre estas recombinasas las más conocidas son *Cre* y *Flp* que reconocen las secuencias *loxP* y *frt*, respectivamente, y catalizan la recombinación de ADN entre estos sitios diana (Figura 14). La combinación de técnicas de recombinación homóloga y de los sistemas *Cre/loxP* y *Flp/frt* permiten introducir prácticamente cualquier tipo de mutación en el genoma y además controlar el momento y el lugar dónde ésta se expresa generando modelos *knockout* y *knockin* condicionales, tejido específicos, inducibles etc. (Sadowski, 1995; Lobe and Nagy, 1998) (<http://jaxmice.jax.org>).

En la actualidad existen multitud de líneas de ratones modificados genéticamente que permiten generar deleciones o mutaciones de genes de forma condicionada: en un determinado tipo celular, en un determinado momento del desarrollo, etc. Un ratón mutante condicional en general se obtiene cruzando dos tipos de ratones modificados genéticamente. Básicamente, el tipo de recombinación dependerá de la orientación y localización de los sitios *loxP* o *frt*: cuando ambas secuencias se encuentran en la misma molécula lineal de ADN y con la misma orientación, el segmento de ADN entre los sitios será eliminado; si los sitios específicos de corte están en la misma molécula pero con orientación invertida, se produce una inversión del segmento intermedio; cuando las secuencias se encuentran en moléculas de ADN separadas el resultado es una translocación (Figura 14). Todas estas reacciones enzimáticas son reversibles y las recombinasas funcionan tanto *in vitro* como *in vivo*. La estrategia para crear ratones mutantes condicionales está fundada en el control espacial y/o temporal de las recombinasas sitio-específicas. Esto es posible gracias a la inserción de la secuencia específica en las regiones flanqueantes o en los intrones del gen que queremos noquear. De este modo, la función del gen que posee las zonas flanqueadas no se ve alterada, es decir que el gen se expresa normalmente a pesar de la integración de la secuencia *loxP*. A este alelo del gen se le denomina “floreado” o *fl* y al ratón homocigoto para este alelo floreado para ese gen *fl/fl*. Para generar la mutación condicionada del gen floreado lo más común es usar un segundo ratón transgénico convencional o un mutante knockin para dirigir específicamente la expresión de la recombinasa.



**Figura 14. Recombinasas específicas de sitio comúnmente usadas en animales transgénicos, las secuencias específicas que reconoce y sus aplicaciones para la generación de mutaciones dirigidas.** Las recombinasas *Cre* y *Flp* reconocen específicamente las secuencias de 34 pb, *loxP* y *frt* respectivamente. Estas secuencias que son palindrómicas en los extremos (13 pb) poseen una secuencia específica central de 8 pb con una orientación que se representa con una punta de flecha. En la parte inferior se muestran las diferentes consecuencias de la recombinación cuando la recombinasa reconoce dos secuencias específicas en el ADN (puntas de flecha rojas). Si las secuencias diana están en la misma orientación en una misma molécula de ADN (p.e. en un cromosoma o un plásmido) la acción de la recombinasa produce la eliminación o **delección** de la secuencia de ADN entre los sitios de recombinación en un fragmento circular con alta eficiencia. El proceso inverso, la integración o **inserción** de un fragmento de ADN en otro, también es posible, pero mucho menos favorable en la reacción. Si las secuencias diana están en dirección opuesta en una misma molécula de ADN la recombinasa genera **inversiones**. Por último, en el caso de que las secuencias diana se encuentren en la misma orientación en moléculas de ADN diferentes la recombinasa puede generar **traslocaciones** (Sadowski, 1995; Lobe and Nagy, 1998).

### 3.1. Los ratones mutantes con el gen *Igf1r* floxeado o *Igf1r<sup>fl/fl</sup>*

Como ya se ha mencionado, la generación y caracterización preliminar del primer ratón mutante, el *knockout* total de *Igf1r* (*Igf1r<sup>-/-</sup>*), fue publicado hace veinte años por el Laboratorio del Dr. Efstratiadis en Columbia University. El animal *Igf1r<sup>-/-</sup>* es un neonato muy pequeño que se muere al nacer, aparentemente debido a un fallo respiratorio generado por sus múltiples achaques: déficit de crecimiento, hipoplasia muscular muy acusada, y también con unos pulmones desproporcionalmente hipoplásicos y compactos que también contribuyen a su mortalidad postnatal (Liu et al., 1993; Epaud et al., 2012). El fenotipo pulmonar del *knockout* total ha sido estudiado en detalle y publicado recientemente por el grupo del Dr. Holzenberger (Epaud et al., 2012).

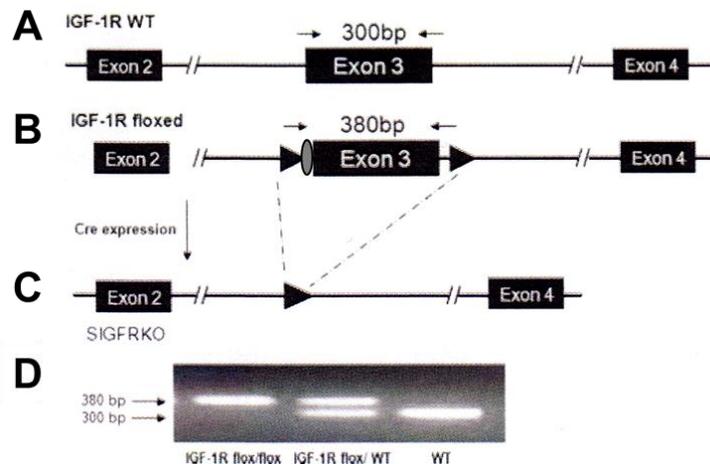
En el año 2000 estos dos grupos publicaron la generación de los mutantes *Igf1r<sup>f/fi</sup>* (*Igf1r* floxeados), y años más tarde también lo hicieron otros grupos (Tabla 2).

**Tabla 2. Líneas de ratones mutantes *Igf1r<sup>f/fi</sup>* y las mutaciones condicionales *in vivo* descritas en la bibliografía. Tomado de la base de datos MGI (*Mouse Genome Informatics*) (<http://www.informatics.jax.org/>).**

Nombre del alelo	Num. MGI	Laboratorio de origen	Mutaciones condicionales
<i>Igf1r<sup>f/fi</sup></i> <sup>1Mhz</sup>	MGI:2386328	<b>Martin Holzenberger (INSERM, Paris, Francia) (Holzenberger et al., 2000)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Células beta del páncreas (Kulkarni et al., 2002; Ueki et al., 2006; Okada et al., 2007)</li> <li>- Células endoteliales vasculares (Kondo et al., 2003; Kondo et al., 2004)</li> <li>- Hepatocitos (Cadoret et al., 2005; Desbois-Mouthon et al., 2006; Cadoret et al., 2009)</li> <li>- Células de Sertoli en testículo (Froment et al., 2007)</li> <li>- Generalizada inducida por tamoxifeno, para analizar músculo liso vascular (Cheng and Du, 2007; Zhang et al., 2010)</li> <li>- Músculo cardíaco y esquelético (Laustsen et al., 2007)</li> <li>- Cardiomiocitos (Kim et al., 2008)</li> <li>- Epitelio de próstata (Sutherland et al., 2008)</li> <li>- Neuronas embrionarias (Kappeler et al., 2008)</li> <li>- Timocitos y células T (Chu et al., 2008)</li> </ul>
<i>Igf1r<sup>f/fi</sup></i> <sup>AmzArge</sup>	MGI:2389580	<b>Argiris Efstratiadis (Columbia University, NY, EEUU) (Dietrich et al., 2000)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Testículo (Pitetti et al., 2013)</li> <li>- Resistencia a la insulina, diabetes y enfermedad cardiovascular (Rajwani et al., 2012)</li> <li>- Matriz ósea (Xian et al., 2012)</li> <li>- Diferenciación de las células sensoriales (Okano et al., 2011)</li> <li>- Inducida por golpe de calor (<i>heat shock</i>) (Dietrich et al., 2000)</li> <li>- Células beta del páncreas (Xuan et al., 2002; Xuan et al., 2010)</li> <li>- Osteoblastos (Zhang et al., 2002; Niu and Rosen, 2005; DiGirolamo et al., 2007; Wang et al., 2007b)</li> <li>- Neuronas CaMKII<math>\alpha</math> del cerebro (Mason et al., 2003)</li> <li>- Oligodendrocitos (Zeger et al., 2007)</li> <li>- Células endoteliales (Abbas et al., 2011)</li> </ul>
<i>Igf1r<sup>f/fi</sup></i> <sup>Jcbr</sup>	MGI:3818453	<b>Jens Brüning (Institute for Genetics, University of Cologne, Germany) (Kloting et al., 2008)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adipocitos (Kloting et al., 2008; Lee et al., 2013)</li> <li>(Kloting et al., 2008)</li> <li>- Células somatotropas (Romero et al., 2010; Gahete et al., 2011)</li> </ul>
<i>Igf1r<sup>f/fi</sup></i> <sup>Lex</sup>	MGI:3529204	<b>Lexicon Genetics (The Woodland, Tx)</b>	- Fibroblastos embrionarios de ratón (Dinchuk et al., 2010)
<i>Igf1r<sup>f/fi</sup></i> <sup>(KOMP)Vcg</sup>	MGI:4881155	<b>Velocigene (Regeneron Pharmaceuticals) (Tarrytown, NY) EEUU</b>	
<i>Igf1r<sup>f/fi</sup></i> <sup>(EUCOMM)Wtsi</sup>	MGI:4842852	<b>Welcome Trust Sanger Institute (Cambridgeshire, UK)</b>	- Para uso general (Skarnes et al., 2011)

En todos los mutantes *Igf1r<sup>f/fi</sup>*, la única modificación genética con algunas variaciones es que incorporan las dos secuencias *loxP* de 34 pb en los intrones que flanquean el exon 3 del

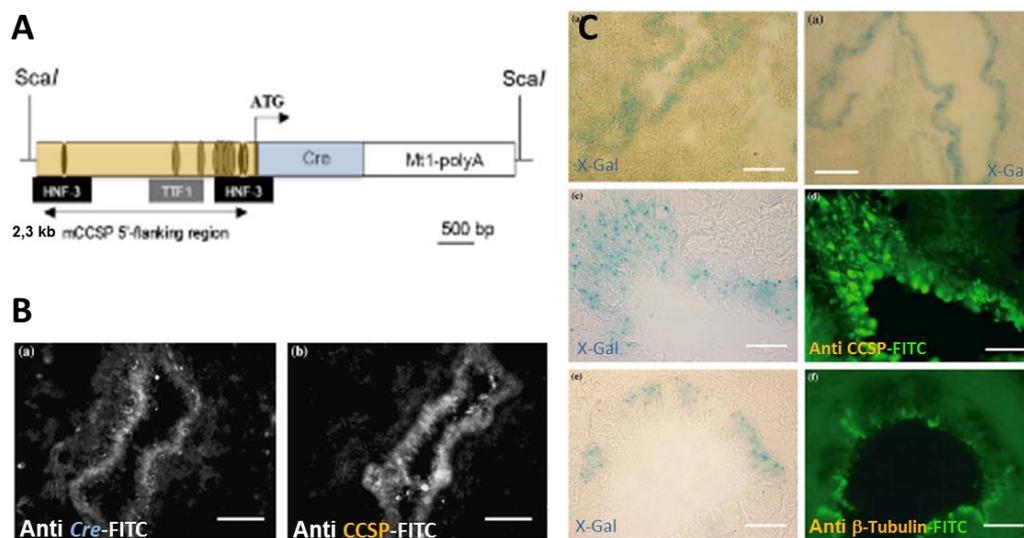
gen *Igf1r* localizado en el cromosoma 7 del ratón. De esta forma los ratones homocigotos *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* son viables y fértiles y no tienen un fenotipo aparente conocido. Las secuencias *loxP* localizadas en ambos alelos de IGF1R de estos ratones son las que reconoce la recombinasa *Cre* para producir una delección sitio específica del exón 3 de *Igf1r*, dejando en el locus una única secuencia *loxP* (34 pb). La mutación genera un alelo nulo con síntesis de un receptor IGF1R truncado y no funcional. Al eliminarle el exón 3 del gen de *Igf1r*, se genera una proteína truncada con 213 aa nativos (provenientes del exón 1 y del exón 2) y tras el splicing incorrecto del exón 2 al 4, se cambia la pauta de lectura con 27 aa incorrectos hasta que se encuentra un codon STOP en la posición 241. Este fragmento truncado de IGF1R con 240 aa supuestamente debería ser soluble y ni siquiera con capacidad de unir IGFs (Dietrich et al., 2000; Holzenberger et al., 2000; Kloting et al., 2008). En la Tabla 2 se presenta una lista de diferentes mutaciones condicionales de *Igf1r* generadas en los ratones *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* mencionados al cruzarlos con ratones transgénicos que expresan *Cre* de forma específica en diferentes tipos celulares. En la Figura 15 se muestra un esquema que ilustra la organización/mutación del gen de *Igf1r* durante su generación y después de ocurrir la delección, así como la estrategia de genotipado por PCR de los ratones *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* generados en el laboratorio del Dr. Jens Brüning (Kloting et al., 2008; Romero et al., 2010).



**Figura 15. Organización genómica del locus *Igf1r* en los ratones mutantes *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* generados en el laboratorio de Jens Brüning (Univ. De Cologne) y su estrategia de genotipado por PCR.**  
**A.** Estructura normal (IGF1R WT) del gen *Igf1r* mostrando los exones 2, 3 y 4, y la localización de los cebadores (flechas) para amplificar un fragmento de ADN de 300 pb, que incluye el exón 3 del gen.  
**B.** Localización de los sitios *loxP* (puntas de flecha negra) tras su introducción por la técnica de *knockin* en los ratones mutantes *Igf1r<sup>fl/fl</sup>*. El cassette con el gen *neo* flanqueado por un sitio *frt* (elipse gris), utilizado para la selección de los clones con la mutación ya ha sido eliminado previamente por acción de la recombinasa *Flp*. Tras la mutación el locus (*Igf1r* floxed) genera un fragmento de PCR de 380 pb con los mismos cebadores.  
**C.** La expresión de *Cre* en células que poseen la mutación *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* permite la recombinación entre los sitios específicos *loxP* y la delección del fragmento que flanquean, incluyendo el exón 3 de *Igf1r*, generando un *knockout* total del gen.  
**D.** Ejemplo de análisis por PCR para el genotipado de los ratones mutantes *Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, mostrando las posibilidades de los tres genotipos posibles (no se muestra el genotipado de la delección) (Kloting et al., 2008; Romero et al., 2010).

### 3.2. Los ratones transgénicos *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>* expresan *Cre* en las células de Clara del epitelio respiratorio

Los ratones transgénicos *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>* expresan *Cre* dirigida por el promotor del gen que expresa la proteína secretada por las células de Clara (*CCSP*). Esta proteína se expresa en las células de Clara de la tráquea, bronquios y bronquiolos, y en menos cantidad en sus precursores, como en las células Clara variantes (Rawlins et al., 2009a). Además, también se expresa en epitelios de riñón o mama, y en otros tejidos como próstata, tiroides e hipófisis (Peri et al., 1993). Los ratones transgénicos *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>* se generaron en el laboratorio del Dr. Michel Tauc en la Universidad de Niza (Francia) por microinyección de un fragmento de ADN que contenía 2,3 Kb del promotor del gen *CCSP* de ratón, dirigiendo la expresión del ADNc de *Cre* (Figura 16A). Los autores demuestran que en la línea de transgénicos, gl4, *Cre* se expresa en pulmón y específicamente en las células de Clara del epitelio bronquiolar (Figura 16B). También demuestran que *Cre* es funcional y específica de las células de Clara del epitelio, porque al cruzarlos con los ratones de la línea reportera *Rosa26-LacZ*, observaron actividad *LacZ* exclusivamente en este tipo celular del pulmón, y no en otros tipos celulares del epitelio bronquiolar, como por ejemplo las células epiteliales ciliadas (Figura 16C). Los ratones *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>* son fenotípicamente normales y fértiles (Bertin et al., 2005).

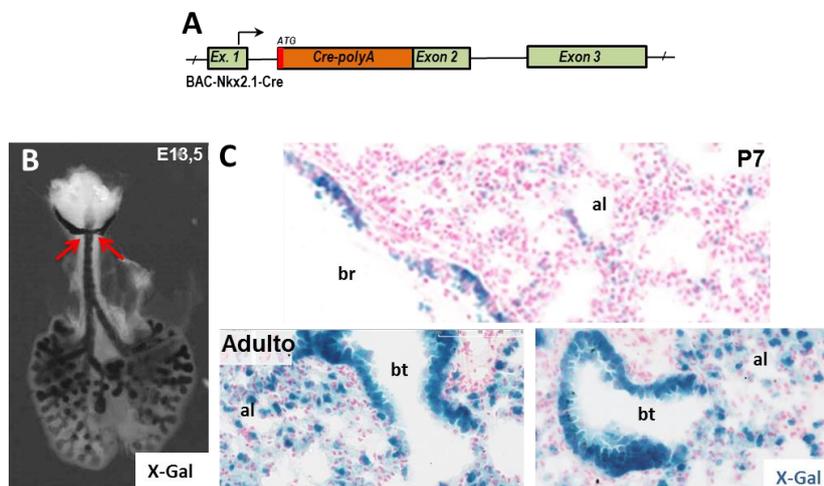


**Figura 16. Generación y caracterización de los ratones transgénicos *CCSP-Cre*.** **A.** Estructura del transgen *CCSP-Cre* usado para generar la línea de transgénicos *CCSP-Cre*. **B.** Expresión de *Cre* en las células de Clara del epitelio bronquiolar de los transgénicos *CCSP-Cre*, que también expresan *CCSP*. **C.** Expresión de  $\beta$ -galactosidasa en las células de Clara del epitelio bronquiolar de ratones doble transgénicos *CCSP-Cre/Rosa26-LacZ*, pero no en las células ciliadas teñidas con tubulina (Bertin et al., 2005).

### 3.3. Los ratones transgénicos *Nkx2.1-Cre*<sup>Tg/+</sup> expresan *Cre* en múltiples tipos celulares del epitelio respiratorio

El gen *Nkx2.1* es un factor de transcripción de tipo homeobox descrito inicialmente como factor de transcripción tiroideo (*Ttf1*) que regula genes específicos de esta glándula, pero que también regula morfogénesis y destino celular en otros órganos y tipos celulares. Además de *Nkx2.1* y *Ttf1*, este gen también se denomina *T/EBP* y *Tiff1* (Ikeda et al., 1995) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22130](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22130)).

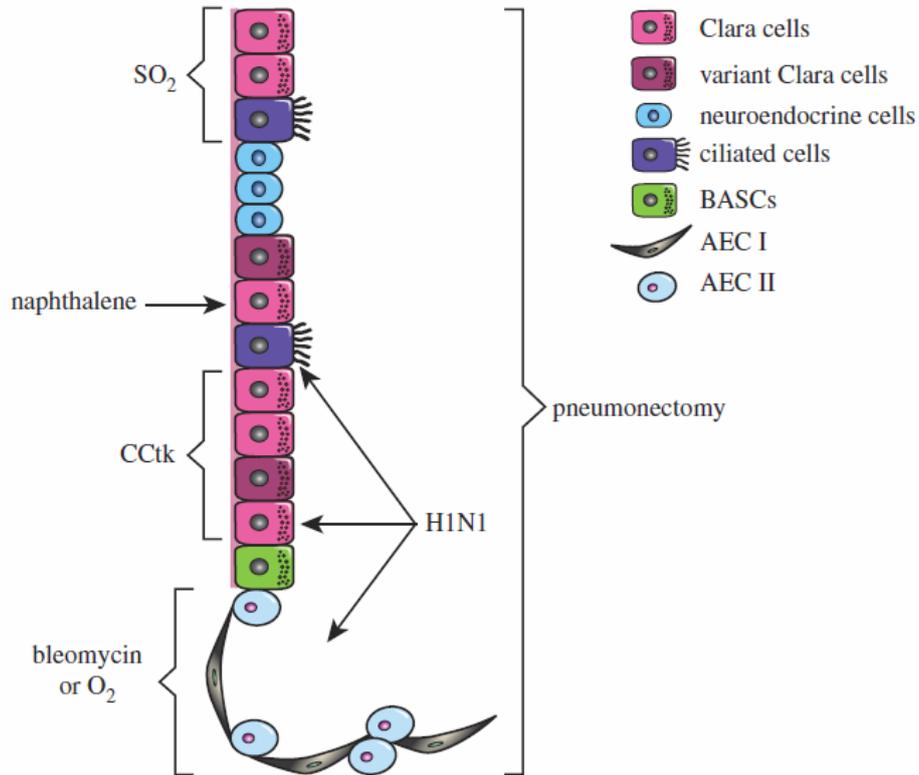
Los ratones transgénicos *Nkx2.1-Cre* se generaron en el laboratorio del Dr. Stewart A. Anderson (Weill Medical College of Cornell University, NY, EEUU). El transgen se generó a partir de un fragmento de ADN genómico de ratón de 223 Kb contenido en un cromosoma artificial bacteriano (BAC). El BAC fue modificado para sustituir la secuencia codificante de *Nkx2.1* localizado en el exón 2 de la *Cre* (Figura 17A). El fragmento resultante se microinyectó en oócitos fertilizados de ratón para generar los animales transgénicos (Xu et al., 2008). Los ratones *Nkx2.1-Cre* expresan *Cre* en múltiples tipos de células epiteliales del epitelio respiratorio. Cuando se cruzan con animales reporteros *Rosa26-LacZ* se observa tinción para  $\beta$ -galactosidasa en el epitelio respiratorio desde antes del día E13 en el epitelio bronquiolar y en las células AEC2 en el pulmón en desarrollo y en adultos (Tiozzo et al., 2009) (Figura 17B-C). Dado que la expresión del promotor del gen *Nkx2.1* nativo no es exclusiva del epitelio respiratorio *Cre* también se expresa en neuronas del telencéfalo, tiroides e hipófisis (<http://cre.jax.org/Nkx2.1.html>).



**Figura 17. Generación y caracterización de los ratones transgénicos *Nkx2.1-Cre*.** **A.** Estructura del transgen *Nkx2.1-Cre* insertado en un BAC y usado para generar la línea de transgénicos *Nkx2.1-Cre*. **B.** Expresión de *LacZ* en las células del epitelio bronquiolar y alveolar en embriones de ratones dobles transgénicos *Nkx2.1-Cre/Rosa26-LacZ* de 13 días de edad. También se aprecia tinción en los primordios del tiroides (flechas rojas) (Xu et al., 2008). **C.** Expresión de  $\beta$ -galactosidasa en las células del epitelio pulmonar de ratones dobles transgénicos *Nkx2.1-Cre/Rosa26-LacZ* donde se observa la activación de *LacZ* en las células epiteliales pulmonares de ratón de 7 días (P7) y en adultos. La tinción se observa tanto en las células del epitelio bronquiolar como alveolar. al, zona alveolar; br, broquiolo termina; X-Gal,  $\beta$ -galactosidasa (<http://jaxmice.jax.org/strain/008661.html>).

#### **4. Los modelos de daño y regeneración epitelial pulmonar en ratón**

Debido a su función, el pulmón está constantemente expuesto a agentes tóxicos y patógenos presentes en el medio ambiente que eventualmente lo pueden dañar, pero posee una gran capacidad de responder rápida y eficazmente al daño generado por estas agresiones. Durante el daño en el tejido pulmonar y en su posterior regeneración ocurren múltiples procesos celulares y moleculares interrelacionados funcionalmente entre los que destacan, la inflamación, la respuesta inmune y la regeneración celular y tisular. El daño pulmonar afecta principalmente al epitelio de las vías respiratorias dado que forma la superficie celular en contacto directo con el exterior. Cada tipo de daño causa diferentes tipos de respuesta con diferencias en el grado de infiltración de células inmunes, en la fibrosis, en los tipos de células afectadas, y en el mecanismo de regeneración, e incluso en la patología resultante. Estos modelos de lesión pulmonar han sido descritos al detalle por varios autores. Para estudiar a nivel celular y molecular los procesos de daño y regeneración del epitelio pulmonar se han generado múltiples modelos de estudio en animales de experimentación, destacando entre ellos los usados en ratón (Raiser et al., 2008; Rawlins et al., 2008; Asselin-Labat and Filby, 2012). Entre los modelos de daño pulmonar más utilizados están los siguientes: el tratamiento con naftaleno para el estudio de la regeneración de las células de Clara, el uso de bleomicina e hiperoxia para el daño y regeneración del epitelio alveolar e inducción de fibrosis, el tratamiento con dióxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) para dañar las células del epitelio tráqueobronquial proximal, la pneumonectomía para el estudio de la regeneración completa de tejido pulmonar, y la infección con influenza virus pneumotrópicos para dañar diferentes tipos celulares del epitelio respiratorio (Figura 18 y Tabla 3).



**Figura 18. Modelos de daño pulmonar en ratón.** Diagrama esquemático del efecto selectivo de diferentes daños en el epitelio proximal y distal de las vías aéreas (Asselin-Labat and Filby, 2012).

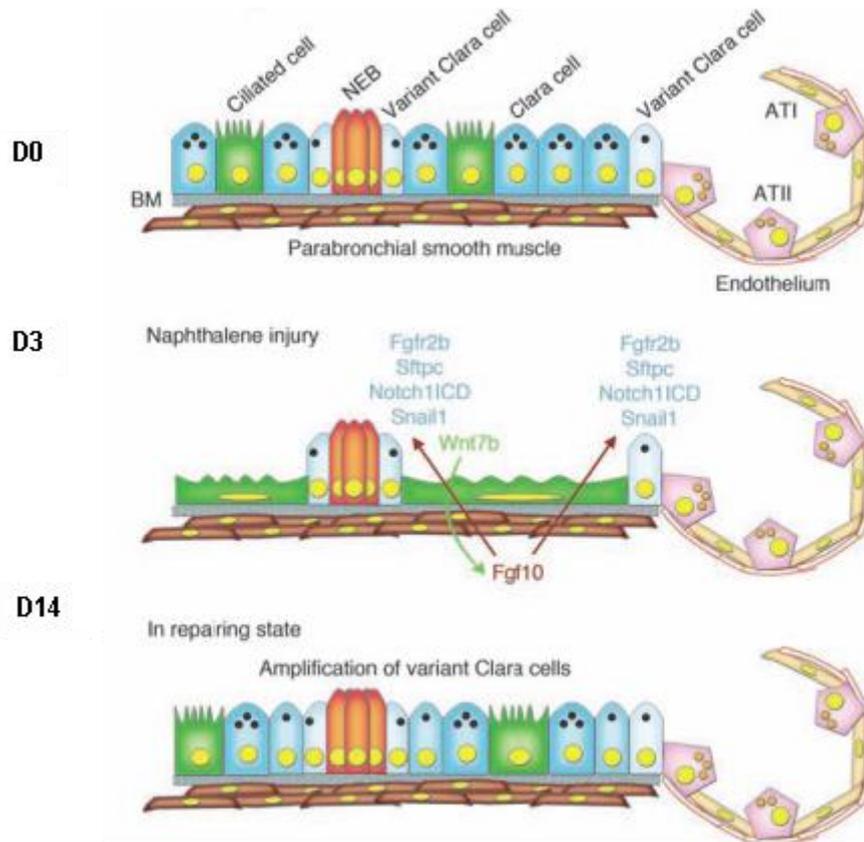
**Tabla 3. Modelos de lesión pulmonar para estudiar las células madre pulmonares en el ratón** (Asselin-Labat and Filby, 2012)

model	dose and route of administration	target cell(s)	maximal injury	repair
bleomycin	2.3 units kg <sup>-1</sup> intratracheal instillation or, 120 mg kg <sup>-1</sup> i.v.	EC, AEC I, AEC II	6–10 days	21 days
naphthalene	250 mg kg <sup>-1</sup> , i.p.	Cyp2f2-containing Clara cells	3 days	10 days
ganciclovir (CCtk mice)	4.5 mg d <sup>-1</sup> GCV (375 mg ml <sup>-1</sup> in saline) via miniosmotic pump for 6 or 12 days	CC10 <sup>+</sup> Clara cells, ciliated cells susceptible to delayed ablation, AEC II	7–12 days	
pneumonectomy	n.a.; entire left lung removed	all lung epithelia, vasculature and support cells	at time of surgery	15 days
H1N1 (PR8) influenza virus	250 PFU, intratracheal inhalation	Clara cells, ciliated cells, AEC II	11 days	21–60 days
O <sub>2</sub>	70–100% O <sub>2</sub> , chamber for 56 h or if longer, alternating to room air every 24 h	alveolar cells (distal)	3 days	14 days
SO <sub>2</sub>	500 ppm SO <sub>2</sub> in room air, chamber for 3 h	luminal cells of tracheo-bronchial epithelium	36 h	7 days

#### 4.1. Ablación y regeneración de las células de Clara con la administración intraperitoneal única de naftaleno.

Las células de Clara forman parte del epitelio de las vías respiratorias y desempeñan un importante papel fisiológico en la producción de moco, protección contra los agentes ambientales, regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias en el sistema respiratorio (Plopper, 1983; Harrod et al., 1998; Hayashida et al., 2000; Watson et al., 2001; Wang et al., 2003a; Reynolds and Malkinson, 2010). Al estar implicadas en el mantenimiento de la homeostasis del pulmón, se supone que participan en la susceptibilidad y progresión de patologías respiratorias como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), o el cáncer de pulmón (Van Vyve et al., 1995; Shijubo et al., 1999; Luo et al., 2003). Hasta la fecha, la participación de las células de Clara en estos procesos patológicos permanece en gran medida enigmática. Por lo tanto, es de gran interés estudiar su función para diseñar nuevas herramientas que permitan investigar su función en la fisiología y en las patologías respiratorias.

El naftaleno es un hidrocarburo aromático encontrado en el humo del tabaco y en la naftalina. Administrado intraperitonealmente a los ratones, el naftaleno se convierte citotóxico cuando se metaboliza por Cyp2f2, una enzima perteneciente al complejo del citocromo P450 mitocondrial, que está presente en alta cantidad en las células de Clara del epitelio de la tráquea, los bronquios y los bronquiolos (Buckpitt et al., 1995; Li et al., 2011). El naftaleno, al ser detoxificado por las células de Clara provoca su muerte selectiva en los primeros días después de su administración, aunque no afecta a una pequeña población denominada células de Clara variantes, que se supone poseen la capacidad de regenerar el epitelio dañado (Giangreco et al., 2004; Volckaert et al., 2011). Estos precursores son capaces de diferenciarse tanto a células de Clara como a células ciliadas del epitelio lo que dará lugar a la regeneración completa del mismo. A nivel molecular, el daño epitelial hace que las células del músculo liso parabronquial localizado bajo la membrana basal secreten Fgf10 que actúa sobre los nichos de células madre Clara variantes en el BADJ y NEB (ver Figura 3), induciendo su proliferación al actuar sobre los receptores Fgfr2b y activar la expresión de diferentes genes como *Snail1*, *Notch1*, *Sftpc* y también *Wnt7b*, que activan la regeneración del epitelio (Figura 19) (Volckaert et al., 2011).



**Figura 19. Esquema que representa el estudio del epitelio pulmonar antes y después de la inducción de daño por naftaleno** (Volckaert et al., 2011). Se representa la morfología del epitelio pulmonar de los bronquiolos terminales y de la zona alveolar adyacente en estado normal (D0), y los cambios histológicos inducidos por la toxicidad del naftaleno sobre las células de Clara después de tres días de la administración (D3) o tras catorce días de recuperación (D14).

La característica distintiva de la reparación celular del pulmón después de producirse daño con naftaleno es una respuesta rápida proliferativa que en última instancia conduce a la restauración del epitelio respiratorio y de su función. Los procedimientos experimentales de administración de naftaleno permiten estudiar en detalle cómo ocurre la regeneración del epitelio bronquiolar y por lo tanto el modelo del daño por naftaleno es de gran ayuda para el estudio de la biología de las células de Clara y para el estudio de los linajes celulares entre los diferentes tipos de células epiteliales de las vías respiratorias pulmonares. Es por ello que ha sido, y todavía es usado por muchos investigadores interesados en estos temas (Evans et al., 1978; Hong et al., 2004; Rawlins et al., 2009b; Tiozzo et al., 2009; Volckaert et al., 2011; Asselin-Labat and Filby, 2012).

#### 4.2. Hiperoxia

El modelo de hiperoxia se usa principalmente para el estudio del daño y regeneración del epitelio alveolar. Aunque existan diferentes protocolos de hiperoxia, en general el modelo consiste en someter al ratón a altas concentraciones de oxígeno (entre el 70 y el 100%)

durante diferentes periodos de tiempo (48-72 h) produciéndole daño celular para después dejarles varios días o semanas para estudiar la regeneración del tejido.

A nivel celular la hiperoxia genera radicales libres que pueden dañar el epitelio y el endotelio del parénquima pulmonar. En ratones adultos, la hiperoxia inducida por O<sub>2</sub> provoca la muerte celular de las células epiteliales alveolares tras dos o tres días, y la reparación se completa durante las dos semanas siguientes (Pagano and Barazzone-Argiroffo, 2003). La fase primaria de la toxicidad pulmonar hiperóxica consta de daño en el epitelio y en el endotelio, provocando edema e infiltración de células inmunes. La fase secundaria subsiguiente consiste en la proliferación de células AEC2, fibrosis intersticial y deterioro del intercambio gaseoso (Weinberger et al., 2002).

En los modelos animales, la hiperoxia prolongada da lugar a alteraciones histopatológicas similares a las encontradas en la lesión pulmonar aguda inducida por los respiradores que se les aplican a pacientes con insuficiencia respiratoria. Estas alteraciones incluyen la aparición de edema, formación de membranas hialinas, lesiones vasculares y fibrosis pulmonar (Nash et al., 1967; Jones et al., 1985). La hiperoxia alveolar mantenida da lugar a fenómenos de destrucción celular, tanto por necrosis como por apoptosis que se han podido observar tanto en modelos de cultivos celulares como *in vivo* (Pagano and Barazzone-Argiroffo, 2003; Wang et al., 2003b; Husari et al., 2006; Altemeier and Sinclair, 2007; Kallet and Matthay, 2013). Los signos más precoces de daño celular por hiperoxia, en modelos experimentales en ratas, aparecen en las células endoteliales de los capilares pulmonares que muestran indicios de necrosis consistentes en rotura de las membranas citoplasmáticas y nucleares y destrucción de orgánulos celulares (Kistler et al., 1967; Crapo et al., 1980). En los pulmones sometidos a hiperoxia se ha observado un incremento de la actividad de las caspasas entre ellas la caspasa 3 (Wang et al., 2003b; Pedreira et al., 2006). Otros efectos de la hiperoxia son la inducción de una expresión aumentada en la producción de diferentes citoquinas y factores de crecimiento vascular endotelial, y la activación de la matriz extracelular, teniendo profundas implicaciones en la lesión y reparación pulmonar en diferentes modelos (Crapo et al., 1980; Fu and Xue, 2007; Chetty et al., 2008; Liu et al., 2009).

Como ya se ha mencionado entre los genes implicados se encuentran los IGFs, y hay evidencia de que niveles reducidos de IGF1R (Narasaraju et al., 2006) en el pulmón favorecen la resistencia al daño por hiperoxia (Ahamed et al., 2005). El trabajo futuro para determinar *in vivo* las células específicas afectadas y los mecanismos responsables de la reparación del daño en estos modelos de lesión puede proporcionar herramientas adicionales para profundizar en el conocimiento de las bases celulares y moleculares de la regeneración pulmonar tras el daño por hiperoxia.



## **OBJETIVOS**



## HIPÓTESIS

Basándonos en lo expuesto en la Introducción, en esta Tesis doctoral pretendemos obtener un mayor grado de conocimiento sobre la implicación funcional de la señalización por IGF1/IGF1R en el desarrollo embrionario y postnatal del pulmón, estudiando modelos de ratones modificados genéticamente. Para ello proponemos dos hipótesis:

**HIPÓTESIS 1** - La carencia de IGF1 durante el desarrollo embrionario del pulmón de ratón altera la señalización y los niveles de expresión de genes diana con actividad reguladora en proliferación y diferenciación celular en diferentes compartimentos del pulmón.

**HIPÓTESIS 2** - IGF1R es necesario para la adecuada diferenciación de las células epiteliales pulmonares.

Para comprobar estas hipótesis nos propusimos los objetivos que se plantean a continuación.

## OBJETIVOS

1. **Determinar** los perfiles de expresión de genes del sistema IGFs/Ins durante el desarrollo del pulmón de ratón y **caracterizar** a nivel celular la expresión de IGF1R en el pulmón prenatal y adulto murino.
2. **Evaluar** las alteraciones en la expresión de genes del sistema IGFs/Ins, así como los cambios en la activación de los mediadores de señalización en los pulmones prenatales de los ratones deficientes de IGF1.
3. **Validar** a nivel proteico como genes diana de IGF1 los factores de transcripción Nfib, Klf2, Egr1, c-Jun y FoxM1, y las proteínas matricelulares Cyr61 y Ctgf durante la maduración prenatal del pulmón de ratones mutantes *Igf1<sup>-/-</sup>*.
4. **Generar** y **caracterizar** preliminarmente ratones mutantes condicionales de *Igf1r* en el epitelio pulmonar, determinando su efecto sobre la capacidad de diferenciación y regeneración de las células del epitelio.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. Generación y mantenimiento de las colonias de ratones mutantes

### 1.1. La colonia de ratones mutantes para *Igf1*

Los ratones mutantes para el gen *Igf1*, inicialmente cedidos por el Dr. Argiris Efstratiadis (Liu et al., 1993) fueron retrocruzados a un fondo genético C57Bl/6J realizando un mínimo de 5 retrocruces sucesivos con el fin de uniformizar la gran variabilidad en el fenotipo atribuible al fondo genético mixto. Esta colonia fue generada y mantenida en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (SEA-USAL) y después fue trasladada al animalario del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR). Para el mantenimiento de la colonia se cruzaron animales heterocigotos (*Igf1*<sup>+/-</sup>) entre sí o con animales de genotipo normal (*Igf1*<sup>+/+</sup>). Los animales se han alimentado y manejado de acuerdo con la directiva del Consejo de la Comunidad Económica Europea (86/609/EEC), y según los procedimientos aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Salamanca y por el Comité de Ética de Experimentación Animal del CIBIR, (CEEA-CIBIR, Logroño).

#### 1.1.1. Obtención de embriones y disección de pulmones prenatales en los ratones mutantes para *Igf1*

Dado que en esta colonia todos los ratones *Igf1*<sup>-/-</sup> se mueren al nacer, el estudio se ha centrado en mutantes del periodo embrionario. Para generar y estudiar los embriones, las hembras heterocigotas se cruzaron con machos sementales también heterocigotos, y a la mañana siguiente se sometieron a examen de presencia de tapón vaginal. Para determinar el estadio embrionario, se consideró la mañana en la que se encuentra el tapón vaginal en la hembra como día embrionario 0,5 (E0,5). Los embriones de estadio E12,5, E14,5, E16,5 y E18,5 fueron obtenidos por cesárea de las madres gestantes. En el caso de los embriones E18,5 tras su disección, se dejaron durante 20 min bajo una lámpara de calor mientras se les masajeaba para reanimarles y ayudarles a respirar (Figura 20). A continuación se pesaron en una balanza de precisión, se sacrificaron en hielo y se les cortó un trozo de cola para extraer ADN para su genotipado. En cada caso, los pulmones de cada estadio se diseccionaron de la cavidad torácica bajo una lupa Nikon SMZ800 (Nikon, Tokio, Japón) para su posterior estudio. A menos que se especifique lo contrario, se utilizaron un mínimo de 3 animales por genotipo (n=3).

Para el tratamiento de las hembras preñadas con glucocorticoides, se añadió corticosterona en el agua de bebida (30 mg/mL) desde el día E9,5, hasta la obtención de embriones E18,5 o hasta el nacimiento, cambiando los biberones cada 2 ó 3 días.



Figura 20. Embriones de ratón en el estadio embrionario 18,5 normales y mutantes sencillos para *Igf1* retrocruzados en un fondo genético C57Bl/6J. El embrión de la izquierda posee un genotipo salvaje para *Igf1* ( $Igf1^{+/+}$ ) y el embrión de la derecha es mutante nulo para dicho gen ( $Igf1^{-/-}$ ).

## 1.2. Modelos de ratones mutantes condicionales deficientes en *Igf1r* en el epitelio respiratorio

Para abordar el estudio de la función de IGF1R en el epitelio respiratorio se generaron y analizaron dos tipos de ratones mutantes condicionales deficientes de IGF1R en las células del epitelio respiratorio. Para conseguir estos mutantes, los ratones mutantes homocigotos para el gen *Igf1r*, con secuencias *loxP* flanqueando el exón 3 y fenotipo normal, a los que se les dominará *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* (Kloting et al., 2008), se han cruzado con dos líneas de ratones transgénicos hemizigotos diferentes ( $Cre^{Tg/+}$ ). Estas líneas de transgénicos también presentan un fenotipo normal, y se caracterizan por expresar la recombinasa *Cre* de forma específica en determinados tipos celulares del epitelio respiratorio de forma dependiente del promotor que dirige el control de su expresión (Figura 21).

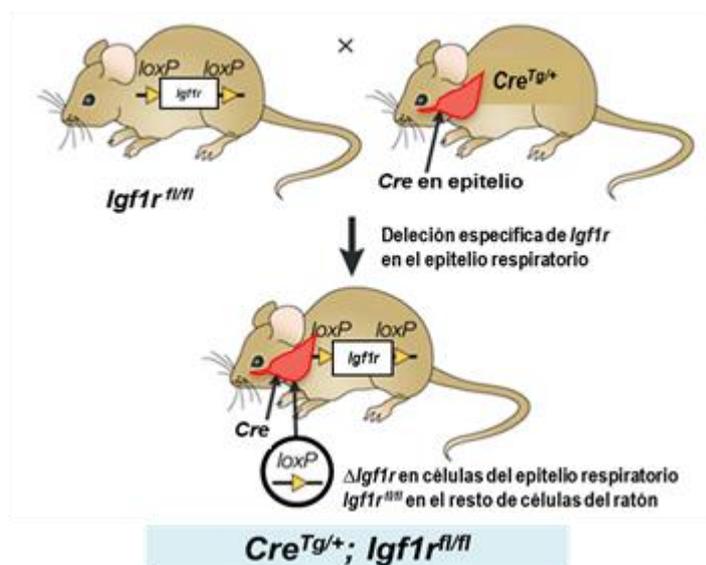
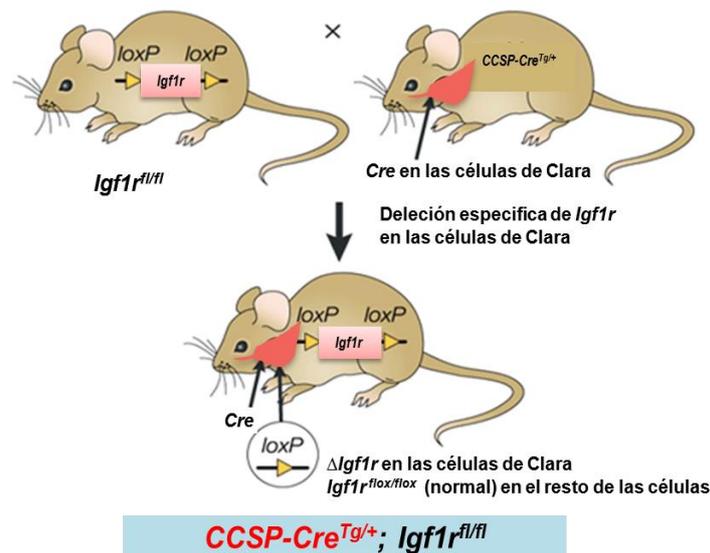


Figura 21. Generación de ratones mutantes condicionales de IGF1R en el epitelio respiratorio. Estrategia de cruces de ratones  $Igf1r^{fl/fl}$  con ratones transgénicos  $Cre^{Tg/+}$  que dirigen la recombinasa a las células del epitelio. *Cre* reconoce las secuencias *loxP* e induce la eliminación del fragmento del gen del *Igf1r* entre los sitios de recombinación *loxP* exclusivamente en las células del epitelio respiratorio generando los ratones mutantes condicionales  $Cre^{Tg/+}; Igf1r^{fl/fl}$ .

**1.2.1. Generación de ratones mutantes condicionales de *Igf1r* en las células de Clara del pulmón: los mutantes *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>***

Para generar los ratones mutantes condicionales en las células de Clara del pulmón se cruzaron los ratones *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>* con los *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* obteniéndose los ratones dobles mutantes *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* (Figura 22). Los ratones mutantes *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* y los transgénicos *CCSP-Cre* fueron generosamente cedidos por el Dr. Jens Brüning (Universidad de Cologne, Alemania) y por el Dr. Michel Tauc (Universidad de Niza, Francia) (Bertin et al., 2005). Ambas líneas de ratones se han descrito con detalle en los apartados 3.1. y 3.2. de la Introducción. Para obtener los mutantes *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* se ha seguido un procedimiento de cruces tal y como se indica en la Figura 23. Con el fin de generar la primera generación, los ratones hemocigotos *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>* se cruzaron con los ratones homocigotos *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* para obtener una F1 con un 50% de descendientes con genotipo doble heterocigoto *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/+</sup>* y 50% *Igf1r<sup>fl/+</sup>*. En la segunda generación, los animales con genotipo doble heterocigoto de la F1 (*CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/+</sup>*) se volvieron a cruzar con animales homocigotos *Igf1r<sup>fl/fl</sup>*. De estos cruces se generaron los cuatro genotipos de la F2 en iguales proporciones: 25% *Igf1r<sup>fl/+</sup>*; 25% *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/+</sup>*; 25% *Igf1r<sup>fl/fl</sup>*; 25% *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*. De éstos, los animales con genotipo *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* son los animales problema de interés para el estudio y los *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* son los verdaderos controles experimentales. Para todos los análisis realizados en esta línea de mutantes se usaron ratones adultos con edades comprendidas entre 3 y 6 meses.



**Figura 22. Generación de ratones deficientes de *Igf1r* en las células de Clara.** El cruce de ratones *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* (Kloting et al., 2008) con ratones transgénicos *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>* que dirigen la recombinasa a las células de Clara (Bertin et al., 2005), genera los mutantes condicionales de *Igf1r* en las células de Clara.

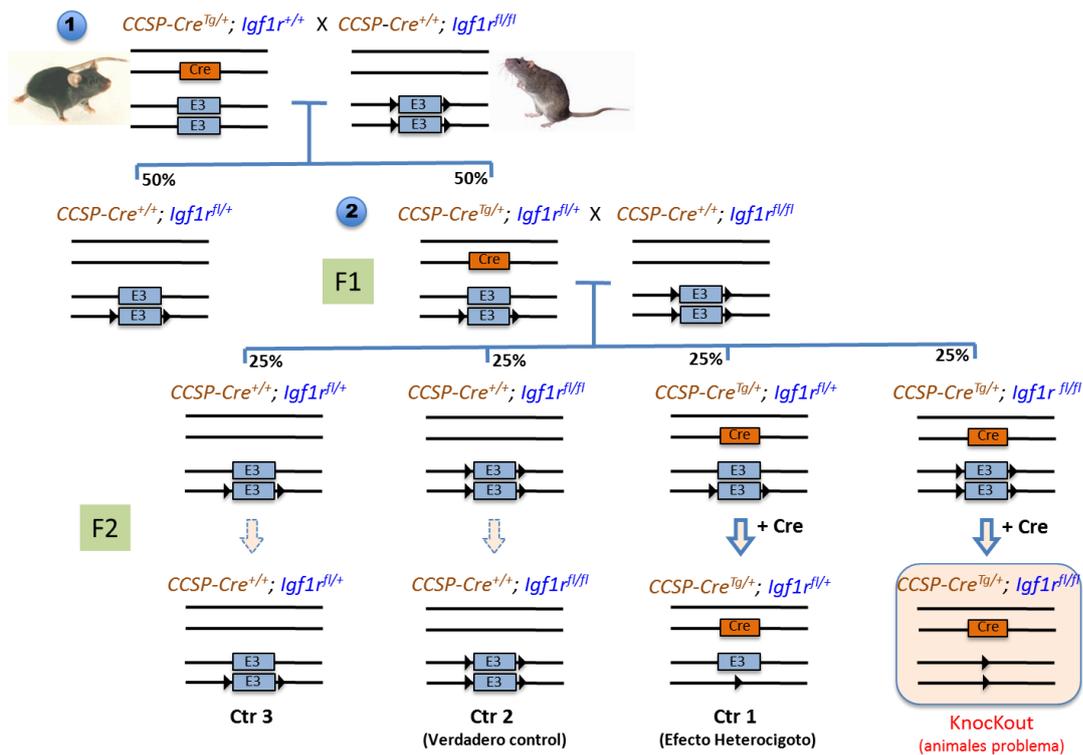
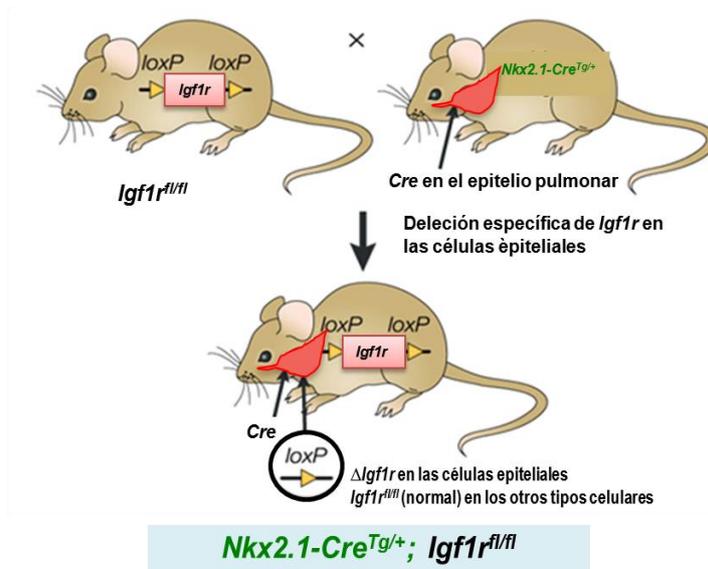


Figura 23. Estrategia de cruzamientos en dos generaciones para generar los ratones mutantes condicionales *Igf1r*. Se muestra la proporción de genotipos obtenidos en cada generación (F1 y F2) y su uso experimental.

### 1.2.2. Generación de los ratones mutantes condicionales de *Igf1r* en todo el epitelio respiratorio: los ratones *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*

Para generar los ratones mutantes condicionales en todo el epitelio, los ratones *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* se cruzaron con los ratones *Nkx2.1-Cre* en hemicigosis (Figura 24), siguiendo el mismo procedimiento de cruces que se ha mencionado en el apartado anterior (Figura 23). Los ratones transgénicos *Nkx2.1-Cre*, cedidos por el Dr. Stewart Anderson (Professor of Psychiatry en Weill Cornell Medical College, Nueva York) (Tiozzo et al., 2009), se trajeron desde el laboratorio del Dr. Óscar Marín (Instituto de Neurociencias, CSIC (Universidad Miguel Hernández, Alicante, España). Las características de esta línea de transgénicos se han descrito en detalle en el apartado 3.3. de la Introducción. Para todos los análisis realizados en esta línea de mutantes se usaron ratones adultos con edades comprendidas entre 3 y 4 meses.



**Figura 24. Generación de ratones deficientes de *Igf1r* en células del epitelio respiratorio pulmonar.** El cruce de ratones  $Igf1r^{fl/fl}$  con ratones transgénicos  $Nkx2.1-Cre^{Tg/+}$  que dirigen la recombinasa *Cre* a las células del epitelio pulmonar desde los bronquios a la zona alveolar, generan los mutantes condicionales  $Nkx2.1-Cre^{Tg/+}; Igf1r^{fl/fl}$ .

### 1.3. Genotipado de los ratones mutantes

#### 1.3.1. Extracción de ADN genómico

Para el genotipado de los animales se ha obtenido ADN genómico a partir de las colas de los animales tanto de los embriones en diferentes estadios, como de los animales en el momento del destete. Fragmentos de las colas se digirieron en (0,5 mL) de tampón de lisis (Tris-HCl 100 mM, pH 8,5, EDTA 5 mM, SDS 0,2% y NaCl 200 mM) con 5  $\mu$ l de Proteínasa K 20 mg/mL (Roche Diagnostics). Esta digestión se incubó toda la noche a 55°C con agitación. Al día siguiente, las digestiones se centrifugaron a alta velocidad (16000xg) durante 60 min. Se transvasó 0,5 mL de sobrenadante a un tubo nuevo, y se precipitó el ADN con 0,5 mL de isopropanol. El tubo se agitó hasta que apareció el ovillo de ADN. Tras una centrifugación de 10 min a velocidad máxima se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70%. Tras centrifugar 5 min se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar al aire. Este precipitado se resuspendió en 50  $\mu$ l de Tris-HCl 10 mM, pH 8,5, y se almacenó a -20°C hasta su uso para genotipado por PCR.

Para obtener el ADN genómico de los órganos se procedió de igual forma que con las colas, pero digiriendo con proteínasa K un fragmento del tejido en estudio. En el caso de las colonias flotantes de células madre de pulmón o de células epiteliales de la tráquea obtenidas por raspado con bisturí en PBS, éstas se recogieron por centrifugación y se añadió la solución de lisis para proceder a su digestión de igual forma que en los tejidos. Para obtener el ADN genómico de las células adheridas a las placas de cultivo, se añadió solución de lisis y se

dejaron a 37°C toda la noche en el incubador, para después proceder con el protocolo arriba indicado.

### 1.3.2. Genotipado de ratones por PCR

El genotipado de los ratones se realizó por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR. Para la línea de ratones *Igf1* se usó 1 µl de ADN genómico (300-500 ng) para amplificar en una misma reacción, un fragmento que corresponde al alelo silvestre de *Igf1* y un segundo fragmento perteneciente a la unidad transcripcional de resistencia a neomicina (Neo) presente en el alelo mutado. Las secuencias de los cebadores que fueron utilizados en la reacción y el tamaño de los amplicones generados se muestran en la Tabla 4. La longitud de la banda esperada con los cebadores específicos para *Igf1* es de 250 pb mientras que la esperada para Neo es de 284 pb. Una reacción típica para el genotipado de los animales se realiza en un volumen total de 20 µl con 1 µl de ADN genómico de ratón, 2 µl de tampón Taq polimerasa 10X (Roche), 2 µl desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 2 mM (Roche), 1,5 µl cebador sentido y antisentido *Igf1* 5 µM (Sigma), 2,5 µl de cada cebador Neo 5 µM (Sigma) y 0,1 µl de la enzima Taq polimerasa (5 U/µl, Roche) (Moreno-Barriuso et al., 2006).

La reacción de genotipado para la línea de *Igf1<sup>fl/m</sup>* se llevó a cabo a través de la amplificación de un fragmento de 300 pb para el gen silvestre y 350 pb para el gen floxeado, usando cebadores específicos del locus *Igf1r* (Tabla 4) (Figura 15 de la Introducción). En la reacción de 20 µl se usaron 2 µl de tampón Taq polimerasa 10X (Roche), 2 µl de dNTPs 2 mM (Roche), 2 µl cebador sentido 600bp (5') y 2 µl del antisentido 1kb3' (5 µM cada uno, Sigma) (Tabla 4), 0,2 µl de DMSO (Sigma), 0,1 µl de la enzima Taq polimerasa (5 U/µl, Roche) y 1 µl de ADN genómico (Kloting et al., 2008; Romero et al., 2010).

Para el genotipado del transgen *CCSP-Cre* se amplificó un fragmento de 100 pb del gen de *Cre* (Bertin et al., 2005). Como control interno de la reacción se amplificó un fragmento de 325 pb del gen interleuquina 2 (*Il2*) (Tabla 4). La reacción se realizó en un volumen total de 25 µl con 1 µl de ADN genómico de ratón y los siguientes componentes: 2,5 µl de tampón Taq polimerasa 10X (Biotools), 1 µl de MgCl<sub>2</sub> (Biotools), 2,5 µl de la mezcla de los cuatro dNTPs 2 mM cada uno (Roche), 2 µl cebador sentido y antisentido para *Cre* 5 µM (Sigma) (Tabla 4), 2 µl cebador sentido y antisentido *Il2* 5 µM (Sigma) y 1 µl de la enzima Taq polimerasa (1 U/µl, Biotools).

Para genotipar los ratones transgénicos *Nkx2.1-Cre* el diseño de los cebadores específicos genera un fragmento de 666 pb (Tabla 4). Como control interno de la reacción también se amplificó un fragmento de 325 pb del gen interleuquina 2 (*Il2*) (Tabla 4). Para la reacción de PCR se utilizaron 2 µl de tampón Taq polimerasa 10X (Biotools), 0,6 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Biotools), 2 µl de dNTPs 2 mM (Roche), 2,5 µl cebador sentido *Nkx2.1*, 5 µM, 2,5 µl

del antisentido Crep1 5 µM (Sigma) (Tabla 4), 1 µl cebador sentido y antisentido Il2 5 µM (Sigma) y 1 µl de la enzima Taq polimerasa (1 U/µl, Biotools).

Para comprobar la delección del exón 3 en la mutación *Igf1r* tras la acción de recombinasa *Cre* se procedió a su respectiva identificación por PCR. Usando los cebadores específicos mostrados en la Tabla 4, el fragmento de la delección en *Igf1r* es de 491 pb, frente a los de 1300 pb en el alelo floxeado y 1220 pb en el alelo normal o WT (Figura 15 de Introducción) (Kloting et al., 2008; Romero et al., 2010). Para esta reacción de PCR de 20 µl se usaron 2 µl de tampón 10X (Biotools), 0,6 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2 µl de dNTPs, 0,4 µl de DMSO (Sigma), 2 µl del primer IGF1R 5' 5 µM, 2 µl del primer 1kb3' 5 µM y 1 µl de la *Taq* polimerasa (Biotools, 1 U/µl).

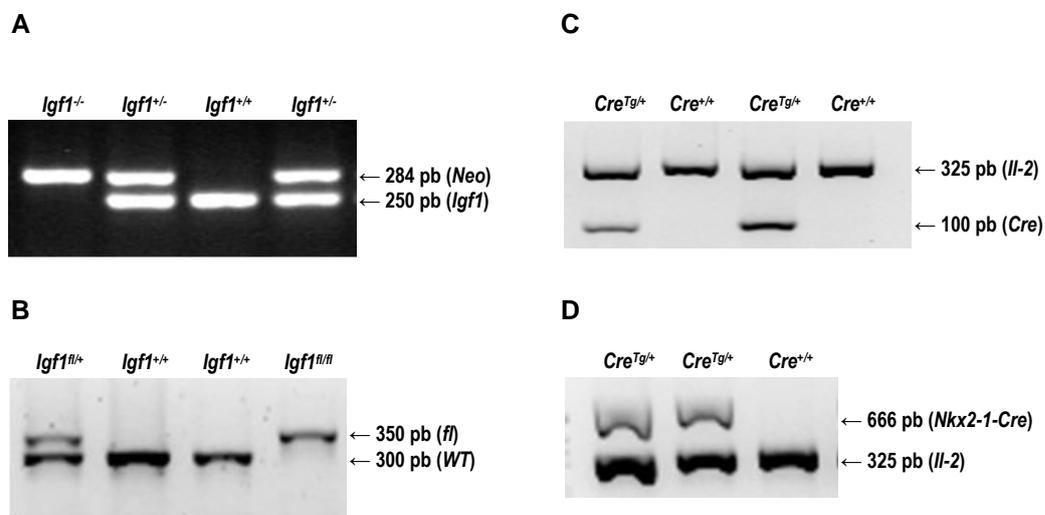
**TABLA 4: Oligonucleótidos específicos usados en la reacción de PCR para el genotipado de ratones mutantes para *Igf1*, mutantes condicionales *Igf1r* y las líneas de transgénicos *CCSP-Cre* y *Nkx2.1-Cre*.**

Gen	Alelo/Transgen	Cebador	Secuencia 5'→3'	Fragmento amplificado	Alelos
<i>Igf1</i>	<i>Igf1</i>	<b>Igf1 F</b>	GTCTAACACCAGCCCATTCTGATT	250 pb	<i>Igf1</i>
		<b>Igf1 R</b>	ACTCGATTTCACCCCTCGATCG		
	<i>Neo</i>	<b>Neo F</b>	GCTTGGGTGGAGAGGCTATTC	284 pb	<i>Neo</i>
		<b>Neo R</b>	CAAGGTGAGATGACAGGAGATC		
<i>Igf1r</i>	<i>IGF1R/Flox</i>	<b>600bp (5')</b>	TCC CTC AGG CTT CAT CCG CAA	300 pb/	<i>WT</i>
		<b>1kb3'</b>	CTT CAG CTT TGC AGG TGC ACG	350 pb	<i>Floxeado</i>
<i>CCSP</i>	<i>CCSP-Cre/</i>	<b>Cre F</b>	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC	100 pb	<i>Cre</i>
		<b>Cre R</b>	GTGAAACAGCATTGCTGCTCACTT		
<i>Nkx2.1</i>	<i>Nkx2.1-Cre</i>	<b>Nkxin1p</b>	CCACAGGCACCCCACAAAAATG	250 pb	<i>Nkx2.1-Cre</i>
		<b>Crep1</b>	GCCTGGCGATCCCTGAACAT		
<i>Il2</i>	<i>Il-2</i>	<b>IL-2 F</b>	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	284 pb	<i>Il-2</i>
		<b>IL-2 R</b>	GTAGGTGGAATTCTAGCATCATCC		
<i>Igf1r</i>	<i>Delección</i>	<b>Igf1r del 5'</b>	TTA TGC CTC CTC TCT TCA TC	491 pb/	<i>Delección</i>
		<b>1kb3'</b>		1300 pb/	<i>Floxeado</i>
				1220 pb	<i>WT</i>

El protocolo de amplificación empleado varía en cada línea de ratones. Comienza con un paso inicial a 94°C para desnaturalizar el ADN durante 2 minutos en la línea *Igf1*, 3 minutos

para *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* (WT vs floxeado) y *CCSP-Cre*, 5 minutos para la línea *Nkx2.1-Cre* y 4 minutos para genotipar la delección en *Igf1r*, seguido de 35 ciclos de amplificación en las líneas *Igf1* y *Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, y 30 ciclos en las restantes. Cada uno de estos ciclos consta de tres pasos: i) desnaturalización, 94°C durante 30 segundos, excepto para la delección en *Igf1r* que se extendió en 45 segundos; ii) anillamiento de cebadores con el ADN, 58°C para la línea *Igf1* y delección en *Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, 60°C para *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>* y 56°C para *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* y *Nkx2.1-Cre* y iii) elongación, 72°C durante 30 segundos excepto la línea *Nkx2.1-Cre*, 1 min y la delección en *Igf1r* que se hizo durante 1 minuto y 20 segundos. Por último se llevó a cabo una elongación final a 72°C durante 7 min para todas las líneas excepto para la delección, que se prolongó a 10 minutos. Para llevar a cabo las reacciones de amplificación se utilizó un termociclador (Applied Biosystem).

Las bandas amplificadas fueron separadas por electroforesis en geles de agarosa 2,5% en TBE y colorante *Gel Red<sup>®</sup>* (Biotium 1:10000). De los 20 µl de reacción de PCR en los geles se cargaron 10 µl a los que se le añadieron 2 µl de una solución de carga azul de Bromofenol (BrBlue, 30% glicerol en 1XTBE). La electroforesis se resolvió a 80 V entre 30 minutos, 1 h o 5 h, dependiendo del tamaño de los fragmentos a amplificar. Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN analizados, se incluyó en los geles un marcador de peso molecular (Roche). En la Figura 25 se muestran ejemplos representativos de geles de las diferentes líneas analizadas.



**Figura 25. Análisis del genotipo de ratones mutantes *Igf1* e *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* y los transgénicos *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>* y *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>* por PCR.** Fotografía de geles de agarosa teñidos con Gel Red<sup>®</sup> donde se separaron por electroforesis los productos de la reacción de amplificación. **A.** En los animales control sólo los cebadores específicos para *Igf1* son capaces de amplificar un fragmento de ADN (*Igf1*), en el caso de los animales nulos para *Igf1* sólo resulta positiva la amplificación con los cebadores para *Neo*. Los ratones heterocigotos generan dos bandas correspondientes a los dos alelos. **B.** Amplificación de los fragmentos correspondientes a los dos alelos del gen *Igf1*, la forma normal o *WT* y la forma floxeada (*fl*) que identifica los tres genotipos. **C.** Amplificación de *Cre* en los animales *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>*. El fragmento *Il2* se usó como control positivo interno y se genera en todas las muestras. **D.** Genotipados de la línea *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>*. Los animales que poseen *Cre* (transgénicos) presentan un amplicon de 666 pb. El fragmento de *Il2* es el control interno.

## 2. Análisis funcional no invasivo de la función respiratoria

La función respiratoria se realizó siguiendo el método de Conejero *et al.*, (Conejero *et al.*, 2007). Para evaluar los parámetros de la mecánica ventilatoria se realizó un análisis no invasivo de la función pulmonar usando pletismografía corporal total. Estas pruebas se realizaron con el animal consciente y libre, emplazado en un pletismógrafo herméticamente cerrado donde se les suministra un aerosol (Buxco Electronics, Troy, NY, EE.UU). El pletismógrafo consta de cuatro cámaras. Mediante un dispositivo electrónico se registraron las diferencias de presión entre las cámaras donde respiran los ratones y una cámara de referencia. Los principales parámetros registrados fueron: frecuencia respiratoria, volumen corriente, volumen/minuto, tiempos inspiratorio y espiratorio, flujos pico inspiratorio y espiratorio e indicadores de broncoconstricción.

Mediante un nebulizador ultrasónico, y estableciendo un flujo constante de 1 L/min, se procedió a la aerosolización de PBS o de PBS con cantidades crecientes de metacolina en cuatro cámaras independientes y de forma simultánea. Se administraron concentraciones crecientes de metacolina, desde 3 mg/mL hasta 96 mg/mL durante dos minutos de tiempo. Los cambios de presión en la vía aérea se registraron durante los tres minutos siguientes a la administración de cada dosis mediante un neumotacógrafo que transmitió la señal a un analizador informático. Estos cambios de presión, que reflejan el grado de obstrucción de las vías aéreas, se cuantificaron mediante un parámetro denominado "Penh". Éste se obtiene, de forma automatizada mediante la siguiente relación:  $Penh = (Te/Tr-1) * PEF/PIF$ . Donde (Te/Tr-1) corresponde a pausa, "Te" es el tiempo espiratorio, "Tr" es el tiempo de relajación, "PEF" es el pico flujo espiratorio (ml/s) y "PIF" es el pico flujo inspiratorio (ml/s). El estudio se realizó en paralelo en los ratones control (*Igf1<sup>fl/fl</sup>*) y los ratones KO condicionales (*CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>*) (n = 6 por genotipo).

## 3. Modelos de daño y regeneración pulmonar en los ratones mutantes condicionales

### 3.1. Daño y regeneración pulmonar por exposición de los ratones a hiperoxia

El estudio del daño pulmonar por exposición de los ratones a hiperoxia se realizó siguiendo el protocolo usado por Ahamed *et al.*, (Ahamed *et al.*, 2005). Para inducir daño pulmonar por hiperoxia las jaulas de los ratones se introdujeron en una cámara sellada (incubadora de neonatos hospitalaria adaptada) y se expusieron a una concentración de oxígeno entre 90 y 93% durante 72 h a temperatura ambiente. El flujo de oxígeno (ajustado a 1,5 L/min) y la concentración de O<sub>2</sub> (> 90%) y de CO<sub>2</sub> (<0,5%) fue monitorizada y regulada por controladores automáticos. Inmediatamente después de la hiperoxia se determinó a los animales la función respiratoria de forma no invasiva según se describe en el apartado 2. A

continuación se mantuvieron en condiciones normales durante 48 h adicionales antes de su sacrificio. Se analizaron 3 animales por condición y por genotipo. Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal del Hospital Gregorio Marañón (Madrid).

### **3.2. Daño y regeneración de las células de Clara por administración intraperitoneal única de naftaleno**

Para evaluar la capacidad de generación de las células de Clara del epitelio respiratorio (niveles de proliferación y diferenciación celular), éstas se eliminaron mediante la administración única de naftaleno a los ratones normales y a los mutantes condicionales siguiendo el procedimiento experimental previamente descrito (Hong et al., 2001). Brevemente, éste consistió en una única administración intraperitoneal, bien de 10 µl/g de peso de aceite de maíz (Sigma) a los grupos control, o bien de 25 mg/mL de naftaleno (Sigma) en aceite de maíz (10 µl/g de peso) a los grupos experimentales.

Se analizaron entre 3 y 6 ratones de cada genotipo a diferentes días de regeneración del epitelio (3, 7 y 14) tras el día del tratamiento con naftaleno (D0) (Volckaert et al., 2011). Para la determinación de la proliferación celular a todos los animales se les administró 0,1 mg/g de peso BrdU (Roche) 2 horas antes del sacrificio por vía intraperitoneal. Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal del CIBIR con el número CEEA\_CIBIR\_11/11-01.

### **4. Cultivos de los explantes de embriones de la colonia *Igf1***

Los primordios de pulmones embrionarios E16,5 fueron diseccionados bajo una lupa y se posicionaron sobre filtros de policarbonato de 1 µm (Whatmann, Göttingen, Alemania) que a su vez se colocaron sobre una rejilla metálica de fabricación casera en la interfase aire/medio de cultivo. Como medio de cultivo se utilizó un medio definido DMEM-F12 (Invitrogen), sin citoquinas ni factores de crecimiento, suplementado con: apo-transferrina 50 µg/ml (Sigma), 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y streptomina y 0,2 mg/ml de ácido ascórbico (Sigma), que se cambió cada 48 horas (Pichel et al., 1996; Lebeche et al., 1999; Chen et al., 2006). Estos explantes pulmonares se cultivaron a 37°C y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% hasta un máximo de 96 h. En algunos casos los explantes se trataron con IGF1 100 ng/mL (Sigma). Para monitorizar el crecimiento de los primordios se hicieron fotos diariamente a las 6, 24, 48, 72 y 96 horas con un microscopio óptico invertido Axiovert 135 (Zeiss). Se analizaron un mínimo de 10 organocultivos por genotipo.

## 5. Cultivos celulares derivados de pulmón

### 5.1. Cultivos primarios de células mesenquimales pulmonares derivadas de colonias de ratones *Igf1*

Los cultivos primarios de células mesenquimales se obtuvieron por adhesión diferencial según describe Lebeche *et al.*, con modificaciones (Lebeche et al., 1999). Los pulmones de embriones E18,5 de los 3 genotipos *Igf1*<sup>+/+</sup>, *Igf1*<sup>+/-</sup> e *Igf1*<sup>-/-</sup> extraídos de hembras *Igf1*<sup>+/-</sup> cruzadas con machos *Igf1*<sup>+/-</sup>, se diseccionaron bajo una lupa y se colocaron en PBS. Posteriormente se disgregaron enzimáticamente mediante una digestión con 0,1% colagenasa II (GIBCO) y 0,01% DNasa I (Roche) en solución HBSS (Invitrogen) durante 45 minutos a 37°C para el genotipo *Igf1*<sup>+/+</sup> y 30 minutos para los *Igf1*<sup>-/-</sup>. La suspensión celular, con una mezcla de células mesenquimales y epiteliales, se filtró por una malla de Nylon de 70 µm (BD Falcon) y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para sedimentar las células disociadas. Las células sedimentadas se resuspendieron en 4 mL de DMEM (Invitrogen) suplementado con: suero fetal bovino al 10% (Invitrogen) desnaturalizado con calor, L-glutamina 2mM (Invitrogen), penicilina/estreptomicina, 100 U/ml/100 µg/ml respectivamente (Invitrogen) y DMSO 0,5% (Sigma). La suspensión celular derivada de pulmones *Igf1*<sup>+/+</sup>, *Igf1*<sup>+/-</sup> y explantes se sembró en placas de 60 mm y de 35 mm la derivada de *Igf1*<sup>-/-</sup>. Las placas se incubaron a 37°C durante 1 h en un incubador humidificado con atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. El sobrenadante conteniendo las células epiteliales se eliminó, mientras que las células mesenquimales adheridas a la placa se lavaron tres veces con PBS (Invitrogen) y se añadió medio fresco completo. Tras alcanzar un 70-90% de confluencia, aproximadamente a las 18 horas, estas células consideradas en pase 1, se trataron con tripsina 0,25% (Invitrogen) y se pasaron a una dilución 1:2 a nuevas placas que se incubaron hasta que las células alcanzasen un 75% de confluencia. Posteriormente se pasaron de la misma forma a un tercer pase siguiendo el mismo procedimiento en una dilución 1:2. En el caso de que su destino fuese el estudio inmunocitoquímico el tercer pase se realizó a placas de 24 pocillos que poseían cubres de vidrio tratados con polilisina (0,01%, Sigma). Estas células en pase 3 y crecidas hasta subconfluencia (70-90%) en el medio completo de cultivo (10% FBS), se usaron directamente para su estudio o bien se pasaron a un medio de ayuno con muy poco suero (0,1% FBS) durante 16 h adicionales. En algunos casos después de 16 h de ayuno se añadió al medio dos factores de crecimiento IGF1 (60 ng/mL) (R&D system) o IGF2 (30 ng/mL) (R&D system) y se analizaron a diferentes tiempos hasta un máximo de 48 h.

## **5.2. Generación y cultivo de líneas celulares de fibroblastos inmortalizados derivados de ratones mutantes en *Igf1***

Para obtener fibroblastos inmortalizados los cultivos de células mesenquimales se mantuvieron en el medio completo indicado en el apartado 5.1. durante múltiples pases siguiendo un protocolo 3T3. Las células del cultivo que sobrevivieron a la crisis de muerte celular después de 15-20 pases, se clonaron y se verificó su genotipo (*Igf1*<sup>+/+</sup>, *Igf1*<sup>+/-</sup> o *Igf1*<sup>-/-</sup>) por análisis de PCR. Los fibroblastos inmortalizados así generados, y entre los pases 22 y 25 se crecieron en placas de 100 mm hasta sub-confluencia (70-100%). Para los estudios inmunocitoquímicos las células se cultivaron en placas de 24 pocillos con cubres tratados con polilisina. De forma similar que en el apartado 5.1., estas células se usaron directamente en medio de cultivo completo (10% FBS), o bien se cambiaron en un medio de ayuno, en este caso con ausencia completa de suero (0% FBS) durante 16 h adicionales. En algunos casos después del ayuno se añadió a las células IGF1 (60 ng/mL) o IGF2 (30 ng/mL) en el mismo medio de ayuno y se cultivaron durante diferentes tiempos hasta un máximo de 48 h. Se verificó el origen mesenquimal de estas líneas comprobando que expresaban vimentina, un marcador de este linaje celular (Mendez et al., 2010)

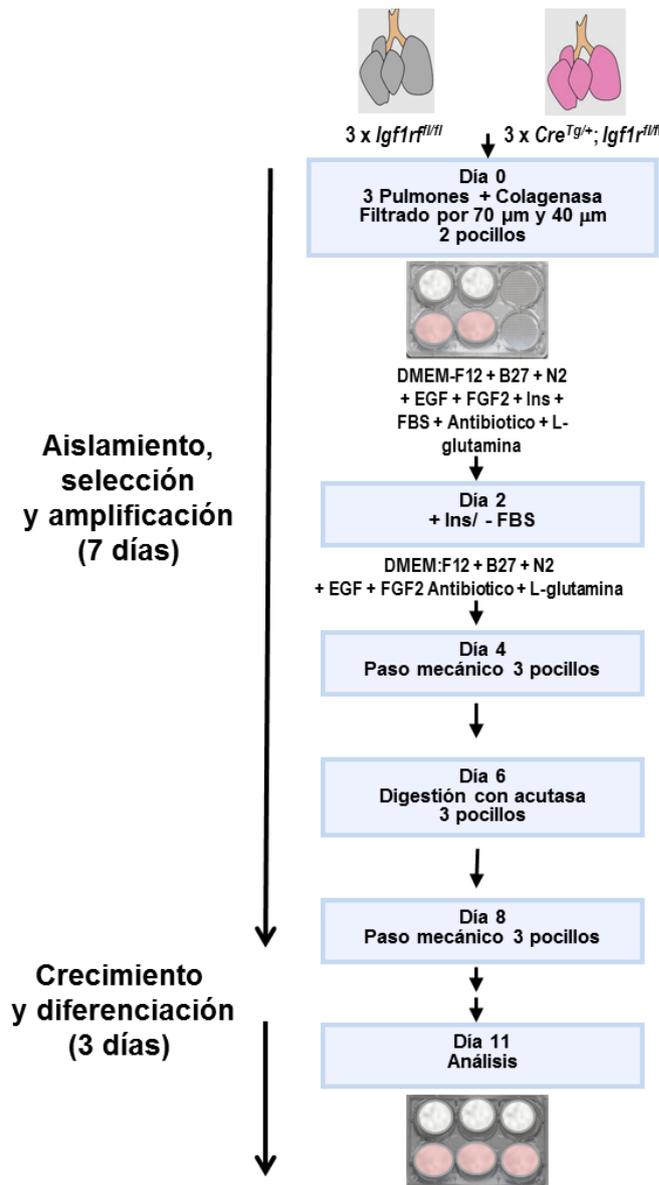
## **5.3. Cultivos de líneas celulares tumorales de pulmón humano**

Las líneas celulares epiteliales tumorales de pulmón usadas fueron: H177, H520, H322, H358, H23, H460, H727, H1299 y A549. Las células de estas líneas se cultivaron en placas de 100 mm (BD Falcon) con 10 mL de volumen de medio de cultivo DMEM (Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2 mM (Invitrogen) y los antibióticos penicilina/estreptomicina (Invitrogen) y se mantuvieron en un incubador a 37°C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% hasta alcanzar un 70-90% de confluencia. Para los pases a una nueva placa, se les aspiró el medio de cultivo, y se lavaron con 3 mL de PBS (conteniendo Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>). Las células se tripsinizaron, se resuspendieron en medio de cultivo completo y tras una centrifugación de 5 minutos a 16000xg, se volvieron a resuspender en medio completo en diluciones adecuadas para ser sembradas en placas nuevas. Su análisis se realizó en medio completo (10% FBS), en medio de ayuno durante 16 h (0% FBS) o añadiendo al medio de ayuno IGF1 o IGF2 hasta un máximo de 48 h.

## **5.4. Aislamiento y cultivo de células madre pulmonares derivadas de ratones mutantes condicionales de *Igf1r***

Los cultivos primarios de células madre pulmonares se obtuvieron por adhesión diferencial, según describe el grupo del Dr. Juan José Ventura (Oeztuerk-Winder et al., 2012). Para cada cultivo y condición se usaron los pulmones obtenidos de tres ratones con el mismo genotipo. Estos tres pulmones tras ser troceados finamente con tijeras se disociaron

conjuntamente mediante una digestión en 0,5-3 mg/mL de colagenasa de tipo III (168U/mg, CLS3 Worthington) en medio de cultivo DMEM durante 30 min y a 37°C en agitación. Tras la incubación, el digerido celular resultante se centrifugó durante 5 minutos a 225xg y tras eliminar el sobrenadante se resuspendió en 5 mL de PBS. La suspensión celular se pasó primero por un filtro de 70 µm (Falcon), seguido de otro de 40 µm (Falcon), y se centrifugó durante 5 min a 225xg. El filtrado celular resultante se resuspendió en un medio de cultivo DMEM-F12 (Invitrogen) suplementado con L-glutamina 2mM (Invitrogen), 100 U/ml de penicilina y streptomina, 10 ng/mL de FGF2 (Peprotech), 10 ng/mL de EGF (Peprotech), 2% de de B27 (Invitrogen), y 1% de medio N2. A su vez la composición del medio N2 es constituida por: 25 mg/mL de insulina humana (Sigma), 0,1 g/mL de apo-transferrina (Sigma), 7,5% de BSA fracción V (Invitrogen), 0,6 mg/mL de progesterona (Sigma), 160 mg/mL de putrescina (Sigma), y 2,99 mM de selenito de sodio (Sigma) todo disuelto en DMEM-F12 (Invitrogen). La suspensión de células (3 mL) se repartió en dos pocillos de una placa de 6 (NUNC), considerando este día como día cero (D0). Durante los dos primeros días de cultivo el medio anteriormente descrito fue suplementado adicionalmente con 5 µg/mL de insulina humana (Sigma) y 2% de FBS. Las células se cambiaron cada 2 días, hasta el día 8 (D8). A partir de aquí se mantuvieron tres días adicionales hasta el día D11, día final del análisis. En los días D2, D4 y D8 los pases se efectuaron exclusivamente disgregando las colonias celulares mediante pipeteo. En el caso del pase del D6 se realizó con ayuda de una disociación enzimática una solución de acutasa 10% (PAA). En cada pase después de su disgregación, la suspensión celular se centrifugó a 225xg y se resuspendieron en 3 mL de medio completo (sin suplemento adicional de insulina ni suero) y se sembraron en 2 pocillos de 3,5 mm, salvo para el día D6 que se resuspendieron en 6 mL y se sembraron en 3 pocillos (Figura 26). En el día del análisis las células se levantaron de la placa mediante pipeteo mecánico y, o bien se dividieron para ser recogidas en citospins (4 citospins/pocillos) (Shadon) y posterior análisis inmunocitoquímico o se centrifugaron y lisaron para obtener ARN, proteínas o ADN genómico.



**Figura 26. Esquema resumen del método de cultivo *in vitro* de células madre del pulmón de ratón.** Una vez diseccionados los pulmones (3 por condición), se prosiguió a su troceado y posterior digestión con colagenasa durante 30 minutos con agitación a 37°C. La suspensión celular se pasó por un filtro de poro de 70 µm, seguido de uno de 40 µm y se sembró en medio completo en dos placas de 3,5 mm. Durante los dos primeros días el medio se suplementó con 5 µg/µl de insulina y 2% de FBS. Tras algunos pases mecánicos y uno enzimático con acutasa cada dos días se procedió a su análisis en el día 11. Las colonias obtenidas se usaron para análisis por inmunofluorescencia, para obtención de ADN genómico, ARN y proteínas para análisis por *Western blot*.

## 6. Obtención y análisis de proteínas de pulmones, organocultivos y cultivos celulares

### 6.1. Obtención de lisados de proteínas de los cultivos celulares

Los lisados de proteína se obtuvieron de pulmones completos diseccionados de embriones o de ratones adultos, de explantes de pulmón cultivados *ex vivo*, y de los diferentes

cultivos celulares. Los pulmones y los explantes de pulmones en cultivo tras ser lavados en PBS frío, se homogenizaron en una solución de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, TRITON X-100 1%, SDS 0,1%, PMSF 1 mM, aprotinina 1 µg/mL, leupeptina 1 µg/mL, pepstatina 1 µg/mL, NaF 1mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, con un homogenizador T8 Ultra Turrax (IKA-Werke). Los pulmones completos de embriones E18,5 cuyo genotipo era *Igf1<sup>+/+</sup>* o *Igf1<sup>-/-</sup>* se lisaron en 500 µl de solución de lisis y en 300 µl los *Igf1<sup>-/-</sup>*. En el caso de los cultivos celulares, las células adheridas se lavaron con PBS frío y se lisaron directamente en las placas usando la solución de lisis arriba indicada. Se usaron 400 µl para las placas de 100 mm y 100 µl para las de 60 mm. En todos los casos, tras una incubación de 15 min en hielo los desechos celulares fueron eliminados mediante centrifugación a 14000xg durante 15 min a 4°C, y los sobrenadantes con los extractos de proteínas se pasaron a un tubo nuevo y se congelaron a -80°C hasta su uso.

## **6.2. Cuantificación de proteínas**

Para cuantificar la cantidad de proteína, se utilizó el sistema de determinación de proteínas Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), basado en el método de Bradford (absorbancia de 595 nm en una solución ácida de azul de Coomassie G-250 cuando el colorante se une a proteína). El cálculo de la concentración de proteína, se determinó por interpolación en una recta patrón, empleando diluciones de concentración conocida de proteína a partir de una solución patrón de 1 mg/mL de seroalbumina bovina (BSA, Bio-Rad). La recta patrón se generó preparando las diluciones de las muestras en pocillos de 96 de fondo plano (Falcon). Para ello se prepararon por duplicado, en un volumen final de 262 µL en agua estéril, soluciones de cantidad conocida de proteína (0 a 10 µg) a las que se les añadió 2 µL de la misma solución de lisis en la que se encuentra el extracto de proteínas y 50 µL del colorante (Dye Reagent, Bio-Rad).

Para determinar la cantidad de proteína presente en los extractos de las distintas muestras, éstas se pipetearon por duplicado en pocillos de la misma placa en la que se realizó la recta patrón. En cada pocillo se pipetearon 2 µL de muestra, 210 µL de agua estéril y 50 µL del colorante (Dye Reagent). La placa con las diluciones de la recta patrón y las distintas muestras se agitó vigorosamente durante unos segundos en un agitador de placas TITRAMAX 100 (HEIDOLPH), y se pasó a un lector de placas (POLARstar Omega, Biogen), donde se midió la absorbancia a 595 nm.

En todos los casos las concentraciones de las diluciones problema se hicieron coincidir dentro de los valores de los patrones de la recta de calibrado. La calidad y fiabilidad de la medida la aportó el coeficiente de determinación de la recta de calibrado, que osciló entre 0,98 y 1. Con la ecuación de calibrado y las medidas de absorbancia se obtuvieron por interpolación los valores de las concentraciones de las disoluciones problema.

### **6.3. Análisis por *Western blot***

Para la realización de los análisis por *Western blot* entre 10 y 20 µg de extractos proteicos de los lisados pulmonares se mezclaron 1:1 con una solución 2X de tampón de carga (Tris-Cl 200 mM pH 6,8, DTT 400 mM, SDS 8%, glicerol 40%, y azul de bromofenol 0,4%) y se hirvieron durante 10 minutos. Las muestras se separaron en geles de SDS poliacrilamida al 8%, 10% o 15%, dependiendo del tamaño de la proteína de interés, utilizando un tampón de electroforesis que contiene Tris-HCl 0,25 M, glicina 2 M y SDS 0,5%. A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF- Immobilon Transfer membranes – (Millipore) de poro 0,45 µm o de nitrocelulosa de poro 0,2 µm (Millipore) dependiendo del peso molecular de la proteína en estudio, utilizando un tampón de transferencia húmeda (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y metanol 10%). La transferencia se realizó empleando un aparato Mini Trans-Blot Cell (BioRad) con un voltaje de 100 V y a 4°C durante 1 hora y 15 min para proteínas de peso molecular superior a 36 kDa, o durante 30 minutos para proteínas con peso molecular inferior a 36 kDa. Las membranas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 10% en solución TBS-T (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4; KCl 3,0 mM; NaCl 140 mM, y Tween 20 0,1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en TBS-T con BSA 1% durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos empleados y su dilución se muestran en la Tabla 5. Para determinar los niveles de carga de las muestras pulmonares, las membranas se incubaron a la vez con un anticuerpo para la detección de β-Tubulina. Seguidamente, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados conjugados a un fluorocromo durante 1h a temperatura ambiente, y diluidos en leche en polvo desnatada al 10% en TBS-T. La lista y dilución de los anticuerpos secundarios usados se muestra en la Tabla 7. Después de cada incubación, la membrana se lavó 3 veces en TBS-T durante 10 min. La detección de las proteínas se llevó a cabo por fluorescencia utilizando un scanner y software adecuado (Li-COR, Odyssey).

TABLA 5. Origen y dilución de los anticuerpos primarios utilizados para los análisis por *Western blot*

Anticuerpo primario (referencia/clon)	Origen	Dilución	Casa Comercial
CCN1/Cyr61 (Sc-13100)	Policlonal, conejo	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc.
CCN1/Cyr61 (PAB12525)	Policlonal, conejo	1:1000	AbNova Corporation
CCN2/CTGF(Ab6992)	Policlonal, conejo	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
CCN2/CTGF (Sc-14939)	Policlonal, cabra	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc.
IGF1r $\beta$ (C20) (Sc-713)	Policlonal, conejo	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc.
KLF2 (AB4137)	Policlonal, conejo	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
NFIB/NFIB2 (Ab11989)	Policlonal, conejo	1:1000	Chemicon International, Inc.
Foxm1 (MCA4903Z)	Monoclonal, ratón	1:500	AbD Serotec
Erg-1 (Sc-110)	Policlonal, conejo	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc.
c-junc (Sc-44)	Policlonal, conejo	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc.
pAKT (ser473)	Monoclonal, ratón	1:1000	Cell Signaling
AKT (736E11)	Policlonal, conejo	1:1000	Cell Signaling
pERK1/2 (Tyr 202/204)	Monoclonal, ratón	1:1000	Cell Signaling
ERK-2 (C-14) (Sc-154)	Policlonal, conejo	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc.
pSTAT-3 (Tyr705)	Policlonal, conejo	1:1000	Cell Signaling
STAT-3 (Sc-8019)	Monoclonal, ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc.
P-p38 (Tyr180/182)	Policlonal, conejo	1:1000	Cell Signaling
p38 $\alpha$ MAP Kinasa (9218)	Policlonal, conejo	1:1000	Cell Signaling
CC10 (T18) (Sc-9772)	Policlonal, conejo	1:5000	Santa Cruz Biotechnology Inc.
$\beta$ -Tubulina (T4026)	Monoclonal, ratón	1:10000	Sigma

## 7. Histología e Inmunodetección en las células y tejidos

### 7.1. Inmunocitoquímica (ICQ)

Para las tinciones de inmunohistoquímica (ICQ), las células crecidas en cubres se fijaron en paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces durante 5 minutos en tampón HBSS (Invitrogen). A continuación se permeabilizaron con 0,5 ml PBS, NP40 0,5% (Sigma) y Glicina 100 mM (Sigma) durante 10 minutos, y se volvieron a lavar otras tres veces durante 5 minutos con HBSS. Antes de la adición del anticuerpo primario, los portas se trataron durante 1 h a temperatura ambiente con una solución de bloqueo con suero de conejo o cabra al 5% en PBS-T (Tween-20 0,2%) del mismo animal de donde está generado el

anticuerpo secundario. Posteriormente se procedió a la incubación de los cubres con el anticuerpo primario en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche en una cámara húmeda, según las diluciones que se indican en la Tabla 6 (ICQ). Tras tres lavados de 5 minutos en PBS-T, las células se trataron a temperatura ambiente durante 2 h con los anticuerpos secundarios diluidos en solución de bloqueo según se indica en la Tabla 7. Finalmente los cubres se montaron con Mowiol (DABCO 2,5% 4-88), al que se le añadió DAPI (Sigma) sobre el portaobjeto, y finalmente se sellaron con laca de uñas. La detección del anticuerpo se completó utilizando el microscopio confocal (LEICA). En todos los tipos celulares las inmunotinciones se realizaron para los factores de transcripción Nfib, Klf2 y FoxM1, contratiñendo con phalloidina para visualizar los microtúbulos de actina y DAPI para visualizar los núcleos.

### **7.2. Preparación de tejidos para la histología y las tinciones inmunohistoquímicas (IHQ)**

Tanto las cajas torácicas conteniendo los pulmones de los embriones, como los pulmones postnatales o sus lóbulos diseccionados se lavaron en tampón fosfato salino (PBS) frío y se fijaron entre 8-15 horas en 10% de formalina tamponada (Merck). Las muestras se introdujeron en un procesador de tejidos (Shandon Excelsior) que las trató sucesivamente en una graduación creciente de etanoles (70%, 60 minutos; 80%, 60 minutos; 2 veces a 95%, 60 minutos y 2 veces 100%, 60 minutos), seguidos de dos baños en xilol de 45 minutos cada uno y cuatro baños de parafina a 60°C de 60 minutos cada uno. Los bloques de parafina se montaron en una mesa de tallado (Tissue-Tek TEC 5, Sakura, Japón), y se cortaron en secciones seriadas de 3 a 5 µm con un micrótopo Microm HM 310 (Microm). Estas secciones se adhirieron a portaobjetos cargados positivamente SuperFrost Plus (Menzel-Gläser). Los portaobjetos con las secciones se mantuvieron 1 h en una estufa Binder (Tuttlingen) a 60°C, se desparafinaron en dos baños de xilol (proporción 1:1) y se rehidrataron en graduación decreciente de etanoles (VWR) (100%, 100%, 96%, 96%, 70%, 70%) durante 5 min cada uno, para finalmente ser sumergidos en agua destilada.

Para la obtención de criosecciones de los cultivos de explantes de pulmón adheridos a los filtros, las muestras fijadas se sumergieron en sacarosa 20% en PBS durante 24 horas para su criopreservación. A continuación se incluyeron en bloques de Tissue-Teck O.C.T. (Sakura) que se congelaron en isopentano a -80°C, se almacenaron a -80°C y se cortaron en secciones de 5-10 µm con un criostato Microm HM 505N (Microm) en un plano perpendicular al filtro. Tras la realización de tinciones histológicas, y excepto en los casos de técnicas de inmunofluorescencia, las secciones se volvieron a deshidratar en una serie de etanoles de concentración creciente (50%, 70%, 90%, 100%, 100%) durante 5 min cada paso. A continuación los portas se sumergieron en dos baños de xilol durante otros 5 min y se montaron con medio de montaje Eukitt (O. Kindler GmbH & Co). Estas muestras pulmonares

fueron analizadas y fotografiadas con un microscopio óptico BX41 (Olympus) equipado con una cámara digital (DP70, Olympus).

### **7.3. Tinción de Hematoxilina y Eosina**

Para el examen histológico, las secciones de parafina de pulmones E18,5 y las secciones de pulmones adultos, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). En el caso de secciones de parafina las muestras previamente se desparafinaron y se rehidrataron usando el método estándar y fueron entonces teñidas con hematoxilina de Harris (Surgipath, Bretton, Reino Unido) durante 5 min. Se lavaron con abundante agua del grifo y se procedió a la diferenciación de la tinción sumergiendo las secciones durante unos segundos en agua carbonatada (solución saturada de carbonato de litio). Se lavaron de nuevo con agua del grifo y se tiñeron durante 3 min en una solución alcohólica de eosina (Surgipath). Finalmente, tras un último lavado, las secciones teñidas se deshidrataron, se montaron y se analizaron en el microscopio.

### **7.4. Tinciones inmunohistoquímicas de fluorescencia (IHQ)**

Para las tinciones inmunohistoquímicas (IHQ) se emplearon muestras fijadas en 10% de formalina tamponada y embebidas en parafina. Las muestras se desparafinaron y se hidrataron según lo descrito en el apartado anterior. A continuación se procedió al desenmascaramiento de antígenos. Para realizar la doble inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-IGF1R $\beta$ , -IGF1, -CC10, -SPC, -PECAM, -CGRP, -AQp5, -Vimentina, -SMA, -BrdU las secciones se hirvieron durante 3 min en una olla a presión con tampón citrato 10 mM pH 6,0. Para el análisis inmunohistoquímico de IGF2 se sumergieron en una solución EDTA pH 9,0 en un vaso a 95°C durante 20 min. A continuación se dejaron enfriar a temperatura ambiente 20 min, y se lavaron con PBS. A continuación, las secciones se bloquearon en una solución con suero de burro 5% (Vector), Tween al 0,1% y glicina (Sigma) en PBS (PBSTG) durante una hora, se lavaron con PBS y se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios adecuados diluidos en solución de bloqueo (Tabla 6, IHQ). Retirado el anticuerpo primario, se lavaron las secciones con PBSTG y se incubaron según las diluciones que se indican en la Tabla 7 con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 h a temperatura ambiente. Éstos se usaron a una dilución 1:200 para todos los anticuerpos estudiados a excepción del usado para detectar IGF1R $\beta$  que se utilizó a 1:500 (Tabla 7). Todas las muestras pulmonares se contratiñeron con el marcador nuclear DAPI 1  $\mu$ g/mL (Sigma). Por último se montaron con un medio de montaje (Prolong Gold Antifade Reagent de Invitrogen) y se guardaron a 4°C protegidos de la luz. Las muestras de inmunofluorescencia fueron estudiadas con un microscopio confocal (LEICA, modelo S5)

**TABLA 6. Origen y dilución de los anticuerpos primarios utilizados para los análisis por Inmunocitoquímica e Inmunohistoquímica.**

<b>Anticuerpo primario Referencia/clon</b>	<b>Origen</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa Comercial</b>
Actin (phalloidin- O7465)	OREGON GREEN®	1:40 (ICQ)	Molecular Probes O7465
CCN1/Cyr61 (Sc-13100)	Policlonal, conejo	1:200 (ICQ)	Santa Cruz Biotechnology Inc
CCN2/CTGF (Sc-14939)	Policlonal, cabra	1:200 (ICQ)	Santa Cruz Biotechnology Inc
E-Cadherina (3195)	Monoclonal, ratón	1:200 (ICQ)	Neomarkers-Labvision
Foxm1 (MCA4903Z)	Monoclonal, ratón	1:500 (ICQ) 1:50 (IHQ)	AbD Serotec
KLF-2 (AB4137)	Policlonal, conejo	1:400 (ICQ)	Abcam, Cambridge, UK
NFIB/NFIB2 (Ab11989)	Policlonal, conejo	1:100 (ICQ)	Chemicon International, Inc.
Pro-SPC (M-20) (Sc-7706)	Policlonal, cabra	1:100 (ICQ) 1:100 (ICQ)	Santa Cruz Biotechnology Inc
Pro-SPC (AB3786)	Policlonal, conejo	1:1500 (IHQ) 1:1000 (ICQ)	Millipore (Chemicon)
Sca1 (Ly-6A/E)	Alexa Fluor 647 anti- mouse	1:100 (ICQ)	BioLegend
Aqp5 (G19) (Sc-9890)	Policlonal, conejo	1:50 (IHQ)	Santa Cruz Biotechnology Inc
CC10 (T18) (Sc-9772)	Policlonal, conejo	1:400 (IHQ)	Santa Cruz Biotechnology Inc
CGRP (N20) (Sc-8856)	Policlonal, cabra	1:1000 (IHQ)	Santa Cruz Biotechnology Inc
Detyrosinated Tubulin (AB3201)	Policlonal, conejo	1:200 (IHQ)	Millipore (Chemicon)
IGF1 (RB-9240PO)	Policlonal, conejo	1:25 (IHQ)	Naision/Neomarkers R&D
IGF2 (AF-292-NA)	Policlonal, cabra	1:25 (IHQ)	R&D
IGF1Rβ (C20) (Sc-713)	Policlonal, conejo	1:50 (IHQ)	Santa Cruz Biotechnology Inc
PECAM1/CD31 (M20) (Sc-1506)	Policlonal, ratón	1:500 (IHQ)	Santa Cruz Biotechnology Inc
Vimentin (Clone V9)	Monoclonal, ratón	1:40 (IHQ)	DAKO
BrdU (BU1/75)	Monoclonal, rata	1:200 (IHQ)	Abcam
SMA (Clone 1A4) (A5228)	Monoclonal, ratón	1:500 (IHQ)	Sigma

**ICQ: Dilución usada en tinciones inmunocitoquímicas**  
**IHQ: Dilución usada en tinciones inmunohistoquímicas**

**TABLA 7. Origen, dilución y aplicación de los anticuerpos secundarios utilizados en las distintas técnicas experimentales.**

Anticuerpo primario	Dilución	Aplicación	Casa Comercial
Alexa Fluor 633 <sup>®</sup> donkey anti-goat	1:200	ICQ/IHQ	Invitrogen
Alexa Fluor 546 <sup>®</sup> donkey anti-rabbit	1:200/1:500	ICQ/IHQ	Invitrogen
Alexa Fluor 633 <sup>®</sup> goat anti-rabbit	1:200	ICQ/IHQ	Invitrogen
Alexa Fluor 633 <sup>®</sup> goat anti-mouse	1:200	ICQ/IHQ	Invitrogen
Alexa Fluor 647 <sup>®</sup> rabbit anti-goat	1:200	ICQ/IHQ	Invitrogen
Alexa Fluor 488 <sup>®</sup> chicken anti-rat	1:200	IHQ	Invitrogen
Anti-Mouse IRDye 680	1:15000	WB	LI-COR
Anti-Mouse IRDye 800	1:15000	WB	LI-COR
Anti-Goat IRDye 800	1:15000	WB	LI-COR
Anti-Rabbit IRDye 680	1:15000	WB	LI-COR
Anti-Rabbit IRDye 800	1:15000	WB	LI-COR
Anti-IgG Conejo Biotinilado	1:400	IHQ	Vector Labs
Anti-IgG Cabra Biotinilado	1:400	IHQ	Vector Labs
Anti-IgG Rat Biotinilado	1:200	IHQ	Dako

### 7.5. Tinciones inmunohistoquímicas con peroxidasa (DAB)

Para las inmunotinciones con peroxidasa se emplearon secciones de muestras fijadas en 10% formalina tamponada y embebidas en parafina o criosecciones de los explantes de cultivos pulmonares. Los portaobjetos con las secciones de 3  $\mu\text{m}$  en parafina se mantuvieron toda la noche en una estufa Binder (Tuttlingen) a 60°C y se desparafinaron en dos baños de xilol. A continuación se rehidrataron en una serie de etanoles (VWR) en una graduación decreciente (100%, 90%, 70%, 50%), durante 2 minutos cada uno, y finalmente se sumergieron en agua destilada. En el caso de las criosecciones se dejaron a temperatura ambiente durante unos minutos antes de ser sumergidas en un baño con PBS y después en agua. En ambos tipos de secciones para el desenmascaramiento de epítomos de los anticuerpos Nfib y SPC, las secciones de tejido se sumergieron en un baño durante 3 min en una olla a presión con tampón citrato 10 mM, pH 6,0. Posteriormente, las secciones se atemperaron y se lavaron con PBS durante 5 minutos. Para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena las muestras se

incubaron en peróxido de hidrógeno 10% (Sigma), a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras lavar con PBS 3 veces durante 5 minutos las secciones se incubaron durante 90 min a temperatura ambiente con suero de cabra 5% (Vector) en PBST (Tween 0,1% en PBS) para bloquear las uniones inespecíficas. Los anticuerpos primarios se incubaron en una cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Todos los anticuerpos, tanto primarios como secundarios se diluyeron en la solución de bloqueo. En la Tabla 6 se encuentran detallados los anticuerpos primarios utilizados y las diluciones empleadas. Al día siguiente se lavaron las secciones con PBS y se incubaron 90 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado. Los anticuerpos secundarios empleados en todos los casos conjugados con biotina, y sus diluciones se muestran en la Tabla 7. Tras lavar de nuevo las secciones con PBS, se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain ABC Reagent, Vector) para amplificar la señal. La peroxidasa fue entonces revelada con el sustrato 3,3'-diaminobencidina (DAB, Sigma) durante un periodo de tiempo variable según el experimento, normalmente entre 2 y 10 min. Las muestras se lavaron y se contratiñeron con hematoxilina (Dako). Finalmente los portas se deshidrataron y se montaron según lo especificado anteriormente en el apartado 7.2. Las muestras fueron analizadas y fotografiadas con un microscopio óptico BX41 (Olympus), equipado con una cámara digital DP70 (Olympus).

### **7.6. Determinación de la proliferación celular mediante inmunodetección de Bromodeoxiuridina (BrdU) en ratones adultos**

Las células en proliferación se cuantificaron por incorporación nuclear de BrdU in vivo en los pulmones de los ratones adultos analizados tanto por utilización de la peroxidasa como por inmunofluorescencia. Para el marcaje con BrdU, se inyectó a los ratones intraperitonealmente una solución de BrdU (Roche) a una concentración de 0,1 mg/g de peso corporal. Los ratones inyectados fueron sacrificados 2 horas más tarde y procesados para su inclusión en parafina y obtención de secciones tal y como se ha detallado anteriormente. Las secciones se desparafinaron y se hidrataron según lo descrito en el apartado 7.2. Éstas se sometieron a un baño durante 25 minutos en tampón citrato pH 6,0, 10 mM. A continuación, se atemperaron y posteriormente, se lavaron 2 veces con PBS seguido de un tratamiento con HCl 2N en dos pases: el primero fue de 5 minutos a temperatura ambiente y el segundo de 25 minutos a 37°C. A continuación, las secciones se lavaron 2 veces durante 10 minutos en borato 0,1 M, pH 9,5 seguido de dos lavados de 10 minutos en PBS. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó incubando las muestras con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,2% (Sigma), durante 15 minutos. Tras lavar con PBSTG 3 veces durante 5 min las secciones se bloquearon 1 h a temperatura ambiente con suero de conejo 5% (Vector) en PBSTG. Para la detección de las células en proliferación que incorporan BrdU se incubaron las secciones durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo anti-BrdU (AbCam) a una dilución 1:200 en solución de bloqueo. Tras lavar en PBS se procedió a incubarlas con un anticuerpo secundario biotinilado anti-rata a una dilución

1:200 (Dako) durante 1 h a temperatura ambiente. Se amplificó la señal con el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa (Kit ABC - ATOM) y se reveló la señal con DAB (Sigma) según describe el apartado anterior. Por último, las muestras se contratiñieron con hematoxilina de Harris y se montaron tal y como se describe en el apartado 7.2. Además de la realización de la técnica inmunohistoquímica se realizó también la técnica de inmunofluorescencia con un protocolo similar al anteriormente descrito pero con algunas diferencias. Para la recuperación antigénica las muestras se sometieron a un baño en tampón EDTA pH 9 durante 25 minutos, se dejaron enfriar y se lavaron 1 vez en PBS, seguido del mismo tratamiento con HCl 2N e incubación con el anticuerpo primario tal y como se ha descrito anteriormente. A continuación, se lavaron con PBSTG y se incubaron en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente con suero de burro 5% (Vector) en PBST. Tras el lavado del anticuerpo primario con PBS se procedió a incubarlas con un anticuerpo secundario Alexa Fluor 488® anti-rata (Invitrogen), a una dilución 1:200 durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras se contratiñieron con DAPI (1 µg/mL, Sigma). Por último se montaron con un medio de montaje (Prolong Gold Antifade Reagent de Invitrogen) y se guardaron a 4°C protegidos de la luz, hasta su análisis y fotodocumentación con un microscopio confocal (LEICA).

## **8. Determinación de la proliferación celular por incorporación de MTS**

La determinación de los niveles de proliferación en los cultivos celulares se realizó mediante el método colorimétrico de la incorporación por MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (Promega). Este método determina el número de células viables en ensayos de proliferación o de quimiosensibilidad, al incorporar el MTS (de color amarillo) en el medio de cultivo celular. Al aumentar el número de células en cultivo el MTS se reduce a formazano (de color morado) en las mitocondrias de las células proliferantes, y se produce una solución coloreada cuya absorbancia se puede medir en un intervalo de longitud de onda alrededor de 490 nm, determinándose así de forma directa el nivel de proliferación celular. La conversión de MTS en formazano soluble acuoso se lleva a cabo por las enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas. La cantidad de conversión a formazano, medida por la cantidad de absorbancia es directamente proporcional al número de células viables.

El ensayo con MTS se realizó en placas de 96 pocillos en donde se sembraron 15.000 células por pocillo en un volumen de 100 µl de medio. Éste se realizó en las células de diferentes tipos y genotipos y en diferentes condiciones de cultivo: medio completo 10% FBS, medio de ayuno (0% FBS ó 0,1% FBS) y con IGF1 o IGF2 durante 48 h según se describe en los apartados correspondientes (5.1., 5.2., y 5.3. de Material y Métodos).

En el momento adecuado del cultivo se añadió a cada pocillo 20 µl del reactivo MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega #cat. G3582) y las placas se incubaron adicionalmente durante 2 h a 37°C tapadas con papel de aluminio.

Transcurrido ese tiempo se leyó la absorbancia a 490 nm, en un lector de placas POLARstar Omega (Biogen). Los resultados finales se adquirieron de las medias de los datos obtenidos de experimentos independientes con el diseño descrito para los diferentes tipos celulares estudiados: mesenquimales primarias *Igf1*<sup>+/+</sup> (n = 6); mesenquimales primarias *Igf1*<sup>-/-</sup> (n = 4); y la línea celular H1299 (n = 3).

## 9. Obtención y análisis de ARN

Todos los reactivos utilizados en cualquiera de los procedimientos descritos a continuación, fueron preparados con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y el material de laboratorio tratado previamente para inactivar ARNsas.

### 9.1. Extracción de ARN total

El ARN total se obtuvo de pulmones de ratón de diferentes estadios embrionarios y postnatales usando el reactivo Trizol® (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los pulmones diseccionados se lavaron en PBS frío, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido con 0,5 mL de Trizol®, y se almacenaron a -80°C hasta el momento de la extracción. Se homogeneizaron a temperatura ambiente en 1 mL total de Trizol® con un homogeneizador T8 Ultra Turrax (IKA-Werke). Los homogenizados se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la disociación de los complejos nucleoproteicos, se centrifugaron a 4°C para eliminar restos, y se pasaron a un tubo nuevo. Tras añadirles 200 µl de cloroformo, los tubos se agitaron durante 15 segundos y se volvieron a incubar a temperatura ambiente durante 3 min. Estas muestras se centrifugaron a 12000xg durante 15 min a 4°C. Tras la centrifugación, se trasvasó la fase acuosa (ARN) a un tubo limpio y se guardó a -80°C la interfase y la fase orgánica a partir de las cuales se puede aislar ADN y proteínas respectivamente. A la fase acuosa se añadió 500 µl de isopropanol por mL de Trizol inicial y el ARN se obtuvo mediante columnas “RNeasy Mini Handbook” (QIAGEN), siguiendo las especificaciones del fabricante. De forma breve, el ARN precipitado en el sobrenadante con isopropanol se cargó en las minicolumnas. Tras un primer lavado, la columna se trató con una solución de 80 µl de ADNasa (QIAGEN, 2,72 KU/µl) en una solución y condiciones indicadas por el fabricante. Tras posteriores lavados, el ARN se eluyó por centrifugación en 30 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC.

Para cuantificar su concentración y ver su grado de pureza, se tomaron 2 µl de los 30 µl totales y se analizaron con un NanoDrop® (Spectrophotometer, ND-1000). Finalmente la concentración de ARN final se ajustó a 1µg/µl en H<sub>2</sub>O-DEPC.

## **9.2. Síntesis de ADNc por transcripción inversa**

Para obtener ADNc a partir de ARN por la reacción de transcripción inversa (RT), se utilizó el kit SuperScript II First-Strand Synthesis kit (Invitrogen) y un termociclador (Applied Biosystem). Para cada reacción de 20 µl finales, se utilizaron 2,5 µg de ARN de cada una de las muestras objeto de estudio, 1 µL de dNTPs 10 mM, 1 µl de hexámeros (50 ng/µl) ambos reactivos proporcionados por el kit y H<sub>2</sub>O-DEPC hasta completar un volumen de 10 µl, en un tipo de eppendorf de 0,2 mL. Estas mezclas se incubaron a 65°C durante 5 minutos en un termociclador (Applied Biosystem). A continuación se enfriaron durante 2 minutos en hielo y se añadió 9 µl de una mezcla con los siguientes reactivos: 2 µl de tampón RT (10X), 4 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µl de DTT 0,1 M y 1 µl de RNAsaOUT (40 U/µl). Los tubos con estas mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 minutos antes de añadir a cada uno 1 µl de la enzima SuperScript II RT y de incubarlos de nuevo a temperatura ambiente durante 10 minutos adicionales. A continuación los tubos volvieron al mismo termociclador donde se incubaron a 42°C durante 50 minutos para realizar la transcripción inversa, y finalmente 70°C durante 15 minutos para inactivar la enzima. Transcurrido este tiempo se añadió a cada reacción 1 µl de RNAsa H para eliminar el ARN. El ADNc así obtenido se guardó a -20°C hasta el momento de su utilización.

## **9.3. PCR cuantitativa a tiempo real**

La expresión diferencial de los ARNm de cada uno de los genes en estudio se analizó mediante reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real que se llevaron a cabo con la tecnología SYBR Green (iScript™ SYBR® Green PCR Kit, BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR se realizaron en un solo paso en un volumen final de 25 µl, con 100 ng de ADNc aislado de los pulmones de ratón en diferentes estadios del desarrollo (E16,5, E18,5, P1, P15, 4 semanas, 3 meses, 1 año y 19 meses) y una concentración final de 200 nM de los cebadores específicos para cada gen. Los cebadores se diseñaron para que amplificaran productos de PCR entre 70 y 160 pb de longitud, y sus secuencias se detallan en la Tabla 8.

Las reacciones de amplificación se realizaron siempre por triplicado en un termociclador "7300 Real Time PCR System" (Applied Biosystems). Las condiciones para todas las parejas de cebadores fueron las siguientes: un primer paso de 10 min a 95°C; posteriormente se realizaron 40 ciclos basados en una desnaturalización de 15 min a 95°C, un anillamiento de cebadores a 60°C durante 1 minuto y una elongación de 72°C durante 30 segundos. Por último se llevó a cabo una ciclo basado en 95°C, 15 segundos; 60°C, 1 minuto; 95°C, 15 segundos y 60°C, 15 segundos. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software 7300 System SDS.

**Tabla 8. Cebadores utilizados en las reacciones de qRT-PCR**

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5'→3'</b>	<b>Fragmento amplificado</b>
<i>Igf1r</i>	IGF1R F11	CCAGAGCAAAGGGGACATAA	104
	IGF1R R11	TGATTCGGTTCTTCCAGGTC	
<i>Igf1</i>	m-IGF1-F3	CAGAAGCGATGGGGAAAAT	136
	m-IGF1-R3	GTGAAGGTGAGCAAGCAGAG	
<i>Igf2</i>	m-IGF2-F3	CCTTCGCCTTGTGCTGCAT	134
	m-IGF2-R3	ACGTTGGCACGGCTTCAA	
<i>Igf2bp2</i>	m-IGFBP2-F2	GGGAGTGCTGGTGTGTGA	183
	m-IGFBP2-R2	CTGCTGGTGTTCGGGATG	
<i>InsrA</i>	m-IRa-F3	TCCTGAAGGAGCTGGAGGAGT	89
	m-IRa-R3	CTTTCGGGATGGCCTGG	
<i>InsrB</i>	m-IRb-F4	TCCTGAAGGAGCTGGAGGAGT	123
	m-IRb-R4	TTCGGGATGGCCTACTGTC	
<i>CCSP</i>	m-CCSP-249 (CC10)	ATGAAGATCGCCATCACAATCAC	135
	m-CCSP-250 (CC10)	GGATGCCACATAACCAGACTCT	
<i>SPC</i>	SPC-F	GAAGATGGCTCCAGAGAGCATC	129
	SPC-F	GGACTCGGAACCAAGTATCATGC	
<i>Nkx2.1</i>	Nkx2.1-F2	GCAGGTCAAGATCTGGTTCCAG	88
	Nkx2.1-R2	TGTCCTGCTGCAGTTGTTGCTG	
<i>Cyp2f2</i>	Cyp2f2-F2	TGAGGAAAATGGAAGGCAAG	85
	Cyp2f2-R2	CCGAAGACGACAGAGCAGAT	
<i>Gadph</i>	GAPDH-F2	TCCTGCACCACCAACTGCTTA	91
	GAPDH-R2	TGGCATGGACTGTGGTCATGAG	
<i>18S</i>	h/m 18S F	ATGCTC TTAGCTGAG TGTCCCG	110
	h/m 18S R	ATCCTAGCGCGGTATCCAGG	

## **10. Análisis estadístico**

Para el estudio de las características de la distribución de las variables se ha recurrido a pruebas no paramétricas. La prueba de Kruskal-Wallis se usó siempre y cuando los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas no se cumplen, la muestra sea pequeña o los datos sean ordinales. Es un método no paramétrico que permite comparar, en un sólo test, las medianas de un conjunto de k muestras independientes. Otra de las prueba utilizadas fue la prueba de Mann-Whitney U-test (también llamada de Mann-Whitney-Wilcoxon, prueba de suma de rangos Wilcoxon, o prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney). Esta es una prueba no paramétrica con la cual se identifican diferencias entre dos poblaciones basadas en el análisis de dos muestras independientes, cuyos datos han sido medidos al menos en una escala de nivel ordinal. En todos los casos se consideró el valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.



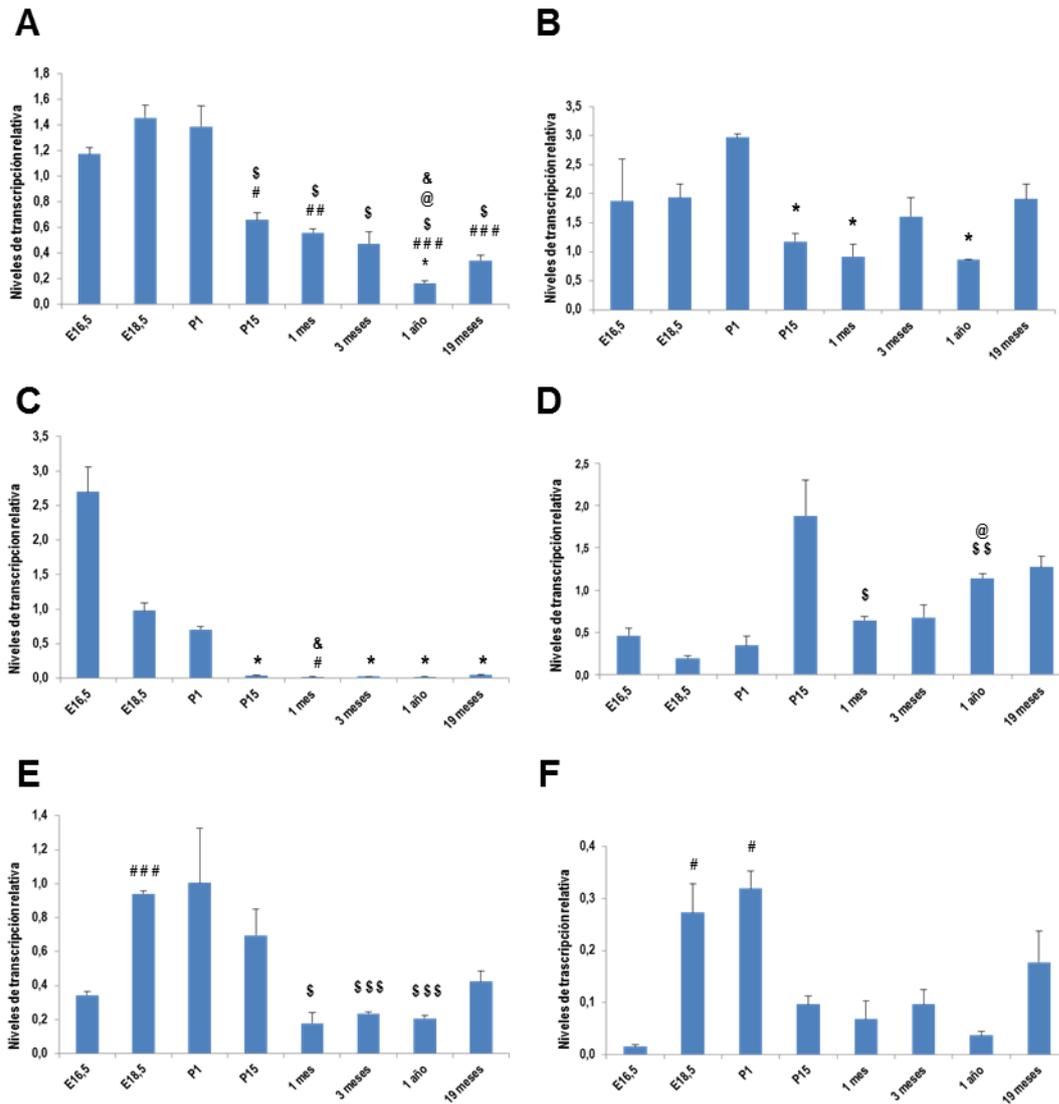
## **RESULTADOS**



## 1. Perfiles de expresión de genes del sistema de IGF/Ins durante el desarrollo del pulmón en el ratón

Dado que los genes IGFs están implicados en el normal desarrollo del pulmón de ratón, como lo demuestran múltiples estudios sobre todo los realizados en ratones mutantes para *Igf1r*, *Igf1* e *Igf2* (Liu et al., 1993; Pichel et al., 2003; Moreno-Barriuso et al., 2006; Silva et al., 2006; Epaud et al., 2012) y que existe la posibilidad de señalización cruzada con genes de la vía de la insulina y sus receptores (Nakae et al., 2001), como primer objetivo decidimos analizar los perfiles de expresión de ARNm de algunos genes del sistema de IGFs/Ins durante el desarrollo pulmonar murino. La determinación de los niveles relativos de expresión de ARNm de estos genes se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) en diferentes estadios del desarrollo pulmonar, desde estadios embrionarios (E16,5) hasta los 19 meses de edad. Los resultados de estos experimentos para los genes *Igf1*, *Igf1r*, *Igf2*, *Igf2bp2*, las dos formas de “splicing alternativo” del ARNm del *Insr* (A y B) se muestran en la Figura 27. Se observa que estos genes se expresan en todos los estadios analizados, salvo *Igf2* que es casi indetectable a partir del estadio P15 (Figura 27C), resultado que concuerda con datos ya publicados donde se menciona que en condiciones normales, *Igf2* no se expresa en estadios postnatales del ratón (Giannoukakis et al., 1993). Los niveles de *Igf1* son más elevados en los estadios tempranos del desarrollo (E16,5; E18,5 y P1) para descender significativamente postnatalmente hasta los 3 meses, y todavía más a partir de esta edad (Figura 27A). Mientras que los niveles de los ligandos *Igf1* e *Igf2* descienden postnatalmente (Figura 27A y 27C) los de su receptor, *Igf1r*, presentan una expresión más constitutiva con la edad (Figura 27B), aunque también se aprecia una reducción significativa en los estadios postnatales P15, 1 mes y 1 año con P1. El perfil de expresión de ARNm de *Igf2bp2* es prácticamente complementario al de *Igf1* e *Igf2*, presentando bajos niveles en los estadios embrionarios, y P1, y un pico de expresión máxima a las dos semanas después del nacimiento (P15), para volver a bajar significativamente en estadios posteriores (1 mes y 1 año) (Figura 27D). Estos resultados corroboran los realizados con los microarrays por Kho *et al.*, (Kho et al., 2009).

Dado que la señalización de IGF1 e IGF2 por IGF1R es compartida con el receptor de la insulina, incluyendo la formación de receptores híbridos funcionales promiscuos (IGF1R/Insrs), (Nakae et al., 2001), se decidió incluir en el estudio los perfiles de expresión de las dos formas de “splicing alternativo” del receptor de la insulina (variantes A y B). Los perfiles de expresión de estos ARNm siguen patrones similares entre sí y también a los de *Igf1* e *Igf1r* con una expresión máxima en el estadio E18,5 y el día 1 postnatal (Figura 27E y 27F). La presencia de ARNm de estos genes durante los diferentes estadios del desarrollo del pulmón, con cambios dinámicos en los niveles de expresión sugiere una posible implicación funcional de estos genes durante el desarrollo pulmonar en el ratón.



**Figura 27. Perfiles de expresión de ARNm de genes del sistema de IGF/Ins durante el desarrollo pulmonar del ratón.** Las gráficas representan los datos de qRT-PCR para los genes indicados usando ARN obtenido de pulmones de ratón de distintas edades. El gen *Rn18s* (ARN ribosómico 18S) se ha usado como control (n = 3 por condición). **A.** Perfil de expresión de *Igf1*. **B.** Perfil de expresión de *Igf1r*. **C.** Perfil de expresión de *Igf2*. **D.** Perfil de expresión de *Igf2bp2*. **E.** Perfil de expresión de *InsrA*. **F.** Perfil de expresión de *InsrB*. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error típico. El resultado del análisis estadístico significativo se representa con los siguientes símbolos: \* diferencias significativas comparado con P1; # diferencias significativas comparado con E16,5; \$ diferencias significativas comparado con E18,5; & diferencias significativas comparado con P15; @ diferencias significativas comparado con 1 mes. Un símbolo,  $p < 0,05$ ; dos símbolos,  $p < 0,01$ ; y tres símbolos,  $p < 0,001$  (Kruskal Wallis).

## 2. Caracterización fenotípica de pulmón prenatal en ratones mutantes *Igf1*<sup>-/-</sup>

-/-

Aunque estudios previos han mencionado o descrito preliminarmente el fenotipo pulmonar de los pulmones de ratones deficientes de *Igf1* (Liu et al., 1993; Powell-Braxton et al., 1993a; Powell-Braxton et al., 1993b; Pichel et al., 2003; Moreno-Barriuso et al., 2006), como segundo objetivo nos propusimos caracterizar el mecanismo molecular de la acción de IGF1 en

la organogénesis pulmonar, analizando la posible implicación de genes diana de IGF1 en los pulmones prenatales de los ratones mutantes *Igf1*<sup>-/-</sup>, con un fondo genético C57Bl/6J. A diferencia de los estudios previos realizados en ratones mutantes con fondo genético mixto, el fenotipo pulmonar en los ratones mutantes *Igf1*<sup>-/-</sup> es mucho más acusado y uniforme en los animales C57Bl/6J (Pais, 2013).

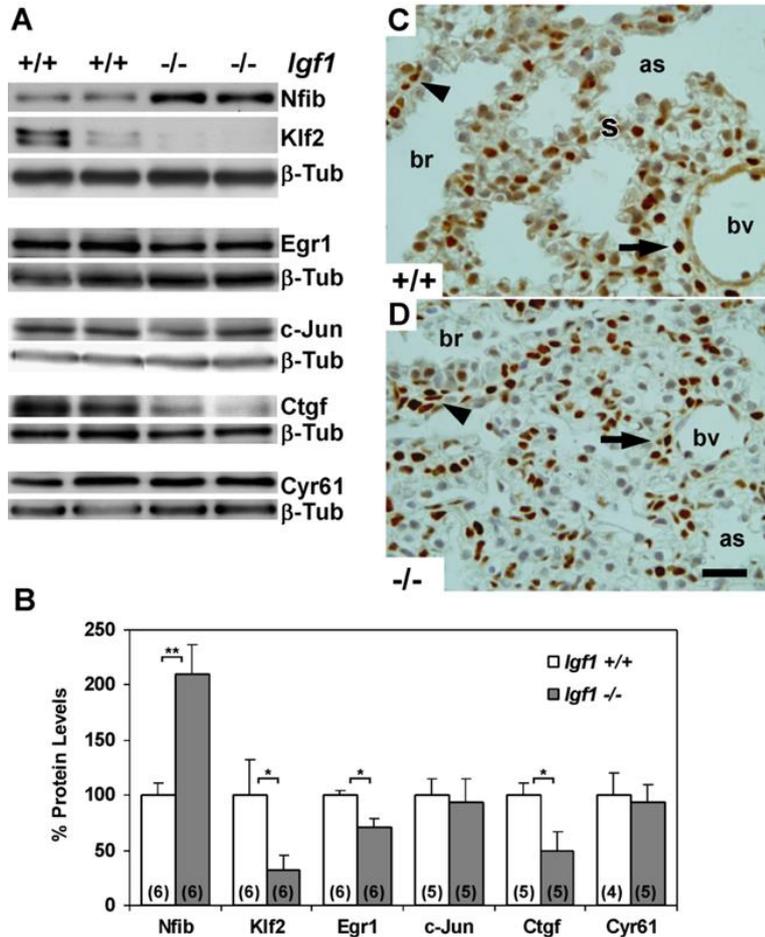
## 2.1. Validación de la expresión diferencial de ARNm de genes reguladores en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup>

En trabajos previos de nuestro laboratorio al estudiar mediante la utilización de *microarrays* la expresión diferencial de ARNm en pulmones prenatales E18,5 de ratones *Igf1*<sup>-/-</sup>, se encontró genes con expresión diferencial significativa, algunos de ellos corroborados por qRT-PCR (Tabla 1 de Introducción) (Pais, 2013). El siguiente objetivo de nuestro trabajo fue comprobar si los cambios de expresión de algunos de estos genes a nivel de ARNm se corroboraban a nivel de proteína. De la lista de genes con expresión diferencial de ARNm se eligieron algunos siguiendo dos criterios: (i) que fuesen genes con funciones reguladoras, y (ii) o bien que se expresasen y tuviesen funciones relacionadas con el desarrollo y maduración del pulmón, (iii) o bien que su expresión se haya descrito previamente regulada por IGF1 en algún sistema biológico. Según estos criterios, entre los genes con expresión diferencial de ARNm en los pulmones E18,5 *Igf1*<sup>-/-</sup> (Tabla 1 de Introducción) se eligieron los factores de transcripción Nfib, Klf2, Egr1 y c-Jun, y los factores matricelulares Cyr61 (CCN1/Igfbp10) y Ctgf (CCN2/Igfbp8). Todos ellos poseen capacidad reguladora de funciones celulares. Los factores de transcripción (Nfib, Klf2 y c-Jun) son proteínas que regulan los niveles de transcripción de otros genes. También se ha atribuido a los factores matricelulares, Cyr61 y Ctgf múltiples funciones reguladoras en diferentes tipos celulares y tejidos así como en patologías (Brigstock, 2003; Perbal, 2004; Dhar and Ray, 2010). Por otra parte, está perfectamente descrita la implicación de Nfib, Klf2 y Ctgf en el desarrollo pulmonar, ya que los ratones deficientes de estos genes presentan alteraciones en el desarrollo embrionario del pulmón (Wani et al., 1999; Grunder et al., 2002; Steele-Perkins et al., 2005; Baguma-Nibasheka and Kablar, 2008; Chen et al., 2011). Además, Cyr61 y Ctgf se clasificaron inicialmente como IGFbps de baja afinidad, denominadas Igfbp10 e Igfbp8 respectivamente, debido a la presencia en su secuencia de un dominio estructural relacionado con las IGFbps (Chen and Lau, 2009). Por último, Egr1 y c-Jun, son dos factores de transcripción de respuesta inmediata cuya expresión se encuentra inducida por IGF1 (Tominaga et al., 1994; Catania et al., 1999).

El estudio de los niveles de estas proteínas se realizó mediante el análisis por *Western blot* usando extractos de proteína total obtenidos de pulmones del estadio E18,5 *Igf1*<sup>+/+</sup> e *Igf1*<sup>-/-</sup> incubados con anticuerpos específicos. Los resultados se presentan en la Figura 28A-B. La expresión del factor de transcripción Nfib, presenta niveles más elevados de proteína en los pulmones E18,5 *Igf1*<sup>-/-</sup>, al igual que lo obtenido para su ARNm. Del mismo modo los niveles de

## Resultados

proteína de los genes *Klf2*, *Egr1* y *Ctgf* son más bajos en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup>, al igual que ocurría con sus ARNm. Por el contrario las proteínas c-Jun y Cyr61 no mostraron diferencias (Figura 28A-B).



**Figura 28. Niveles de proteína de los genes reguladores seleccionados con expresión diferencial en microarrays de ARNm de pulmones mutantes para *Igf1*.** **A.** Western blots representativos de los factores de transcripción Nfib, Klf2, Egr1 y c-Jun, y de los factores matricelulares Cyr61/CCN1 y Ctgf/CCN2 en los pulmones E18,5 de ratones *Igf1*<sup>+/+</sup> y *Igf1*<sup>-/-</sup>. La  $\beta$ -Tubulina se utilizó como control de carga. **B.** Representación gráfica de las mediciones de densitometría de las señales específicas de las bandas después de la normalización con  $\beta$ -Tubulina. Los valores de las muestras *Igf1*<sup>+/+</sup> se tomaron como 100%. El número de muestras diferentes utilizadas por genotipo se presenta en paréntesis (n). Los niveles elevados de Nfib en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> son estadísticamente significativos (\*\*  $p < 0,01$ ), y la disminución de los niveles de Klf2, Egr1 y Ctgf también es significativa (\*  $p < 0,05$ ) (Mann-Whitney *U*-Test). **C-D.** Inmunotinción para Nfib en secciones transversales de pulmón. Nótese los altos niveles de expresión nuclear de Nfib en células mesenquimales que rodean los vasos sanguíneos (flechas) y los bronquiolos (puntas de flecha). La presencia de estas células es más evidente en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup>. as, espacio aéreo; br, bronquiolo; bv, vaso sanguíneo;  $\beta$ -Tub,  $\beta$ -Tubulina; s, septo. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

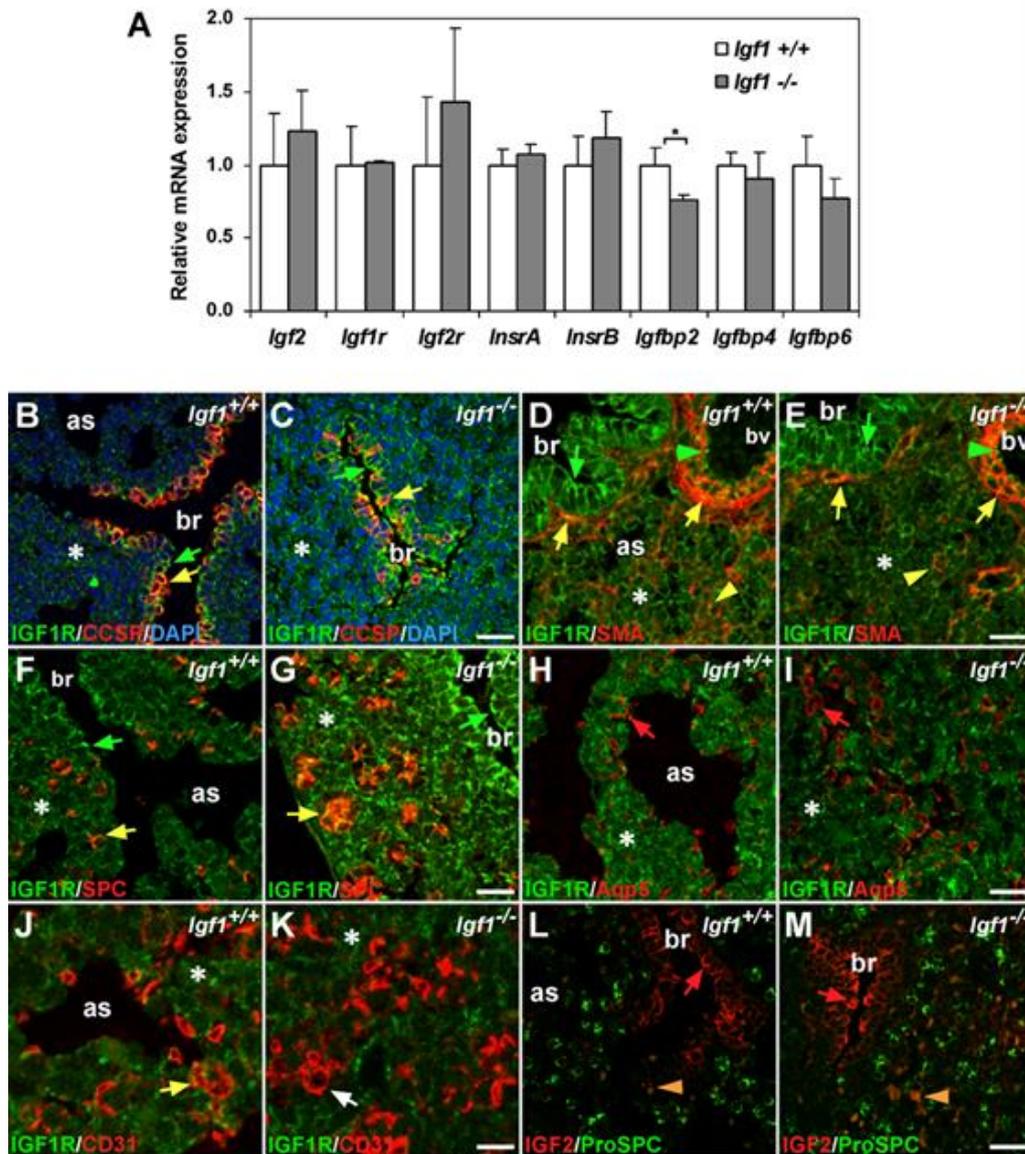
La expresión de Nfib fue adicionalmente evaluada mediante tinción inmunohistoquímica. En los pulmones normales *Igf1*<sup>+/+</sup> Nfib se expresa en los núcleos de múltiples células del parénquima pulmonar, pero sobre todo en las células que bordean la base del epitelio bronquiolar y el endotelio de los vasos sanguíneos (figura 28C). Esta expresión se correspondería con células mesenquimales del musculo liso de estas estructuras histológicas

del pulmón prenatal según se ha descrito previamente (Steele-Perkins et al., 2005). En los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> el patrón es semejante, pero con una expresión más acentuada en las células mesenquimales parabronquiales y subendoteliales (Figura 28D). En su conjunto, estos datos contribuyen a una mejor comprensión de las bases moleculares del retraso en la maduración pulmonar en un contexto de déficit del IGF1, con niveles de proteína más elevados de Nfib y más bajos de Egr1, Klf2 y Ctgf, pero no afectando a los niveles proteicos de c-Jun y Cyr61.

## 2.2. Expresión de los IGFs en los pulmones E18,5 mutantes *Igf1*<sup>-/-</sup>

Para determinar posibles efectos de compensación del sistema IGF/Ins en la expresión de determinados genes en los pulmones prenatales de los ratones mutantes para *Igf1* en primer lugar se compararon los niveles de expresión de ARNm de *Igf2*, *Igf1r*, *Igf2r*, *InsrA*, *InsrB*, *Igfbp2*, *Igfbp4* e *Igfbp6* por qRT-PCR en pulmones E18,5 *Igf1*<sup>+/+</sup> e *Igf1*<sup>-/-</sup>. Con excepción de la *Igf2*, que mostró una reducción significativa en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> (0,8 veces), ninguno de los otros genes mostró diferencias entre genotipos en los niveles de ARNm (Figura 29A).

Para comprender mejor el fenotipo pulmonar observado en los ratones nulos para *Igf1*, adicionalmente se compararon mediante IHQ los patrones de expresión proteica de IGF1R y de IGF2 en los pulmones E18,5 de ambos genotipos. Por una parte elegimos IGF1R por ser el principal mediador de la acción de IGF1 con función y expresión celular autónoma, por lo que su localización y función en una determinada célula depende exclusivamente de su expresión en esa célula, y por otra parte escogimos IGF2 por ser el ligando alternativo de señalización de IGF1 a través de IGF1R. Para identificar la localización celular de estas moléculas se realizó inmuno-co-tinción con marcadores específicos para diferentes tipos de células en el tejido pulmonar (Retsch-Bogart et al., 1996; Morrisey and Hogan, 2010) (Figura 29B-M). Se encontró una expresión ubicua generalizada de IGF1R (Figura 29B-K), con un patrón similar en los pulmones *Igf1*<sup>+/+</sup> e *Igf1*<sup>-/-</sup>. Se aprecia que IGF1R se expresa prominentemente en todas las células del epitelio bronquiolar de ambos genotipos (Figura 29B-G). Entre las células epiteliales del bronquiolo terminal los mayores niveles de IGF1R se observan en las células de Clara, que expresan específicamente el marcador de la proteína de células de Clara (CCSP) (Figura 29B-C). También se observa una tinción de IGF1R en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, y en las zonas del músculo liso perivascular y peribronquiolar colocalizando con la actina del músculo liso (SMA) (Figura 29D-E). En los bronquiolos terminales la tinción del IGF1R se encuentra dispersa en todo el parénquima, colocalizando con células que también expresan SMA (Figura 29D-E). En la zona alveolar la tinción para IGF1R coincide con la tinción para el precursor de la proteína surfactante C (Pro-SPC), un marcador que identifica las células AEC2 (Figura 29F-G), pero sin embargo no colocaliza con las células teñidas positivamente para Aquaporina 5 (Aqp5), un marcador específico de células AEC1 en el pulmón (Figura 29H-I).

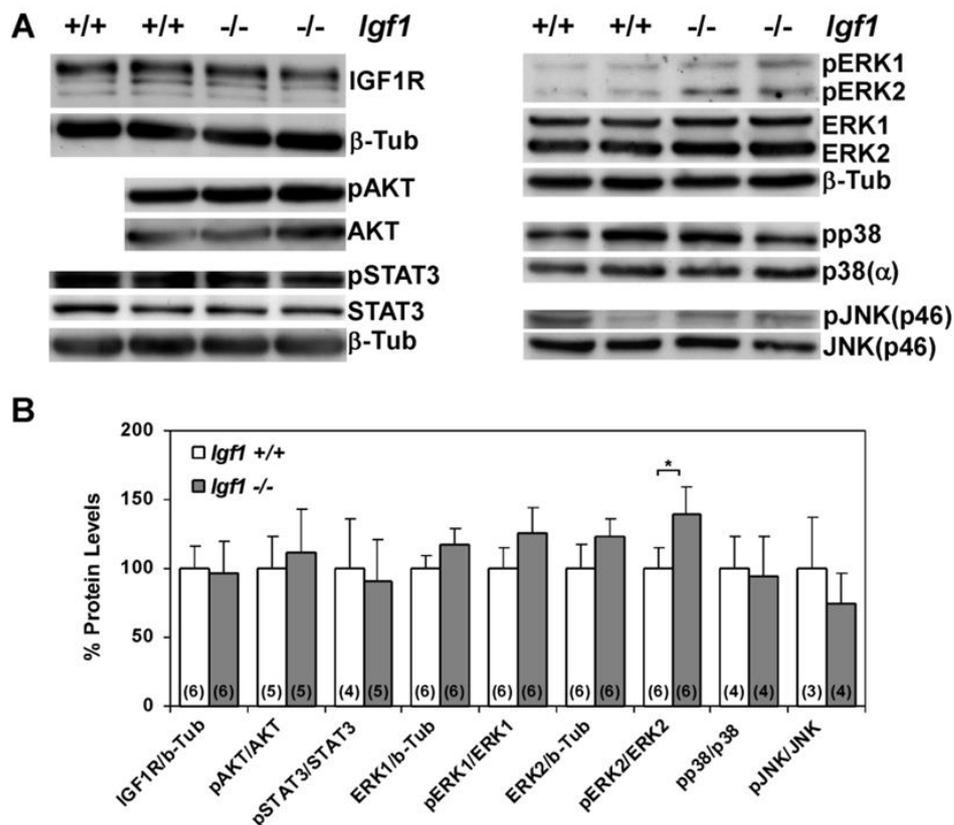


**Figura 29. Expresión de genes del sistema de IGFs en el pulmón E18,5 de ratones mutantes para *Igf1*.** **A.** Niveles de expresión de ARNm de *Igf2*, *Igf1r*, *Igf2r*, *InsrA*, *InsrB*, *Igfbp2*, *Igfbp4* e *Igfbp6* analizados por qRT-PCR en pulmones *Igf1*<sup>+/+</sup> e *Igf1*<sup>-/-</sup> (n = 4 por genotipo). El gene *Gapdh* se ha usado como gen control endógeno. Sólo los niveles de ARNm de *Igfbp2* son significativamente menores en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> (\*  $p < 0,05$ ) (Mann-Whitney *U*-Test). **(B-K)** Inmunodetección de IGF1R (marcaje en verde), y de otros marcadores celulares específicos del pulmón (contrateñidos en rojo). La inmunotinción para IGF1R es alta en el epitelio bronquiolar (flechas verdes), pero también se encuentra con menor intensidad dispersa por todo el parénquima alveolar (asteriscos). No se observan grandes diferencias entre los genotipos. **(B-C)** Tinción para IGF1R (flechas verdes) en el epitelio bronquiolar y en las células de Clara, CCSP (flechas amarillas). **(D-E)** Tinción del IGF1R en las células vasculares endoteliales (puntas de flechas verdes), SMA (actina de músculo liso) en el músculo liso peribronquial y perivascular (flechas amarillas), y en el parénquima pulmonar (puntas de flechas amarillas). **(F-G)** Co-tinción de Pro-SPC (SPC) con IGF1R en muchas células alveolares de tipo 2 (flecha de color amarillo), distribuidas de forma aleatoria en los controles (F) y con una organización más acinar en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> (G). **(H-I)** Las células AEC1, teñidas para AQP5, también se tiñen para IGF1R (flechas rojas). **(J-K)** Co-tinción de PECAM/CD31 con IGF1R en algunas células endoteliales alveolares en los pulmones *Igf1*<sup>+/+</sup> (flecha amarilla en J), pero no en los *Igf1*<sup>-/-</sup> (flecha blanca en K). **(L-M)** Inmunodetección positiva de IGF2 (en rojo) con Pro-SPC (en verde) en las células epiteliales bronquiolares de ambos genotipos. Nótese que la utilización de EDTA para la recuperación antigénica de IGF2 causa una señal refringente inespecífica en las células rojas de la sangre (puntas de flechas naranja). br, bronquiolo; as, espacio aéreo. Barras de escala: 25 μm en B-C y F-G, 17 μm en D-E y LM, 12 μm en H-I y 8 μm en J-K.

También se observa frecuentemente una co-tinción de IGF1R con el marcador capilar endotelial CD31/PECAM en los pulmones *Igf1<sup>+/+</sup>* (Figura 29J), aunque este patrón no ocurre en los pulmones *Igf1<sup>-/-</sup>* (Figura 29K). Finalmente, la inmunotinción para IGF2 fue intensa en el epitelio bronquiolar del pulmón pero ausente en el parénquima pulmonar distal, y tampoco se aprecian diferencias en el patrón de tinción de IGF2 entre los dos genotipos (Figura 29L-M).

### **2.3. Expresión y niveles de activación de mediadores de la señalización de IGFs en el pulmón de los ratones mutantes *Igf1<sup>-/-</sup>***

Como las rutas de transducción de señales de Ras/MAPK y PI3K/Akt están generalmente implicadas en proliferación y diferenciación celular mediadas por factores de crecimiento durante el desarrollo de diversos órganos, incluido el pulmón (Ferrell, 1996; Lee et al., 2001; Thrane et al., 2001; Wang et al., 2005; Ventura et al., 2007; Wu et al., 2009), se analizaron los niveles de activación por fosforilación de las MAP/Kinasas ERK-1/2, Akt, p38, y JNK (p46) en los pulmones E18,5 de ambos genotipos (Figura 30). Al analizar la proteína total y los niveles de fosforilación de ERK1/2, p38 y JNK, se observó un aumento tanto en la expresión total como en los niveles de fosforilación de las dos formas de ERK, pero tan sólo el nivel de activación de pERK2 fue estadísticamente significativo. Tampoco se ha apreciado diferencias en la activación de Akt, JNK o de p38 entre genotipos (Figura 30A-B). Dado que STAT3 es un factor de transcripción cuya activación por fosforilación también es dependiente de la señalización de IGF1/IGF1R en el pulmón, también se analizaron los niveles de su forma fosforilada, pero tampoco se observaron diferencias (Zong, 2000 # 68; Wang, 2005 # 145) (Figura 30A-B). Como resumen del estudio de los niveles de expresión y activación de proteínas mediadoras de la señalización de IGFs en el pulmón prenatal *Igf1<sup>-/-</sup>* sólo se aprecia un aumento en la activación de ERK2, indicando que al menos en parte, la acción de IGF1 en la maduración prenatal del pulmón se genera a través de esta vía de señalización.



**Figura 30. Niveles de expresión de proteínas mediadoras de la señalización de IGF1 en los pulmones prenatales de ratones deficientes de *Igf1*.** **A.** *Western blots* representativos de extractos de proteína total sometidos a análisis de *Western blot* para IGF1R, pAkt, Akt total, pSTAT3, STAT3 total, pERK1/2, ERK1/2 total, pp38, p38(α) total, pJNK y JNK (p46) total, usando dos muestras representativas diferentes de pulmones por genotipo en el estadio E18,5. Los niveles de activación se determinaron utilizando anticuerpos fosfo-específicos. La β-Tubulina se ha utilizado como control de carga de proteína en los geles (paneles inferiores). **B.** Representación de las mediciones densitométricas de las bandas de *Western blot* después de la normalización total de las proteínas de carga, ya sea usando β-Tubulina o el contenido total de cada proteína, en el caso de la evaluación de los niveles de fosforilación. Las medidas de los valores en las muestras *Igf1*<sup>+/+</sup> se tomaron como 100%. En paréntesis se muestra el número de animales usado por genotipo. (\*  $p < 0,05$ ) (Mann-Whitney *U*-Test). β-Tub, β-tubulina.

#### 2.4. Efecto de IGF1 sobre la morfogénesis, la maduración del septo alveolar y sobre los niveles de expresión de genes reguladores en pulmones prenatales cultivados *ex vivo*

Las alteraciones morfológicas, histológicas y moleculares de los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> descritos previamente y de forma puntual en el estadio del desarrollo E18,5, son consecuencia de los cambios acumulados por ausencia del factor de crecimiento durante toda la embriogénesis hasta este momento. Sin embargo estos cambios posiblemente sean contrarrestados por mecanismos de compensación que podrían enmascarar parcialmente el papel real del IGF1 en la organogénesis de un pulmón normal. Para validar y demostrar la acción directa de IGF1 en la maduración terminal del pulmón prenatal se diseccionaron los pulmones de embriones en el estadio E16,5 tanto normales como *Igf1*<sup>-/-</sup>, se separaron los lóbulos y éstos se cultivaron *ex vivo* durante 96 horas en medio definido, tanto en ausencia

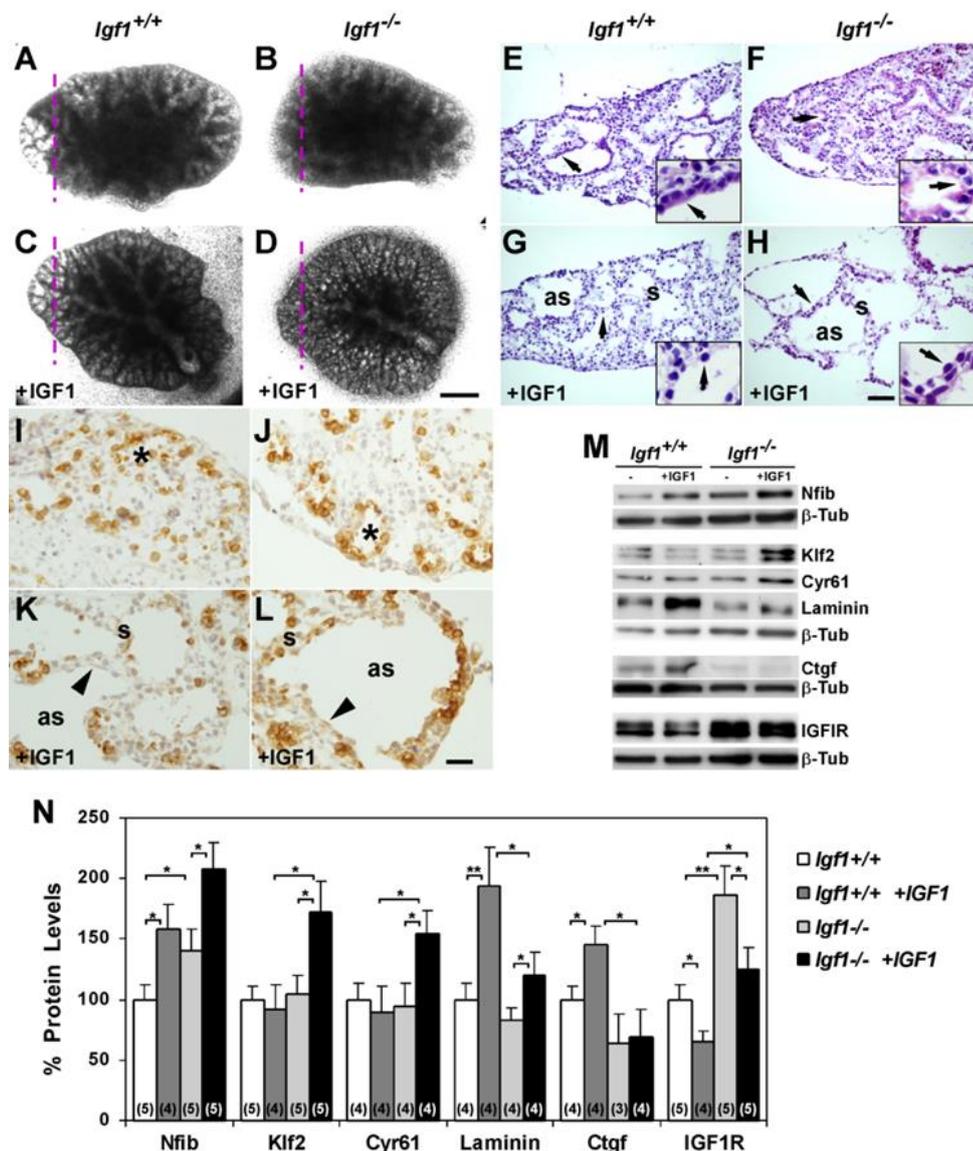
como en presencia exógena de IGF1. Estos cultivos se monitorizaron tomando fotografías de su progresión en cultivo, y se observó que los explantes de ambos genotipos crecen en cultivo hasta las 96 h de forma proporcional a su tamaño original (Figura 31A-B). En los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup>, cuyos lóbulos pulmonares son ligeramente menores que los *Igf1*<sup>+/+</sup> en el momento de la disección, la adición de IGF1 causa un efecto en la morfogénesis muy claro (Figura 31C-D). En el caso de los lóbulos pulmonares *Igf1*<sup>+/+</sup> la adición de IGF1 produce cambios morfogenéticos en la periferia del lóbulo (Figura 31C). Este efecto es mucho más evidente en los explantes de pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> (Figura 31D).

El análisis histológico de los explantes de pulmones normales *Igf1*<sup>+/+</sup> revela la presencia de una alta proporción de células epiteliales de tipo cúbico en el epitelio distal de los espacios “saculados” presuntos sacos alveolares (Figura 31E y recuadro). Los explantes derivados de embriones *Igf1*<sup>-/-</sup> presentan unos presuntos espacios aéreos más reducidos y apenas exhiben septos celulares definidos (Figura 31F y recuadro). Los pulmones cultivado *ex vivo* en presencia de IGF1 sufren un proceso de vacuolización muy acusado que probablemente sea responsable del aumento de su tamaño. La adición de IGF1 a los pulmones control *Igf1*<sup>+/+</sup> en cultivo hace que los septos entre espacios se estrechen y sean más definidos y el epitelio respiratorio se aplane (Figura 31G y recuadro). Sorprendentemente, los efectos de IGF1 son más claros en los explantes de los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup>, provocando que los septos celulares entre espacios sean mucho más estrechos (2 a 6 células de grosor), que presenten un mesénquima escaso y ausencia de células epiteliales cúbicas (Figura 31H y recuadro).

La alta proporción de células inmaduras del presunto epitelio sacular en los lóbulos no tratados se demuestra por su tinción positiva para Pro-SPC (figura 31I-J). La adición de IGF1 reduce la proporción de células SPC positivas y el aumento de la proporción de células no teñidas con una morfología plana más madura (Figura 31K-L). Así, la adición de IGF1 a los explantes pulmonares conlleva una maduración de los septos que se asemejan más a la situación *in vivo* de los pulmones normales E18,5 (Pichel et al., 2003; Moverare-Skrtic et al., 2009; Pais, 2013).

A continuación se procedió a comprobar si la acción *in vitro* de IGF1 en los explantes pulmonares induce cambios en los niveles de expresión de genes con funciones reguladoras propuestos como genes diana de IGF1 durante la organogénesis de pulmón (apartado 2.1.). Así, se procedió al análisis por *Western blot* de los niveles de proteína de Nfib, Klf2, Ctgf y Cyr61, en los cultivos de explantes pulmonares, y en el estudio también se incluyó la laminina como un marcador de maduración pulmonar embrionaria (Relan and Schuger, 1999; Pierce et al., 2000; Nguyen and Senior, 2006). Los resultados de este análisis se muestran en la figura 31M-N. Se observó que los niveles de expresión de Nfib en los explantes *Igf1*<sup>-/-</sup>, cultivados sin IGF1, fueron significativamente más altos que en los explantes *Igf1*<sup>+/+</sup>, mientras que no se observaron diferencias significativas en los niveles de Klf2, Cyr61, Laminina y Ctgf (Figura 31M-N). Curiosamente, estos resultados reflejan los resultados encontrados en los pulmones

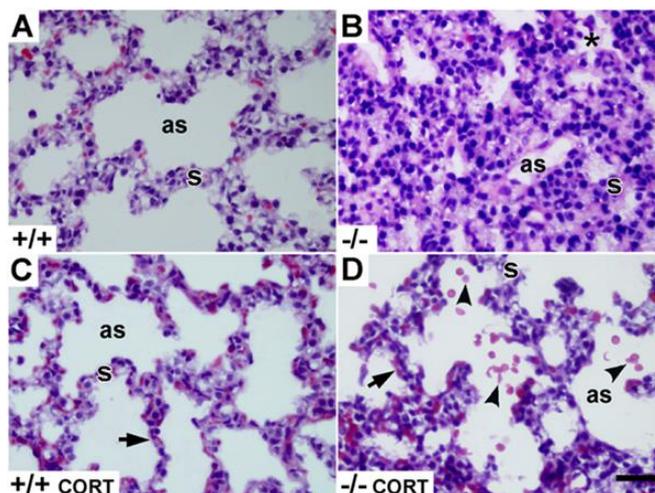
E18,5 nativos, con la excepción de Klf2 que sí mostraba disminuida su expresión en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> (Figura 28A). La adición de IGF1 exógeno a los explantes *Igf1*<sup>+/+</sup> provoca un aumento significativo en la expresión de Nfib, Laminina y Ctgf, pero no cambia los niveles de Klf2 y Cyr61, y en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> todas las proteínas, salvo Ctgf aumentan significativamente sus niveles en respuesta a IGF1 (Figura 31M-N). Cuando en paralelo se determinaron los niveles de proteína de IGF1R, se observó que aumentaron significativamente en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> con respecto a los *Igf1*<sup>+/+</sup>, tanto en ausencia como en presencia exógena de IGF1 (figura 31M-N). Como era de esperar, la adición de IGF1 causa una leve reducción en la expresión de su receptor en explantes de ambos genotipos, probablemente debido a una inhibición de la expresión de IGF1R por retroalimentación generando una represión de la expresión de IGF1R. Este efecto ya había sido demostrado previamente en otros sistemas biológicos (Stewart and Rotwein, 1996 144). En conjunto, estos resultados demuestran que IGF1 funciona como un factor importante durante el desarrollo terminal del pulmón, colaborando en la maduración morfológica y molecular de las vías aéreas, y regulando la expresión de los factores de transcripción, Nfib y Klf2, y de las proteínas matricelulares, Cyr61 y Ctgf.



**Figura 31. Efecto de IGF1 sobre la morfogénesis alveolar y sobre la expresión de genes diana en pulmones prenatales cultivados *ex vivo*.** Los lóbulos pulmonares de embriones E16,5 con genotipo *Igf1*<sup>+/+</sup> e *Igf1*<sup>-/-</sup> se cultivaron en medio definido durante 96 h, en ausencia o en presencia de IGF1 recombinante (100 ng/mL). **A-D.** Imágenes del mismo tipo de lóbulo pulmonar cultivado *ex vivo* durante 96 h donde la transparencia del tejido refleja el efecto de la adición de IGF1 exógeno al medio de cultivo sobre la morfogénesis del explante, dependiendo del genotipo (n = 10 para cada condición). La línea púrpura discontinua indica los planos de corte histológicos mostrados en **E-L**. **E-H.** Tinción de H&E en secciones de los pulmones cultivados (n = 4 por condición). Los explantes no tratados con IGF1 muestran un tejido pulmonar compacto con septos indefinidos y espacios reducidos, revestidos por un epitelio mayoritariamente cúbico (flechas en E-F). El tratamiento con IGF1 induce la apertura de espacios en los tejidos, la reducción de los septos y el aplanamiento del epitelio (flechas en G-H). En los recuadros de E-H se muestra como el epitelio alveolar es más plano en los cultivos tratados con IGF1. **I-L.** Tinción inmunohistoquímica para Pro-SPC en los explantes. La alta proporción de células positivas cúbicas que recubren los reducidos espacios aéreos en los explantes no tratados con IGF1 (asteriscos en I-J), disminuye en proporción en el epitelio de los pulmones tratados con IGF1 (puntas de flecha en K-L) (n = 2 por condición). **M-N.** *Western blot* y cuantificación densitométrica de los niveles de la expresión proteica de genes diana de IGF1. La  $\beta$ -Tubulina ( $\beta$ -Tub) se ha usado como control de carga de proteína total en cada *blot*. Los valores de los explantes *Igf1*<sup>+/+</sup> no tratados con IGF1 se tomaron como 100%. En paréntesis, número de *Western blots* cuantificados por condición. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) (Mann-Whitney *U-Test*). as, espacio aéreo; s, septo. Barra de escala: 50  $\mu$ m en A-D; 50  $\mu$ m en E-H y 7  $\mu$ m en sus recuadros; 20  $\mu$ m en I-L.

### 2.5. El tratamiento con corticosterona induce maduración del septo alveolar pero no rescata la viabilidad postnatal de los ratones *Igf1*<sup>-/-</sup>

Para determinar si era posible rescatar el fenotipo inmaduro de los pulmones prenatales *Igf1*<sup>-/-</sup>, las madres heterocigotas preñadas se trataron con glucocorticoides exógenos, compuestos bien conocidos como reguladores de la maduración del pulmón (Chinoy, 2003; Silva et al., 2006). Se observó que la administración de corticosterona a las madres gestantes desde E9,5 hasta E18,5 no rescata la mortalidad neonatal de los ratones *Igf1*<sup>-/-</sup>. Cuando se recogieron por cesárea embriones a E18,5 de siete madres tratadas con corticosterona, ninguno de los embriones *Igf1*<sup>-/-</sup> (n = 9) fueron capaces de respirar con regularidad, y aunque algunos de ellos daban bocanadas intentando respirar, finalmente se quedaban inmóviles y se volvieron cianóticos después de los 20 minutos. Por el contrario, sus hermanos de camadas *Igf1*<sup>+/+</sup> (n = 15) e *Igf1*<sup>+/-</sup> (n = 29) respiraron espontáneamente y con regularidad, tenían un color de piel rosa después de 10 minutos y movían activamente sus extremidades después de los 20 minutos. Sin embargo a pesar del fallo en el rescate de la mortalidad, el tratamiento con corticosterona dio lugar a una arquitectura histológica más madura en los embriones E18,5 *Igf1*<sup>-/-</sup> (Figura 32D) comparando con los derivados de las madres no tratadas (Figura 32B). De hecho, también se encontró que los pulmones *Igf1*<sup>+/+</sup> obtenidos de madres tratadas con corticosterona presentaban pulmones con características de mayor madurez que los no tratados, con presencia de septos alveolares más delgados (Figura 32A y C). Estos resultados respaldan la importancia de la corticosterona materna como inductor de la maduración pulmonar prenatal aunque en estos mutantes no fue capaz de recuperar la supervivencia de los neonatos *Igf1*<sup>-/-</sup>.



**Figura 32. Maduración pulmonar en embriones E18,5 mutantes para *Igf1* obtenidos de madres tratadas con corticosterona. A-B.** Histología pulmonar mediante tinción con H&E de embriones *Igf1*<sup>+/+</sup> (A) y *Igf1*<sup>-/-</sup> (B) obtenidos de madres no tratadas con corticosterona. Obsérvese la reducida superficie de los espacios aéreos, septos gruesos, abundante parénquima pulmonar y la presencia de membranas hialinas en los sacos alveolares (asterisco) de embriones *Igf1*<sup>-/-</sup> (B) en comparación con los controles (A). **C-D.** Histología de los pulmones embrionarios *Igf1*<sup>+/+</sup> (C) y *Igf1*<sup>-/-</sup> (D), recogidos de madres que habían recibido 30 mg/ml de corticosterona en el agua a partir del día E9,5 de la gestación. El tratamiento con corticosterona mejoró la maduración pulmonar en ambos genotipos. La mejora es evidente en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> (D) aunque también se nota el tratamiento en las *Igf1*<sup>+/+</sup> (C) como lo demuestran sus septos saculares más delgados (flechas) y el aumento del tamaño de los saculos alveolares. Nótese la presencia de hematóis en los espacios aéreos de los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> (puntas de flechas en D). n = 4 pulmones/genotipo/tratamiento. as, espacio aéreo; s, septo. Barra de escala: 25  $\mu$ m.

### 3. Efecto de los IGFs sobre la expresión de genes reguladores (diana de IGF1) en diferentes tipos celulares del pulmón: estudio *in vitro* sobre células mesequimales de pulmones prenatales de ratón y en líneas celulares derivadas de tumores epiteliales humanos

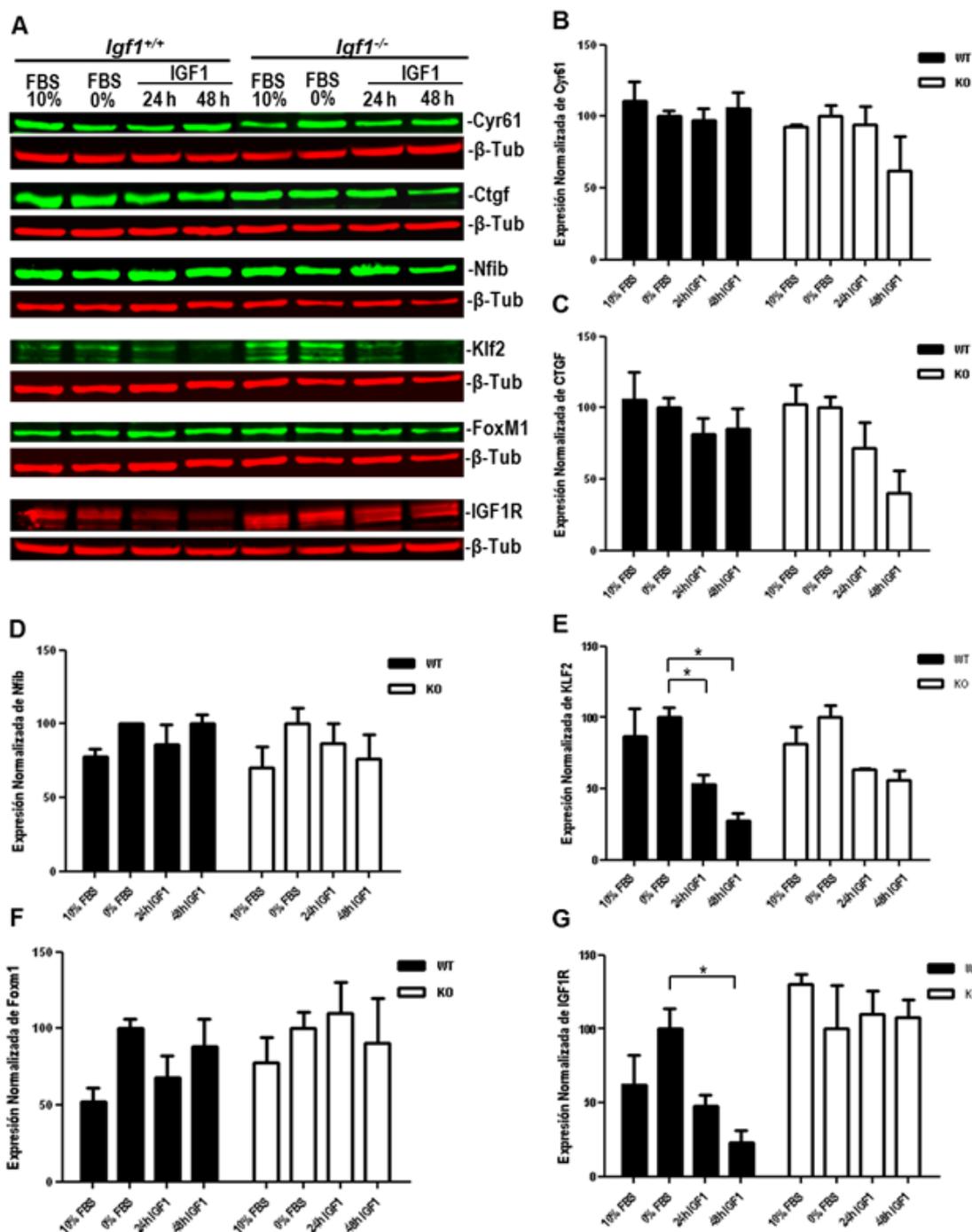
Con el objetivo de discriminar efectos diferenciales de los IGFs, en particular de IGF1 sobre diferentes tipos celulares del pulmón se decidió estudiar su efecto sobre la expresión de los genes diana identificados en el apartado 2 en cultivos celulares de células mesequimales derivadas de pulmón de ratón embrionario, normales o deficientes de *Igf1*<sup>-/-</sup>, y en líneas celulares de origen epitelial derivadas de tumores humanos.

Los genes diana a estudiar fueron las proteínas matricelulares Cyr61/CCN1/Igfbp10 y Ctgf/CCN2/Igfbp8, y los factores de transcripción Nfib y Klf2. Tal y como se ha demostrado en el apartado 2 todas ellos han sido descritos como genes diana de acción de IGF1 en el desarrollo pulmonar. Además, en el estudio se incluyó un nuevo gen, el factor de transcripción FoxM1, implicado en la maduración pulmonar prenatal (Xu et al., 2012) que regula la diferenciación en diferentes tipos celulares del pulmón incluyendo células mesequimales y epiteliales (Kim et al., 2005; Ustiyán et al., 2009; Ustiyán et al., 2012). También se ha descrito a FoxM1 como un gen diana de IGF1 en el desarrollo prenatal del oído interno (Sanchez-Calderon et al., 2010).

### 3.1. Efecto de IGF1 sobre la expresión de genes reguladores diana de IGF1 en LMEFs derivados de embriones *Igf1<sup>+/+</sup>* e *Igf1<sup>-/-</sup>*

Para el estudio del efecto de IGFs en células mesenquimales en primer lugar se decidió usar fibroblastos embrionarios derivados de pulmones de ratón (LMEFs) obtenidos de ratones de la colonia de los mutantes *Igf1*. Para ello se establecieron en cultivo líneas de fibroblastos pulmonares inmortalizados según el protocolo 3T3, a partir de pulmones embrionarios de ratones con los genotipos *Igf1<sup>+/+</sup>* e *Igf1<sup>-/-</sup>*. Se inmortalizaron cuatro líneas de fibroblastos *Igf1<sup>+/+</sup>* y seis líneas *Igf1<sup>-/-</sup>*. De las diferentes líneas, que poseían fenotipos morfológicos y de tasa de crecimiento muy diferentes, incluso entre líneas del mismo genotipo, se eligieron dos, una con genotipo *Igf1<sup>+/+</sup>* y otra con genotipo *Igf1<sup>-/-</sup>* para usar en los estudios aquí presentados. La elección se realizó en base a su morfología más fibroblástica, y que además tuviesen una tasa de crecimiento regular.

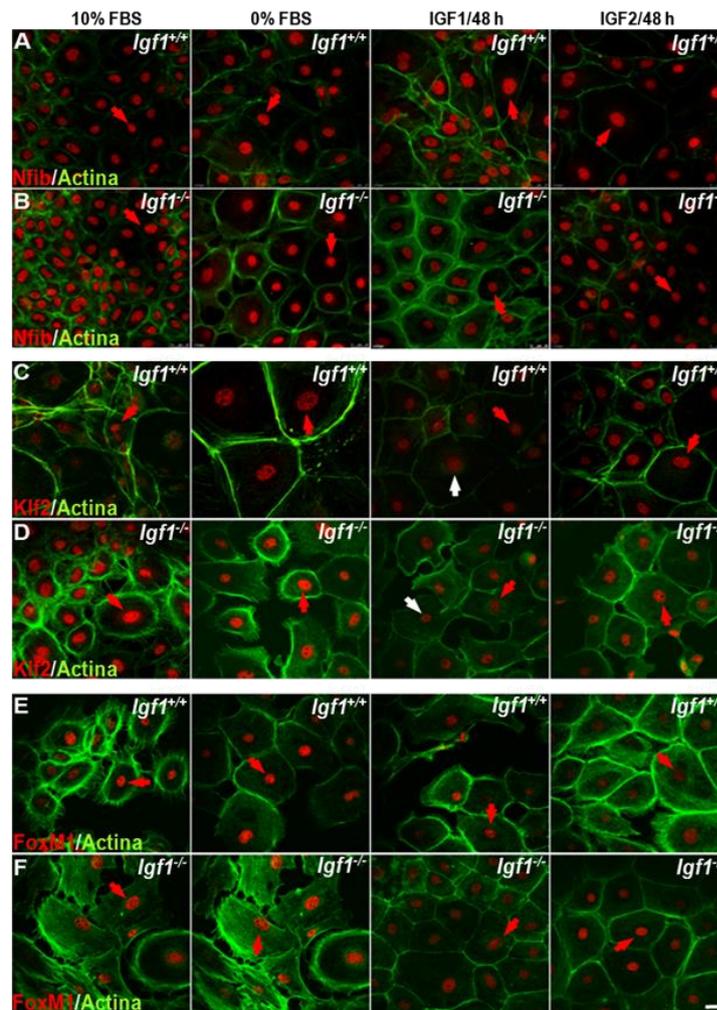
Las células de estas líneas se crecieron siempre hasta semi-confluencia antes de su uso para la extracción de proteínas en las diferentes condiciones de cultivo. Se crecieron en diferentes condiciones: medio completo, sometidas a ayuno sin suero durante 16 h, y en algunos casos con IGF1 o IGF2 durante 24 o 48 h añadido al medio sin suero después del ayuno. Se obtuvieron los extractos proteicos de las diferentes condiciones del cultivo (medio completo, ayuno, y 24 o 48 h con IGF1 después del ayuno), y se analizaron por Western blot para determinar los niveles de expresión de Cyr61 y Ctgf, y de los factores de transcripción Nfib, Klf2 y FoxM1, y adicionalmente de IGF1R. Las imágenes de *Western blot* representativas de los niveles de expresión de los diferentes genes se muestran en la Figura 33A. Su cuantificación densitométrica corregida con los niveles de  $\beta$ -Tubulina en cada condición y relativizada a la expresión de cada gen tras el ayuno (0% FBS) (tomada como 100%) se representa en las gráficas de la Figura 33B-G. Éstas muestran que no se encontraron cambios significativos en los niveles de expresión de ninguno de los genes en las diferentes condiciones de cultivo en los LMEFs *Igf1<sup>-/-</sup>*. En la línea celular *Igf1<sup>+/+</sup>* se apreciaron descensos en la expresión de Klf2 tras la adición de IGF1 en los dos tiempos estudiados (24 y 48 h) (Figura 33E). También se observó un descenso significativo en los niveles de IGF1R 48 h después de haber añadido el factor (Figura 33G). Cuando se compararon los niveles de expresión en las mismas condiciones de cultivo entre LMEFs de diferentes genotipos tampoco se observaron en ninguno de los genes, diferencias en los niveles de expresión proteica.



**Figura 33. Expresión de genes reguladores en líneas celulares de fibroblastos pulmonares embrionarios inmortalizados (LMEFs) derivados de pulmones embrionarios mutantes para *Igf1*.** **A.** Determinación por *Western blot* de los niveles de expresión de los factores matricelulares Cyr61 y Ctgf, de los factores de transcripción Nfib, Klf2 y FoxM1, y de IGFBP1 en LMEFs obtenidos de pulmones de embriones *Igf1*<sup>+/+</sup> e *Igf1*<sup>-/-</sup>, cultivados en medio completo (10% FBS), tras 16 h en medio de ayuno (0% FBS), y a las 24 y 48 h con IGF1 (60 ng/mL) tras el ayuno (*Western blots* superiores en verde y rojo). La imagen para los niveles de β-Tubulina (*blots* en rojo) se muestra debajo del *blot* de cada gen. **B-G.** Densitometría de los inmunoblots para los genes especificados después de su normalización con los valores de β-Tubulina, y tomando como 100% en cada gen el valor de 0% FBS. Los datos corresponden a la media ± error típico de tres experimentos independientes. (\*  $p < 0,05$  según el test de Mann Whitney *U*-Test y Kruskal Wallis) WT, LMEFs *Igf1*<sup>+/+</sup>; KO, LMEFs *Igf1*<sup>-/-</sup>.

## Resultados

Para determinar posibles cambios en la morfología celular o en la localización subcelular de las proteínas, los LMEFs cultivados en diferentes condiciones de cultivo (en medio completo, en ayuno, o con IGF1 o IGF2 añadidos tras el ayuno durante 48 h), se sometieron a un análisis inmunocitoquímico con anticuerpos específicos para los factores de transcripción (Nfib, Klf2 y FoxM1), seguido de un contrateñido simultáneo con faloidina que tiñe los microtúbulos de actina y perfila la morfología celular. Los resultados se muestran en la Figura 34. En ningún caso se aprecia cambios considerables en la localización subcelular de los factores de transcripción ni tampoco en la morfología celular, aunque sí podemos observar un pequeño descenso en la tinción para Klf2 en presencia de IGF1 (Figura 34C-D).

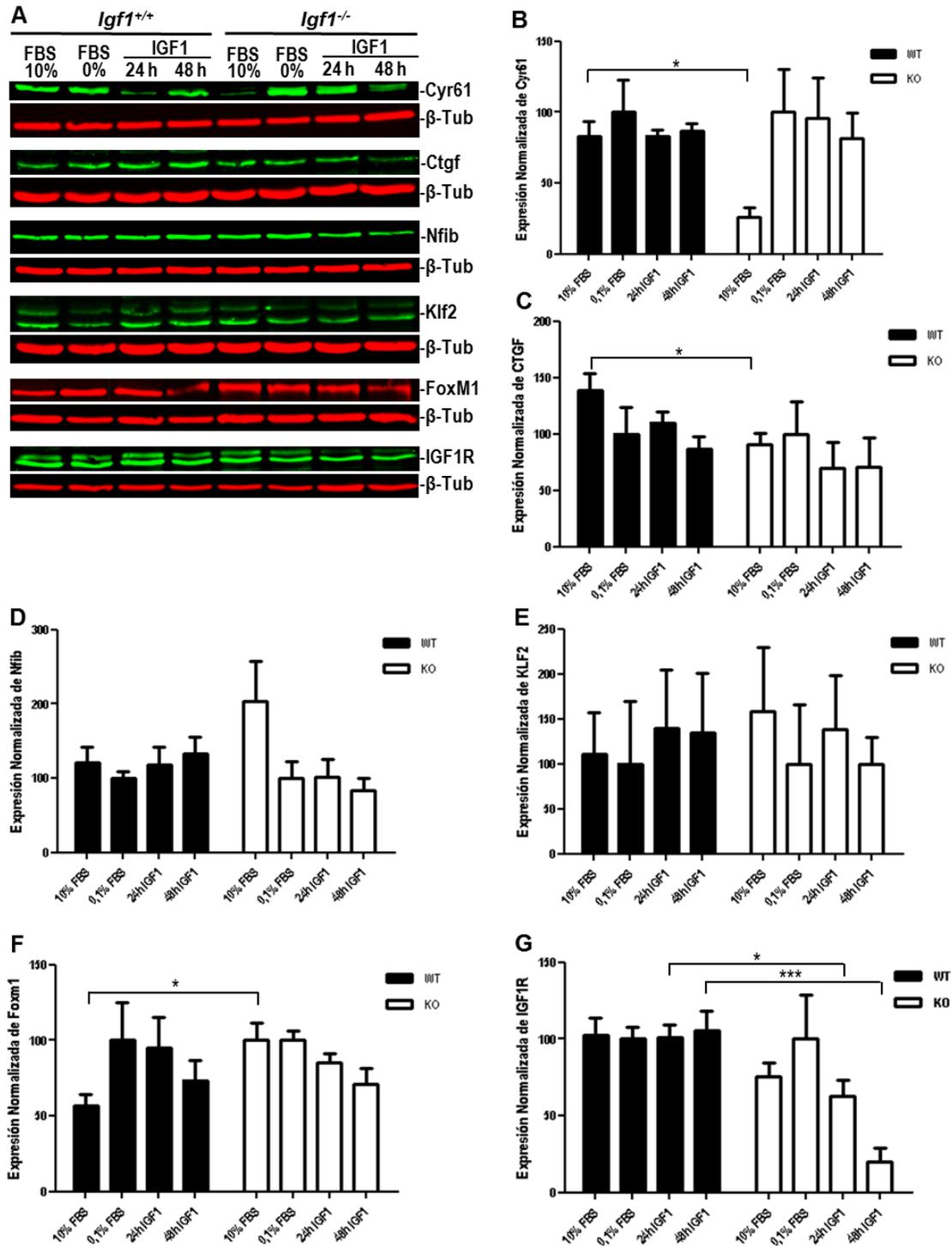


**Figura 34. Efecto de los IGFs sobre la morfología y expresión de los factores de transcripción Nfib, Klf2 y FoxM1 en LMEFs de ratones mutantes para *Igf1*.** Microfotografías confocales representativas de tinciones inmunocitoquímicas de LMEFs *Igf1*<sup>+/+</sup> e *Igf1*<sup>-/-</sup> en diferentes condiciones de cultivo: medio completo (10% FBS), en ayuno sin suero durante 16 h, y a las 48 h de añadir IGF1 (60 ng/mL) o IGF2 (30 ng/mL) después del ayuno (n = 3 por condición). **A-B.** Los paneles muestran la inmunotinción nuclear para Nfib (rojo) contrateñidos con faloidina (verde) que identifica los microfilamentos de actina, en LMEFs *Igf1*<sup>+/+</sup> (A) e *Igf1*<sup>-/-</sup> (B) (flechas rojas). De la misma forma, en **C-D** se representa la inmunotinción para Klf2, y en **E-F** para FoxM1. En ningún caso se observan alteraciones llamativas de la morfología celular, ni cambios de localización intracelular de las proteínas, que es nuclear en todas las condiciones. Aunque sí se aprecia una pequeña bajada en la intensidad de tinción para Klf2 en los LMEFs de ambos genotipos tratados con *Igf1* comparando con 0% FBS (flechas blancas). Barra de escala: 20 µm.

De estos resultados se infiere que IGF1 no parece modificar los niveles de expresión de los genes analizados en estas células. Cabe mencionar, dada la gran variabilidad fenotípica observada entre las diferentes líneas celulares estudiadas que este modelo experimental no parece ser el más adecuado para el estudio planteado.

### **3.2. Efecto del IGF1 sobre la expresión de genes reguladores en células mesenquimales primarias derivadas de pulmones embrionarios**

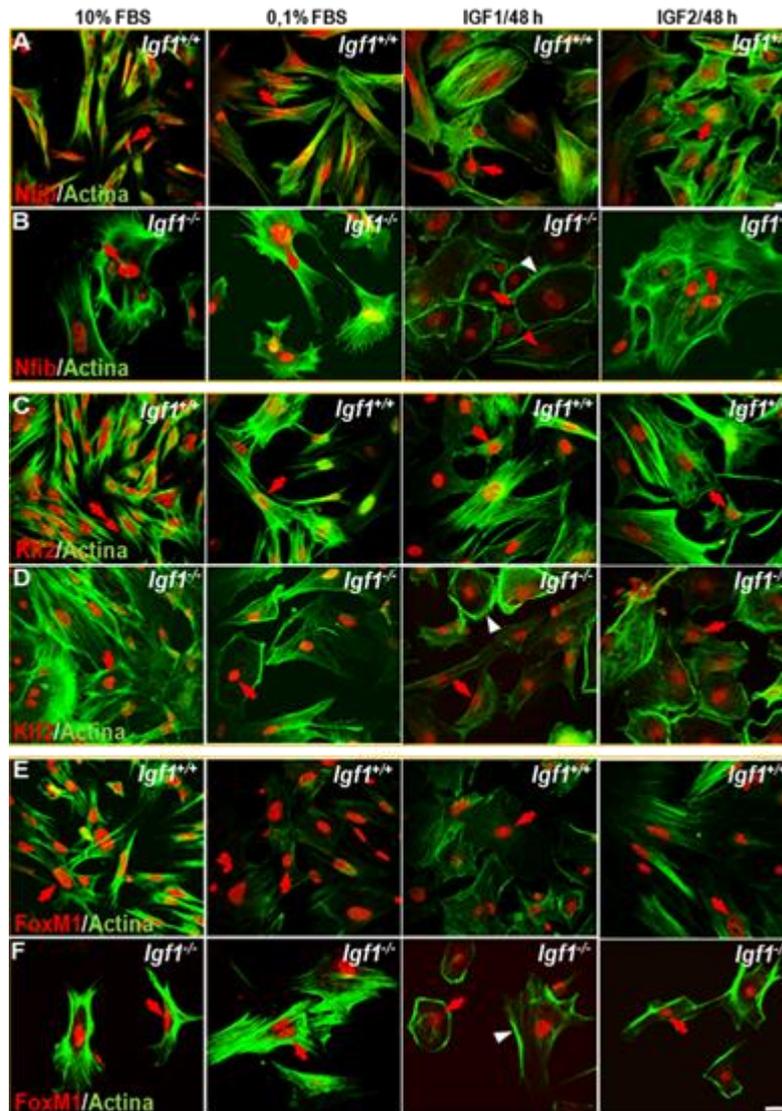
Para descartar la gran variabilidad experimental en morfología, crecimiento y expresión génica de los niveles celulares obtenidos con los LMEFs, decidimos usar cultivos primarios de células mesenquimales primarias con el mismo abordaje experimental que en el apartado anterior. En principio estas células reflejarían mejor la situación nativa in vivo de las células mesenquimales pulmonares embrionarias que los LMEFs. Para estos experimentos se usaron cultivos primarios de células mesenquimales derivadas de embriones E18,5 *Igf1<sup>+/+</sup>* o *Igf1<sup>-/-</sup>*. Para preservar lo mejor posible su identidad original y evitar la acumulación de mutaciones, no se usaron células con más de tres pases de tripsinización. Del mismo modo que para los LMEFs, las células mesenquimales primarias en este tercer paso se dejaron crecer hasta subconfluencia y se lisaron en las cuatro condiciones de estudio: en medio completo (10% FBS), después de 16 h en medio de ayuno (0,1% FBS), y tras 24 o 48 h con factores de crecimiento (IGF1 o IGF2). Para determinar los cambios en los niveles de expresión de Cyr61 y Ctgf, de los factores de transcripción Nfib, Klf2 y FoxM1, y también de IGF1R los extractos proteicos de estas células se analizaron por *Western blot* y los resultados se muestran en la Figura 35A. La cuantificación densitométrica de los resultados de tres experimentos para cada gen se muestra en las Figuras 35B-G. En ninguno de los genes se obtuvieron diferencias apreciables en los niveles de expresión en las diferentes condiciones de cultivo en cada genotipo de células mesenquimales primarias, *Igf1<sup>+/+</sup>* o *Igf1<sup>-/-</sup>*. Sin embargo, sí se encontraron diferencias al comparar los niveles de las proteínas en las mismas condiciones de cultivo entre los dos genotipos. Así, en medio completo (10% FBS) la expresión de Cyr61 y Ctgf es menor en las células *Igf1<sup>-/-</sup>* que las *Igf1<sup>+/+</sup>* (Figura 35B y 35C respectivamente), mientras que la de FoxM1 es más alta (Figura 35F). La expresión de IGF1R también es menor en las células *Igf1<sup>-/-</sup>* tras la adición de IGF1 tanto a las 24 h como a las 48 h.



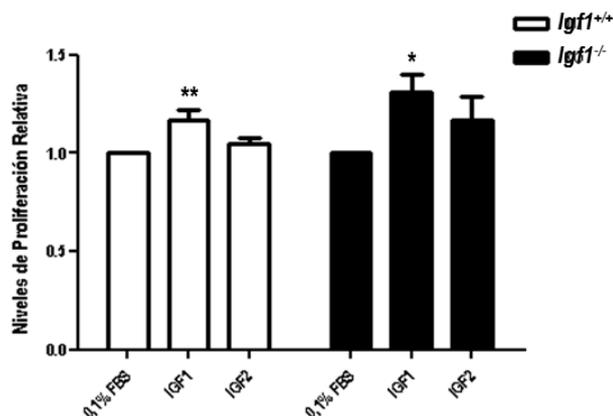
**Figura 35. Expresión de genes diana de IGF1 en células mesenquimales primarias pulmonares de embriones mutantes para *Igf1*.** **A.** Determinación por *Western blot* de los niveles de expresión de los factores matricelulares Cyr61 y Ctgf, de los factores de transcripción Nfib, Klf2 y FoxM1, además de IGF1R en células mesenquimales primarias *Igf1*<sup>+/+</sup> e *Igf1*<sup>-/-</sup> cultivados en medio completo (10% FBS), tras 16 h en medio de ayuno con poco suero (0,1% FBS), y a las 24 y 48 h con IGF1 (60 ng/mL) tras el ayuno (*blots* superiores en verde y rojo). Debajo de cada uno de estos *blots* se presenta la imagen tomada para la expresión de la β-Tubulina (bandas en rojo). **B-G.** Representación gráfica de la densitometría de los inmunoblots normalizado con los niveles de β-Tubulina y tomando como 100% el valor de 0,1% FBS, en los genes especificados. Los datos corresponden a la media ± error típico de tres experimentos independientes. En las células mesenquimales primarias (*Igf1*<sup>+/+</sup> o *Igf1*<sup>-/-</sup>) no se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes analizados en las diferentes condiciones de cultivo. Sin embargo sí se observaron diferencias al comparar los niveles de las proteínas entre los dos genotipos. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; según el test de Mann Whitney *U*-Test y Kruskal Wallis). WT, LMEFs *Igf1*<sup>+/+</sup>; KO, LMEFs *Igf1*<sup>-/-</sup>.

Para concretar posibles cambios en la morfología celular y en la localización subcelular de las proteínas, las células mesenquimales cultivadas en medio completo, en ayuno o con IGF1 o IGF2 durante 48 h tras el ayuno, se sometieron a análisis inmunocitoquímico con anticuerpos específicos para los factores de transcripción en estudio (Nfib, Klf2, FoxM1), y a un contrateñido simultáneo de actina. Estos análisis se expresan en la Figura 36. La inmunotinción es exclusivamente nuclear para los tres factores de transcripción, y tan sólo se aprecia un descenso en la intensidad de tinción para Nfib en las células mesenquimales primarias *Igf1*<sup>-/-</sup> tras añadir IGF1 al medio (Figura 36B) aunque éste no es significativo cuando se cuantifica (Figura 35D). La tinción con faloidina mostró alteraciones en la localización de los microtúbulos de actina en las células *Igf1*<sup>-/-</sup> tras adicción de IGF1 (Figura 36B, D y F), que induce su localización periférica.

Con el objetivo de determinar el efecto de los IGFs sobre la proliferación de estas células, se determinaron sus niveles mitóticos relativos a las 48 h de haber añadido los factores IGF1 e IGF2 mediante ensayos colorimétricos de MTS. Los resultados se presentan en la Figura 37. Se aprecia que IGF1 produce un aumento significativo de la proliferación en ambas líneas celulares, siendo ligeramente más alto en las células *Igf1*<sup>-/-</sup>. Por el contrario el IGF2 no muestra efecto alguno sobre la proliferación de las células *Igf1*<sup>+/+</sup>, y aunque presenta unos niveles medios ligeramente más elevados en las células *Igf1*<sup>-/-</sup>, éstos tampoco son significativos.



**Figura 36. Inmunolocalización de los factores de transcripción Nfib, Klf2 y FoxM1 en células mesenquimales primarias mutantes para *Igf1*.** Microfotografías confocales representativas de tinciones inmunocitoquímicas en células mesenquimales primarias *Igf1*<sup>+/+</sup> e *Igf1*<sup>-/-</sup>, en diferentes condiciones de cultivo: medio completo (10% FBS), en ayuno con poco suero durante 16 h (0,1% FBS), y a las 48 h tras añadir IGF1 (60 ng/mL) o IGF2 (30 ng/mL) después del ayuno (n = 3 por condición). **(A-B).** Los paneles muestran la inmunotinción nuclear en rojo para Nfib (flechas rojas), en células mesenquimales *Igf1*<sup>+/+</sup> (A) e *Igf1*<sup>-/-</sup> (B). En verde se visualiza la faloidina, proteína que identifica la localización de los microtubulos de actina. De la misma forma, en **C-D** se representa la inmunotinción para Klf2, y en **E-F** para FoxM1. En ningún caso se aprecian alteraciones en la localización intracelular de las proteínas, que es nuclear en todas las condiciones, y tan sólo se aprecia una bajada en la intensidad de tinción para Nfib en las células mesenquimales primarias *Igf1*<sup>-/-</sup> (B, IGF1/48 h; punta de flecha roja). También se aprecia que en la condición IGF1/48 h de las células *Igf1*<sup>-/-</sup> la faloidina se localiza más en la periferia celular (IGF1/48 h en B, D y F) (puntas de flechas blancas). Barra de escala: 20  $\mu$ m.



**Figura 37. Efecto de los IGFs sobre la proliferación de células mesenquimales de pulmón embrionarias.** Las células mesenquimales primarias de ambos genotipos (*Igf1<sup>+/+</sup>* e *Igf1<sup>-/-</sup>*) cultivadas *in vitro* en medio de ayuno (0,1% FBS) se incubaron 48 h adicionales con IGF1 (60 ng/mL) o IGF2 (30 ng/mL) en el mismo medio y se determinaron los niveles de proliferación mediante ensayos colorimétricos con MTS. En la gráfica se representan los valores relativos medios  $\pm$  error típico en cada condición de cultivo en las células *Igf1<sup>+/+</sup>* (barras blancas) (n = 6) e *Igf1<sup>-/-</sup>* (barras negras) (n = 4). (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; test de Kruskal Wallis).

De todos estos resultados se deduce que aunque IGF1 no altera la expresión de los genes analizados en las células mesenquimales primarias cultivados *in vitro*, sí demuestran que induce proliferación. Además, también demuestran que las células *Igf1<sup>-/-</sup>* son más sensibles a los cambios en las condiciones de cultivo ya que muestran mayores cambios de expresión de IGF1 y en la proliferación.

### 3.3. Estudio del efecto de IGF1 sobre la expresión de genes reguladores en la línea celular tumoral de origen humana H1299

Normalmente los IGFs se encuentren altamente expresados en muchas líneas celulares tumorales de pulmón (Reeve et al., 1992; Quinn et al., 1996). Para determinar el efecto de IGFs sobre las células epiteliales del pulmón hemos seguido el mismo abordaje experimental que en los apartados anteriores, pero en este caso usando una línea celular de origen epitelial derivada de tumores humanos. Las líneas usadas fueron derivadas de: carcinomas escamosos o epidermoides (CE) las líneas H157 y H322, adenocarcinomas (ADC) las líneas H52, H358, H23 y A549, carcinoma de células grandes (CCG) las líneas H460 y H1299, y tumor carcinoide (CA) la línea H727, cultivadas en medio completo (10% FBS). En ellas se determinó la expresión de Cyr61, Ctgf, Nfib, Klf2, FoxM1 e IGF1R mediante *Western blot*, y los resultados se muestran en la Figura 38A. Se aprecia que los niveles de expresión de Cyr61 y Ctgf son bajos y similares en todas las líneas, con excepción de la línea celular de carcinoma de células grandes H1299 donde se presentan especialmente elevados. La expresión de Nfib es más elevada y similar en todas las líneas analizadas. Por el contrario Klf2 e IGF1R, aunque se expresen en todas las líneas, sus niveles son más variables, independientemente del tipo de tumor del que proceden.

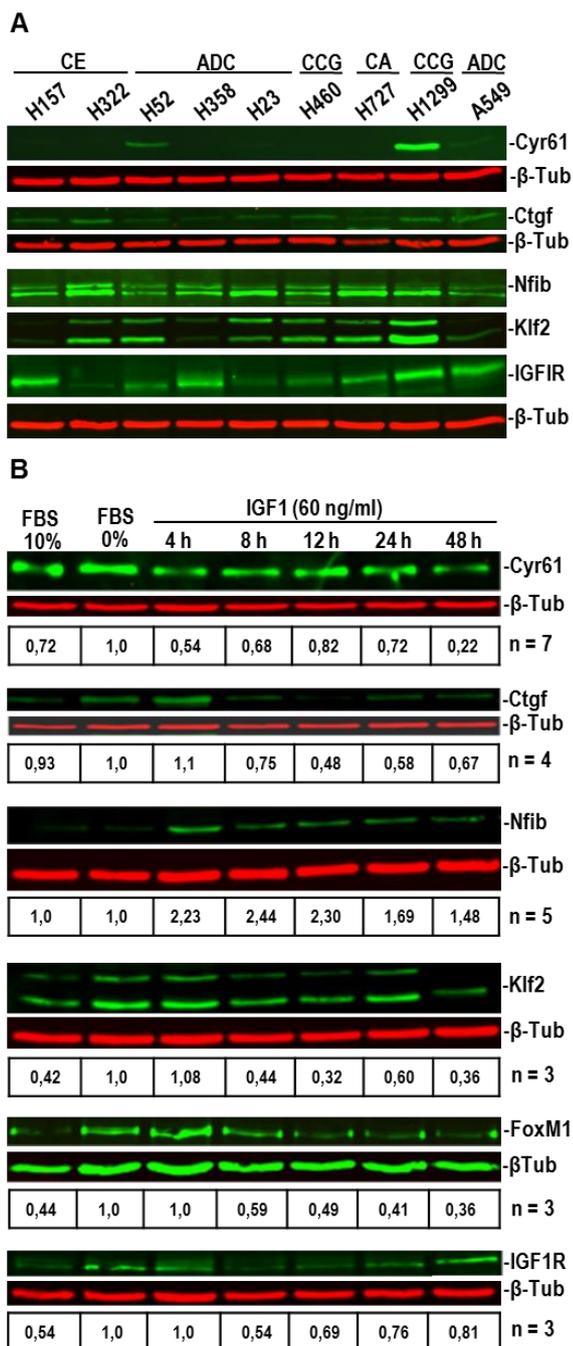
Dado que la línea H1299 es comúnmente usada como modelo de estudio molecular del cáncer de pulmón y dado que expresa todos los genes en estudio, se decidió usar para determinar el efecto de los IGFs sobre la expresión de las proteínas de interés. Esta determinación se realizó por *Western blot* para Cyr61 y Ctgf, Nfib, Klf2 y FoxM1, e IGF1R en extractos de proteína del cultivo de esta línea celular H1299 en diferentes condiciones. Los resultados se muestran en la Figura 38B.

En primer lugar cabe mencionar que todos los genes, con excepción de Nfib y Ctgf, aumentan su expresión al cambiarles del medio completo (10% FBS) al medio de ayuno sin suero. Ya en el medio de ayuno se aprecia que IGF1 induce un descenso a lo largo del tiempo con respecto a 0% FBS, en los niveles de expresión de todos los genes, excepto Nfib que aumenta. Los niveles de Nfib aumentan considerablemente entre las cuatro y doce horas tras haber añadido el IGF1 para después ir bajando hasta casi niveles normales a las 48 h. Entre los que descienden sus niveles, Cyr61 ya se ve afectado a las 4 h, mientras que Ctgf, Klf2, FoxM1 e IGF1R no empiezan a descender sus niveles hasta las 8 h, para mantenerse bajos hasta las 48 h. Por último, IGF1R muestra la mayor inhibición por IGF1 a las 12 h, para después ir progresivamente recuperando sus niveles, hasta casi los normales, un patrón muy parecido al observado en Ctgf.

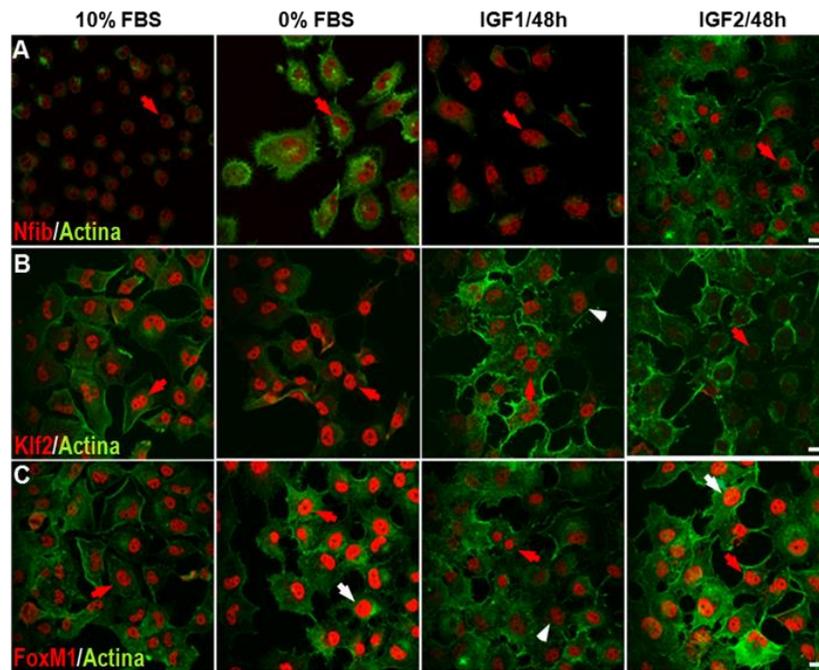
En las tinciones inmunocitoquímicas de los factores de transcripción (Figura 39) no se aprecian cambios en la localización extracelular de estas proteínas, que en todos ellos se mantiene nucleares, y sus niveles de tinción reflejan los datos de *Western blots*. Así, en Nfib se aprecia un ligero aumento en la intensidad a las 48 h después de añadir IGF1, efecto no tan claro con IGF2 (Figura 39A). También se nota que la tinción para Klf2, y sobre todo para FoxM1 tras aumentar en la condición de ayuno, vuelve a descender a niveles de medio completo tras la adición de IGF1. Este efecto es específico de IGF1 en el caso de FoxM1, ya que no se observa un descenso de su expresión al añadir IGF2 (Figura 39C), mientras ambos factores IGF1 e sobre todo IGF2, reducen la tinción para Klf2 (Figura 39B). En este tipo celular no se aprecian cambios importantes consistentes en la tinción de actina en las dos condiciones diferentes de cultivo.

Cuando se determinaron los efectos de los IGFs sobre los niveles de proliferación de las células H1299 también se observó un aumento significativo tras la adición de IGF1 al medio, efecto no observado por la adición de IGF2 (Figura 40).

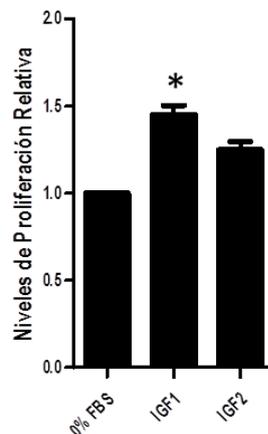
De los resultados obtenidos de los experimentos en las células de origen epitelial de tumores de pulmón H1299 se infiere que son sensibles a la acción de los IGFs, pero sobre todo de IGF1, en donde además de inducir su proliferación también induce la expresión de Nfib y reprime la de Cyr61, Ctgf, Klf2 y FoxM1, además del receptor, IGF1R.



**Figura 38. Expresión de genes reguladores en líneas celulares derivadas de tumores epiteliales de pulmón humanos.** **A.** Detección por *Western blot* de los niveles de expresión de los factores matricelulares Cyr61 y Ctgf, de los factores de transcripción Nfib y Klf2, y de IGF1R en líneas celulares de tumores pulmonares humanos con origen epitelial cultivadas en medio completo (10% FBS) (color verde). Los tipos tumorales de las células fueron de carcinomas escamosos o epidermoides (CE) (líneas H157 y H322), adenocarcinomas (ADC) (líneas H52, H358, H23 y A549), carcinoma de células grandes (CCG) (líneas H460 y H1299), y tumor carcinoide (CA) (línea H727). Debajo se muestran los *blots* con los niveles de β-Tubulina (color rojo). **B.** Determinación por *Western blot* de los perfiles de expresión de Cyr61, Ctgf, Nfib, Klf2, FoxM1, e IGF1R en la línea celular H1299 en diferentes condiciones de cultivo: medio completo (10% FBS), tras 16 h en medio de ayuno (0% FBS), y a las 24 y 48 h con IGF1 (60 ng/mL) tras el ayuno y respectiva cuantificación relativa con respecto al 0% FBS, tomado como control.



**Figura 39. Inmunolocalización de los factores de transcripción Nfib, Klf2 y FoxM1 en la línea celular H1299.** A-C. Microfotografías confocales representativas de tinciones inmunocitoquímicas para los factores de transcripción Nfib, Klf2 y FoxM1 en células H1299 en medio completo (10% FBS) en ayuno durante 16 h (0% FBS), y a las 48 h tras añadir IGF1 (60 ng/mL) o IGF2 (30 ng/mL) después del ayuno (n = 3 por condición). En verde se visualiza la faloidina, proteína que identifica la localización de los microtubulos de actina. La tinción de los factores de transcripción (en rojo) es nuclear en todos los casos (flechas rojas). Nótese el descenso en la intensidad de la tinción de Klf2 y FoxM1 tras la adición de IGF1 (B y C; IGF1/48 h) (puntas de flechas blancas) y aumento en la intensidad de tinción de FoxM1 con las células en ayuno (0% FBS) y en presencia de IGF2 (C, IGF2/48 h) (flecha blanca) Barra de escala: 20  $\mu$ m.



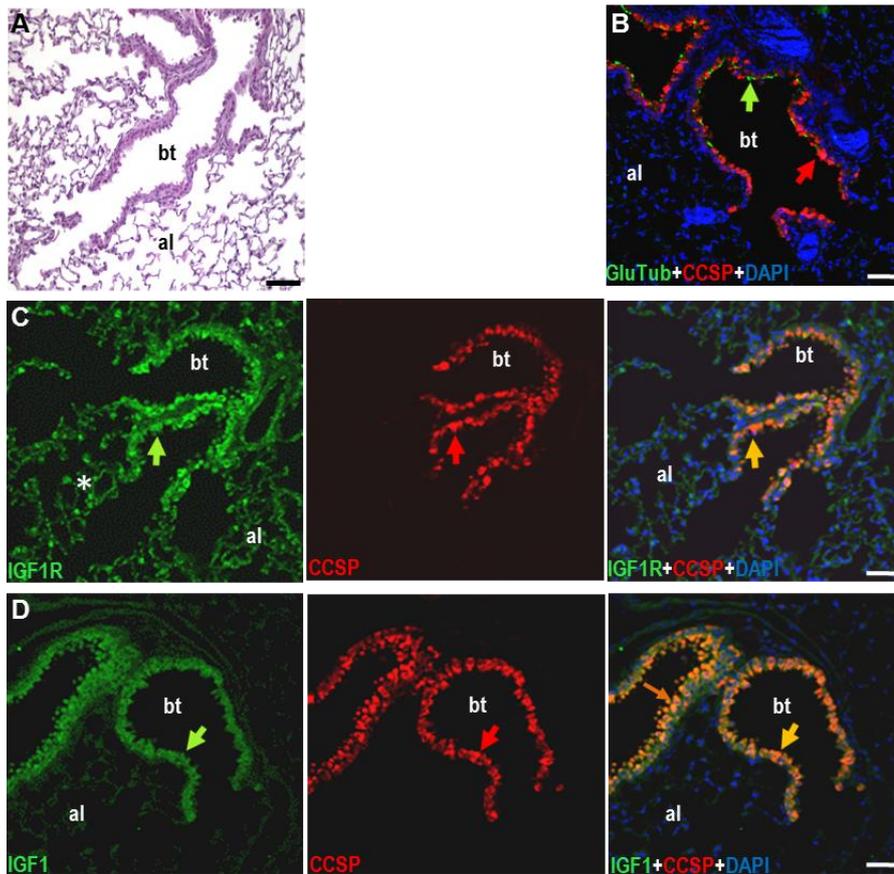
**Figura 40. Efecto de los IGFs sobre la proliferación de la línea celular H1299.** Las células en cultivo en medio de ayuno (0% FBS) se incubaron 48 h adicionales con IGF1 (60 ng/mL) o IGF2 (30 ng/mL) en el mismo medio y se determinaron los niveles de proliferación mediante ensayos colorimétricos con MTS. En el gráfico se representan los valores relativos medios  $\pm$  error típico en cada condición (n = 3) respecto a los valores en medio de ayuno (0% FBS) (tomado como 1,0). Nótese el aumento de proliferación tras la adicción de IGF1. (\*  $p < 0,05$ , test de Kruskal Wallis).

#### 4. Expresión de IGF1R en pulmón de ratón adulto

Cómo se ha mencionado en el apartado 1, los ARNm de los IGFs (*Igf1*, *Igf2* e *Igf1r*) se expresan en el pulmón del ratón adulto (Figura 27). Para establecer la localización concreta a nivel celular se determinaron por inmunohistoquímica los patrones de expresión de IGF1R e IGF1 en los pulmones de los ratones adultos. Las imágenes de microscopía confocal de las inmunotinciones de estas proteínas en los bronquiolos terminales y parénquima alveolar adyacente se presentan en la Figura 41. Se aprecia inmunotinción tanto para IGF1R (Figura 41C) como para IGF1 (Figura 41D) sobre todo en el epitelio de los bronquiolos terminales (véase histología en la Figura 41A), que en el ratón está formado casi exclusivamente por células de Clara, que se tiñen para CCSP (Mercer et al., 1994) y en menor proporción por células ciliadas, cuyos cilios de su parte apical se tiñen con Glu-Tubulina (Toskala et al., 2005) (Figura 41B). Se demuestra que IGF1R e IGF1 se expresan en las células de Clara por su co-tinción con la CCSP (Figura 41C-D). También se aprecia que estos genes, pero sobre todo IGF1R, presentan inmunotinción en el parénquima alveolar (Figura 41C y D, paneles de la izquierda).

En la Figura 42A se aprecia la expresión de IGF1R en prácticamente todas las células del epitelio bronquiolar proximal, colocalizando prácticamente con CCSP en todas las células de Clara, pero también presente en el otro tipo celular mayoritario de esta zona, las células ciliadas, como lo demuestra la tinción conjunta de CCSP en células de Clara y de Glu-Tubulina en la parte apical de las células ciliadas (Figura 42B). Las células epiteliales neuroendocrinas, presentes en pequeños acúmulos localizadas sobre todo en zonas de ramificación de los bronquiolos, y que se identifica por la expresión del marcador CGRP (Gould et al., 1983) también expresan IGF1R, como lo demuestra la inmuno-localización de ambas proteínas (Figura 42C). En el pulmón proximal se observa que IGF1R también se expresa en el músculo liso, mucho más en el músculo que rodea los vasos sanguíneo que en el músculo parabronquial (Figura 42D).

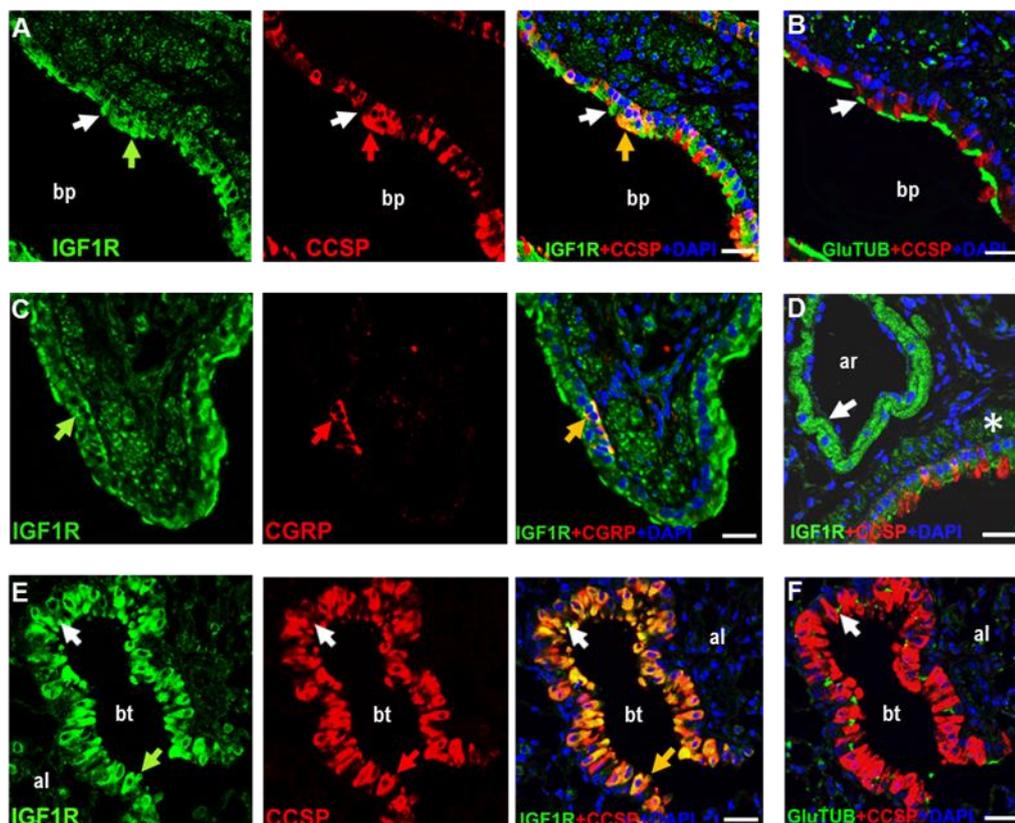
Como se ha mencionado, las células del epitelio de los bronquiolos terminales se tiñen para IGF1R, y la máxima expresión de esta proteína se obtiene en las células de Clara (Figura 42E), aunque las células ciliadas, aquí en menos proporción que en los bronquiolos proximales (Figura 42F), también expresan IGF1R.



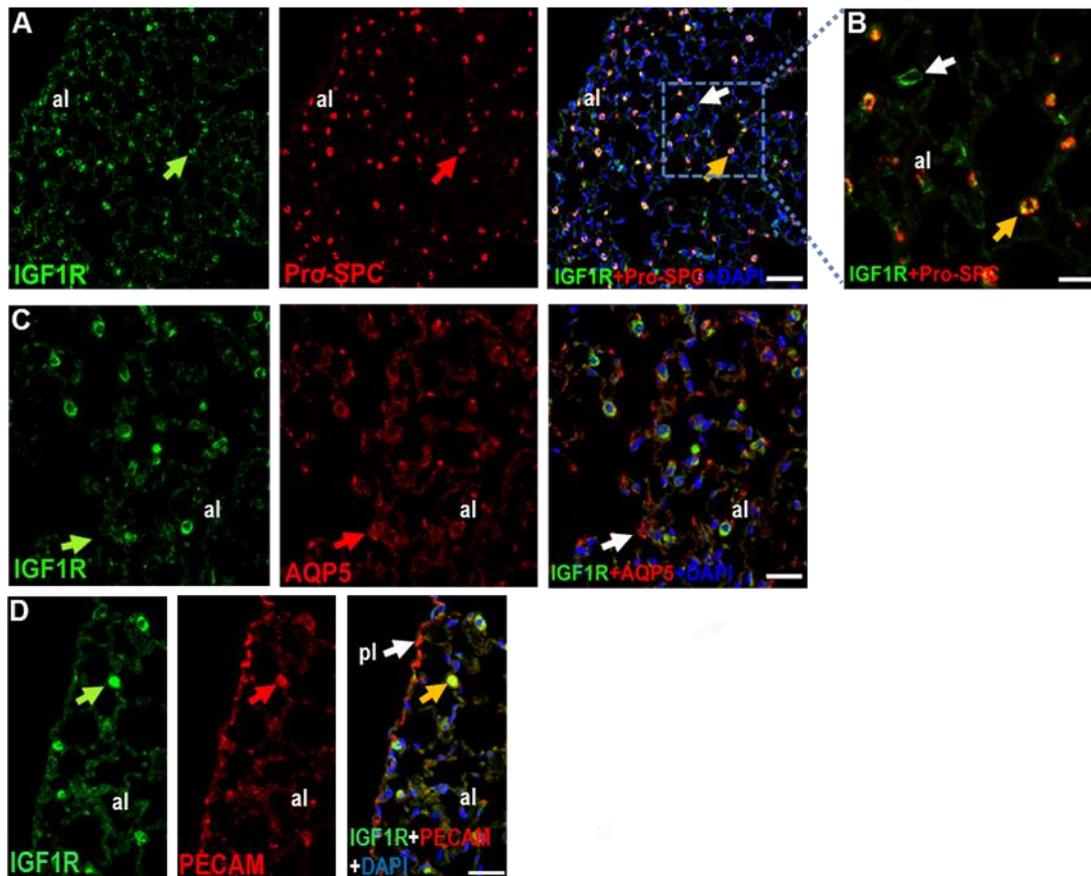
**Figura 41. Patrón de expresión de genes IGF en el pulmón de ratón adulto.** Histología y tinción inmunohistoquímica para IGF1R y su ligando IGF1 en los bronquiolos terminales de ratones de 6 meses de edad. **A.** Tinción inmunohistoquímica por H&E de un corte longitudinal de un pulmón mostrando un bronquiolo terminal. **B-D.** Imágenes de microscopía confocal de las inmunotinciones. **B.** Imagen confocal del marcaje de las células de Clara con un anticuerpo anti-CCSP (en rojo) (flecha roja) y de las células ciliadas con un anticuerpo anti Glu-Tubulina (en verde) (flecha verde) en los bronquiolos terminales. **C-D.** Inmunotinciones para IGF1R e IGF1, en los paneles de la izquierda (en verde); para CCSP en los paneles centrales (en rojo); y las imágenes superpuestas con la tinción en azul con DAPI en los paneles de la derecha. **C.** Se aprecia una intensa tinción para IGF1R en el epitelio bronquiolar (flecha verde), colocalizando con las células de Clara (flechas en rojo y naranja). También se aprecia expresión de IGF1R en células de la zona alveolar (asterisco). **D.** La tinción para IGF1 también es intensa en las células del epitelio bronquiolar (flecha verde), colocalizando con las células de Clara (flecha roja y naranja). al, zona alveolar; bt, bronquiolo terminal. Barra de escala en A-D: 50  $\mu$ m.

En la zona pulmonar distal del parénquima alveolar, IGF1R presenta una tinción puntuada (Figura 43A, panel izquierdo). A mayor magnificación se observa que IGF1R se expresa en todas las células AEC2 del epitelio alveolar porque colocaliza perfectamente con el marcador Pro-SPC específico de este tipo celular (Weaver and Whitsett, 1988) (Figura 43B) pero no en las células AEC1, porque no colocaliza con Aqp5, marcador que las identifica (Funaki et al., 1998) (Figura 43C). IGF1R también colocaliza con células que expresan PECAM, marcador de células endoteliales de capilares, pero no en todas, ya que algunas células PECAM<sup>+</sup>, como las que están bajo la pleura, no expresan IGF1R (Figura 43D). En la zona alveolar existen algunas células que por su gran tamaño, y localización dentro del espacio aéreo alveolar, podrían ser macrófagos (Figura 43B), previamente descritos que expresan IGF1R (Suh et al., 2013).

Estos resultados de inmunolocalización de IGF1R e IGF1 en el pulmón de ratones adultos son prácticamente idénticos a los descritos en el pulmón prenatal embrionario (Figura 29B-M), lo que indica que el patrón de expresión de estos genes no se altera durante el desarrollo del pulmón, y que por lo tanto deben ejercer alguna función relevante en éste órgano.



**Figura 42. Expresión de IGF1R en el epitelio bronquiolar.** Imágenes confocales de la colocalización de IGF1R con marcadores del epitelio bronquiolar en el pulmón de ratón adulto de 3 meses. **A.** Inmunolocalización de IGF1R en el panel de la izquierda (color verde), de CCSP en células de Clara en el panel central (color rojo) y de su superposición con marcaje nuclear con DAPI en el panel de la derecha (color azul), en un bronquiolo proximal. Se aprecia colocalización de IGF1R (flecha verde) en células de Clara (flecha roja y naranja), aunque también hay células con tinción de IGF1R que no colocaliza con CCSP (flechas blancas). **B.** Marcaje de CCSP (en rojo) y de Glu-Tubulina en la parte apical de las células ciliadas (en verde) en una sección adyacente a la mostrada en A. La flecha blanca marca las células con co-tinción de Glu-Tubulina que en la sección adyacente se teñía para IGF1R (flechas blancas). **C.** Co-inmuntinción (flecha naranja) de IGF1R en el panel izquierda (flecha verde) con CGRP en el panel central (flecha roja). **D.** Tinción para IGF1R (en verde) en el músculo liso de la arteria pulmonar (flecha blanca) y en el músculo liso parabronquial (asterisco). **E.** Tinción para IGF1R en el epitelio distal de un bronquiolo terminal (panel de la izquierda, en verde), y para CCSP en la misma muestra (panel central, en rojo). En el panel de la derecha se muestra la superposición con la tinción nuclear con DAPI (en azul). Las células con mayor intensidad para CCSP son también las que más se tiñen para IGF1R (flechas de colores). También se observan células IGF1R<sup>+</sup> (en verde) que no se tiñen para CCSP (flechas blancas). **F.** Tinción de Glu-Tubulina (verde) y CCSP (rojo) en una sección adyacente a la mostrada en E. Se aprecia que las células no teñidas para CCSP en E, se tiñen para Glu-Tubulina (flecha blanca). bt, bronquiolo terminal; bp, bronquiolo proximal; al, zona alveolar; ar, arteria. Barra de escala: 25 µm en A-B y D-F; 17 µm en C.



**Figura 43. Expresión de IGF1R en la zona alveolar.** Imágenes confocales para determinar la expresión de IGF1R (en verde) en la zona alveolar, co-teñidas con diversos marcadores celulares específicos (en rojo). **A.** Co-tinción de IGF1R (panel izquierdo) y pro-SPC y su colocalización en la imagen superpuesta (panel derecho, en naranja). Las flechas de colores apuntan a la misma célula. **B.** Imagen aumentada del recuadro en A en donde se aprecia la colocalización de IGF1R en todas las AEC2 en naranja (flecha naranja). Existen algunas células IGF1R<sup>+</sup> en la zona alveolar que no se tiñen con Pro-SPC, posiblemente macrófagos (flecha blanca). **C.** Co-tinción para IGF1R (panel izquierdo), y Aqp5 (panel central), y superposición con la tinción adicional de DAPI nuclear (azul, panel derecho). No se observa colocalización de estas proteínas (flecha blanca). **D.** Co-tinción para IGF1R (verde, panel izquierdo), y PECAM (CD31) (rojo, panel central), y superposición de imágenes con DAPI (azul, panel derecho). Se aprecian células co-teñidas para ambos marcadores en la zona alveolar (flechas de colores), aunque en la zona pleural hay células marcadas con PECAM que son IGF1R<sup>-</sup> (flecha blanca). al, zona alveolar; pl, pleura. Barra de escala: 50  $\mu$ m en A; 17  $\mu$ m en B y 25  $\mu$ m en C-D.

## 5. Generación y estudio preliminar del fenotipo pulmonar de ratones mutantes condicionales de IGF1R en el epitelio respiratorio

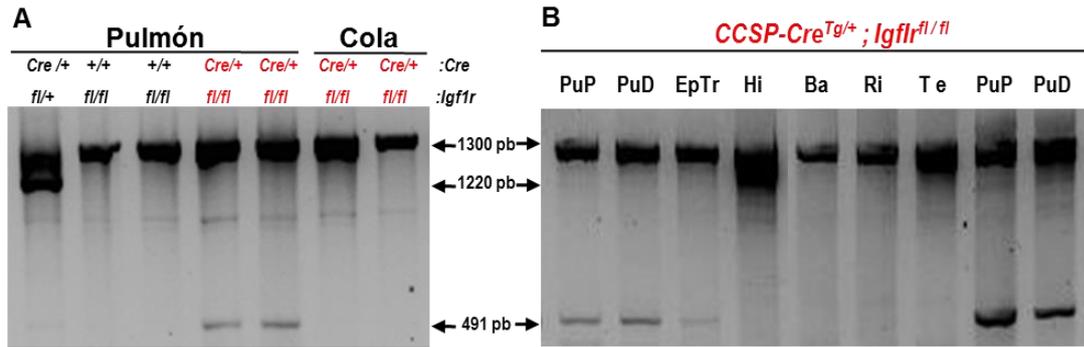
Dado que los mayores niveles de expresión de IGF1R en el pulmón adulto de los ratones se observan en células del epitelio respiratorio, y sobre todo en las células de Clara de los bronquiolos terminales, para determinar la función de los IGFs en estas células, decidimos generar ratones mutantes condicionales de *Igf1r* en el epitelio respiratorio (Figura 21 de Material y Métodos). Para conseguir este objetivo generamos y caracterizamos dos líneas diferentes de mutantes condicionales de IGF1R: una con delección específica en las células de

Clara (Figura 22 de Material y Métodos), y otra con delección generalizada en todas las células del epitelio respiratorio (Figura 24 de Material y Métodos).

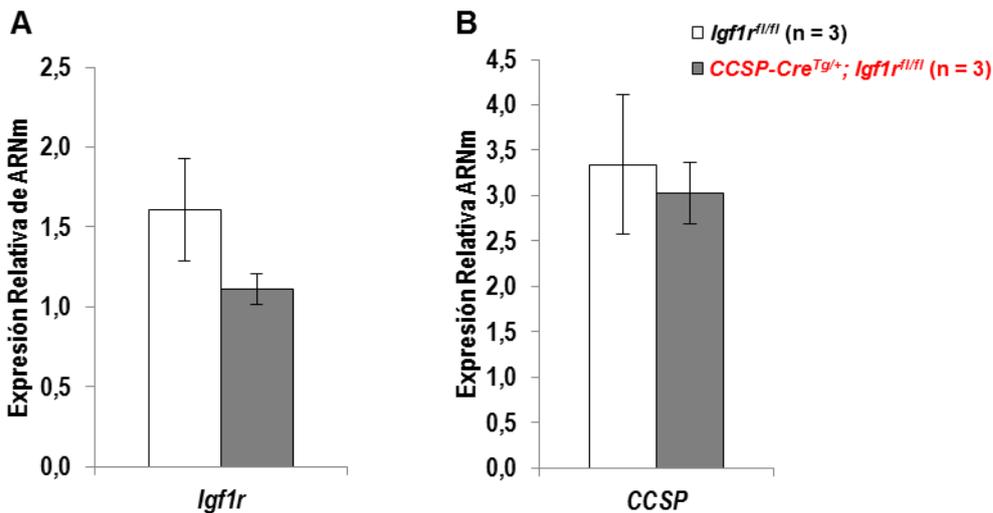
### 5.1. Generación y caracterización preliminar del fenotipo pulmonar de los mutantes condicionales de IGF1R en las células de Clara

Dado que hemos encontrado altos niveles de expresión de IGF1R y de su ligando, IGF1, en las células de Clara de ratón adulto (Figura 41C y 41D), planteamos la hipótesis de que estos genes podrían estar implicados en la diferenciación y/o función de este tipo de célula. Para determinar el papel de IGF1R en las células de Clara de las vías respiratorias eliminamos por métodos genéticos el gen de *Igf1r* en las células epiteliales de Clara. Para ello los ratones *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* se cruzaron con los ratones transgénicos *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>* que dirigen la expresión de la recombinasa *Cre* específicamente a las células de Clara (Apartado 3.2 de Introducción), generando los ratones mutantes dobles *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*. Estos ratones deberían sufrir la delección genética en el locus de *Igf1r* que causaría la pérdida de función del gen específicamente en las células de Clara (Bertin et al., 2005). Al cruzar los ratones homocigotos *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* con los transgénicos *CCSP-Cre* se generan cuatro posibles genotipos según se ilustra en la Figura 23 de Material y Métodos. Para comprobar que la delección ocurre a nivel genómico de forma específica en el pulmón de los animales *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, el ADN genómico del pulmón y de la cola de ratones con diferentes genotipos se analizó por PCR para determinar la presencia de la delección. En la Figura 44A se observa que la delección (banda de 491 pb) en el locus *Igf1r* ocurre específicamente en el pulmón de los animales transgénicos para *Cre* (*CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>*) tanto heterocigotos *Igf1r<sup>fl/+</sup>* como en los homocigotos *Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, pero no en la cola de los mutantes condicionales. Además se aprecia la banda de 1300 pb, correspondiente al alelo con el exón 3 de *Igf1r* “floxeado”, únicamente en los homocigotos *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* y una banda adicional de 1220 pb correspondiente al alelo normal en el heterocigoto *Igf1r<sup>fl/+</sup>*. Cuando el ADN genómico de diferentes tejidos y raspados de células del epitelio traqueal se analiza para determinar la delección en el exón 3 de *Igf1r*, se observa su presencia tan sólo en el pulmón y células del epitelio traqueal, pero no en el ADN obtenido de otros órganos como hígado, bazo, riñón o testículo (Figura 44B).

Una vez comprobado que el pulmón de los ratones *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>* sufrían la delección en el gen *Igf1r*, decidimos comprobar si los niveles de expresión de IGF1R y CCSP se veían afectados. La determinación de los niveles de expresión del ARNm de estos genes por qRT-PCR en homogenados del pulmón completo no mostró diferencias significativas entre los animales de los dos genotipos, aunque sobre todo en el caso de *Igf1r*, la media de los niveles de expresión de ARNm es inferior en los animales doble transgénicos (Figura 45).



**Figura 44. Detección de la delección en el locus *Igf1<sup>fl/fl</sup>* de ratones mutantes *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>* mediante PCR.** Imágenes de geles de agarosa teñidos con Gel Red® en el que se analizaron muestras de PCR para determinar la delección de ADN genómico de los tejidos especificados. **A.** Resultado de la PCR en ADNs de pulmón y cola de animales con diferentes genotipos. **B.** Gel de PCR de ADNs de animales mutantes condicionales *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>* mostrando la especificidad de la delección en el pulmón y tráquea. El ADN genómico analizado procede de: pulmón proximal (PuP), pulmón distal (PuD), epitelio traqueal (EpTr), hígado (Hi), bazo (Ba), riñón (R), testículo (Te). El ADN de pulmón es de animales diferentes. La banda de la delección sólo aparece en ADNs de pulmón y tráquea. Nótese que en todos los canales aparece amplificación de ADN sin sufrir la delección (banda de 1300 pb), sugiriendo que no se produce una delección total del gen *Igf1r*.



**Figura 45. Niveles de expresión relativos de ARNm de *Igf1* y *CCSP* en ratones mutantes *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>*.** La gráfica representa los datos de la qRT-PCR para los genes usando ARN obtenido de pulmones de ratones control (*Igf1<sup>fl/fl</sup>*) o mutantes condicionales (*CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>*). El gen *Rn18s* (ARN ribosómico 18S) se ha usado como control (n = 3 por condición). **A.** Nivel de expresión de *Igf1*. **B.** Nivel de expresión de *CCSP*. Los datos corresponden a la media ± error típico. (Mann Whitney U-Test).

El análisis histológico de los mutantes *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>* muestra diferencias sutiles en la morfología del epitelio de algunos bronquiolos terminales. En los ratones control (*Igf1<sup>fl/fl</sup>*) el epitelio pseudoestratificado es grueso y muestra una continuidad en la disposición de los núcleos con proyecciones al espacio aéreo de las cúpulas de las células de Clara (Figura 46A). Sin embargo en los bronquiolos terminales afectados de los ratones mutantes se observa que el epitelio es más plano, se aprecia la falta de continuidad en la distribución de núcleos y no se

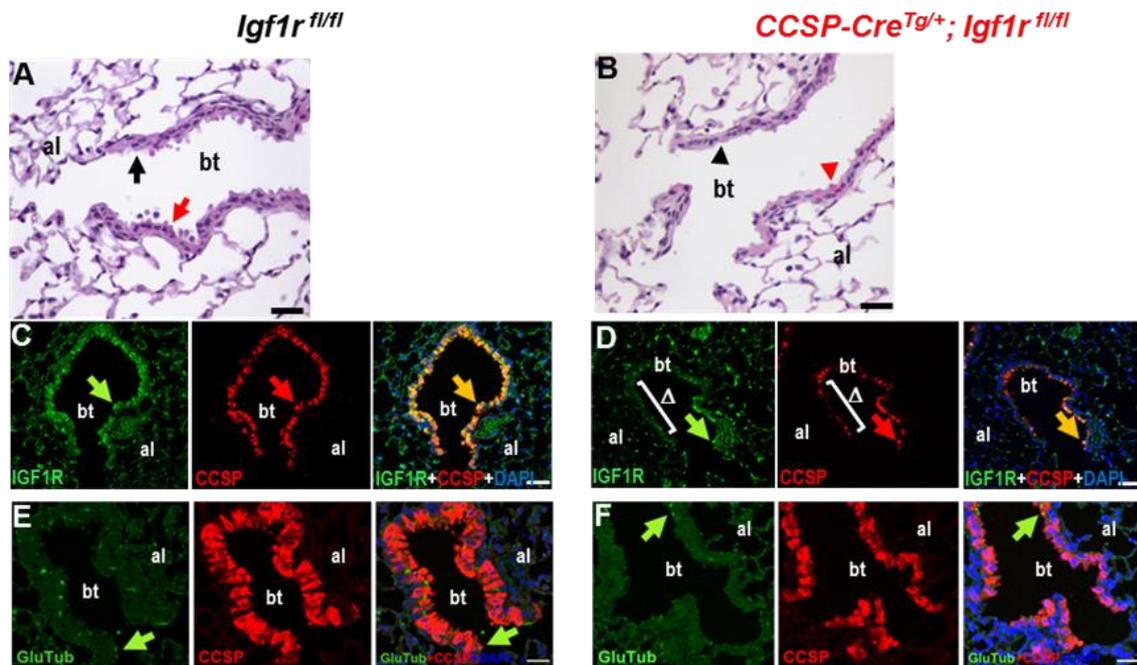
aprecian tan claramente las proyecciones apicales del citoplasma de las células de Clara (Figura 46B).

A diferencia de los ratones control con expresión de IGF1R en todas las células del epitelio bronquiolar terminal, más intensa en las células de Clara (Figura 46C) descrita en detalle en la Figura 42E, la determinación inmunohistoquímica de la expresión de IGF1R en los animales mutantes *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>* demostró en algunos bronquiolos terminales la ausencia de expresión de IGF1R. Esta ausencia se corresponde con la reducción o casi inexistencia de la expresión de CCSP en las células de Clara (Figura 46D).

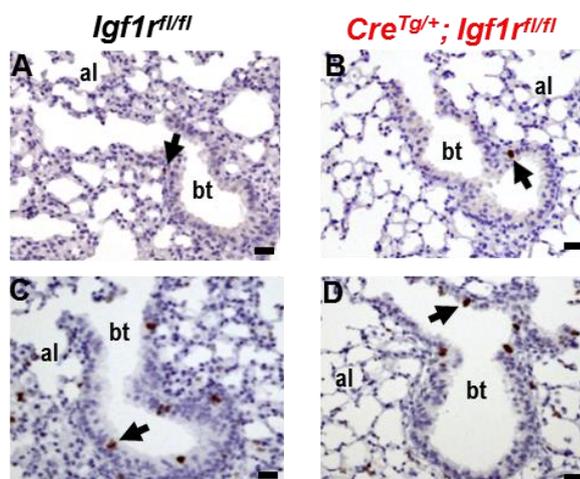
La proporción y extensión de estas zonas afectadas es variable entre secciones del pulmón de un mismo animal y en pulmones de animales diferentes. Este resultado demuestra que la delección de *Igf1r* en estos mutantes no ocurre en todas las células de Clara, probablemente debido a una expresión de la recombinasa *Cre* en mosaico en estas células.

La presencia de células ciliadas mediante tinción con Glu-Tubulina en los bronquiolos terminales afectados por la disminución de la expresión de IGF1R se vio reducida en los animales mutantes respecto a los control (Figura 46E-F). Estos resultados indican que la delección de IGF1R en las células de Clara de los bronquiolos terminales altera la morfología de estas células, dándoles un aspecto más plano, y también afectaría la proporción y diferenciación de las células ciliadas.

Con el objeto de determinar si la delección de *Igf1r* en los animales *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>* afectaba a la proliferación celular del epitelio de los bronquiolos terminales se realizaron inmunotinciones para BrdU y Ki-67 en secciones del pulmón de estos animales. Los resultados no demuestran diferencias apreciables entre los genotipos (Figura 47).



**Figura 46. Efecto de la delección condicional de IGF1R en el epitelio bronquiolar terminal en los ratones adultos  $CCSP-Cre^{Tg/+}; Igf1r^{fl/fl}$ .** Tinciones de cortes longitudinales de pulmones de ratones adultos control ( $Igf1r^{fl/fl}$ ) y bronquiolos afectados en los mutantes condicionales ( $CCSP-Cre^{Tg/+}; Igf1r^{fl/fl}$ ). **A-B.** Tinciones con H&E indicando alteraciones histológicas en el epitelio bronquiolar. En los ratones control se aprecia una capa casi continua de células de Clara mostrando sus típicas cúpulas de secreción (flecha roja en A). En los mutantes las cúpulas son menos abundantes y menos prominentes (punta de flecha roja en B). El epitelio del bronquiolo terminal es más grueso en los ratones control (flecha negra en A) que en los ratones mutantes condicionales donde esporádicamente se observan zonas con falta de núcleos (punta de flecha negra en B). **C-D.** Imágenes confocales de co-inmuntinciones para IGF1R (panel de la izquierda, en verde) y CCSP en células de Clara (panel central, en rojo), y la superposición de las imágenes anteriores con la tinción nuclear con DAPI (panel de la derecha, en azul). Los ratones control expresan IGF1R en todas las células del epitelio bronquiolar (flecha verde) y en muchas células colocaliza con la expresión de CCSP en las células de Clara (flecha roja y naranja) (C). En los pulmones mutantes condicionales existen zonas del epitelio con carencia de IGF1R y reducción de la expresión de CCSP (segmento  $\Delta$ ), aunque se aprecian algunas células con expresión de IGF1R y CCSP (flechas de colores) (D). **E-F.** Alta magnificación de imágenes confocales de bronquiolos terminales presentando co-tinciones para Glu-Tubulina (Glu-Tub) en células ciliadas (paneles de la izquierda, en verde), y CCSP en células de Clara (paneles centrales, en rojo), y la superposición de ambas con DAPI (panel derecho, en azul). Se aprecia que en los bronquiolos de ratones control existen células Glu-Tub<sup>+</sup> distribuidas por todo el epitelio hasta las zonas más distales (flecha verde) (E), mientras que en los doble transgénicos estas células sólo se aprecian en zonas más proximales (flecha verde) (F). al, zona alveolar; bt, bronquiolo terminal. Barras de escala: 20  $\mu$ m en A-B; 50  $\mu$ m en C-D y 25  $\mu$ m en E-F.

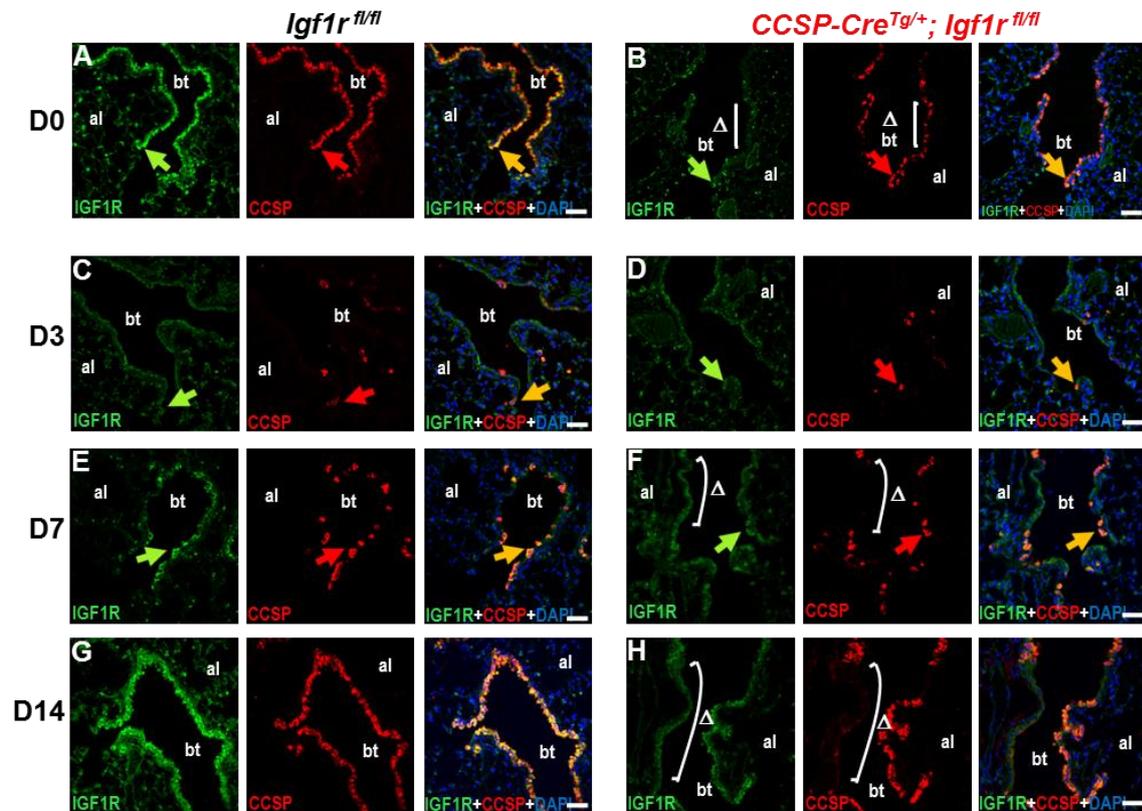


**Figura 47. Determinación de la proliferación en el epitelio bronquiolar de los ratones mutantes condicionales  $CCSP-Cre^{Tg/+}; Igf1r^{fl/fl}$ .** Tinciones inmunohistoquímicas para BrdU y Ki-67 en secciones longitudinales de pulmones de ratones control y doble transgénicos de 3 meses de edad, mostrando zonas del epitelio bronquiolar distal. **A-B.** Inmunodetección de BrdU en bronquiolo terminal de ratones ( $Igf1r^{fl/fl}$ ) (A) y de ratones mutantes condicionales ( $CCSP-Cre^{Tg/+}; Igf1r^{fl/fl}$ ) (B). **C-D.** Inmunotinción de Ki-67 con igual distribución que en A-B. Las flechas señalan las células marcadas. al, zona alveolar; bt, bronquiolo terminal. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

### 5.1.1. La regeneración de las células de Clara está alterada en los animales mutantes $CCSP-Cre^{Tg/+}$

Para determinar si la diferenciación de las células de Clara se veía afectada por la carencia de *Igf1r*, los ratones mutantes condicionales se sometieron a un estudio de ablación de células de Clara con naftaleno para estudiar su posterior regeneración (Apartado 4.1 de la Introducción) (Volckaert et al., 2011). Los resultados de la expresión de IGF1R y CCSP en los diferentes días antes y después del tratamiento con naftaleno se muestran en la Figura 48. Como ya se ha mencionado, en los animales mutantes condicionales se observan zonas en algunos de los bronquiolos terminales con carencia de IGF1R y reducción concomitante en la expresión de CCSP (Figura 46C-D y Figura 48A-B). A los tres días después del tratamiento con naftaleno se observa una reducción muy significativa en la expresión de IGF1R y CCSP en los bronquiolos terminales de los ratones control y mutantes condicionales, aunque se distinguen células o pequeños grupos de células aisladas, que expresan ambas proteínas (Figura 48C-D). Después de siete días tras el tratamiento se observan abundantes grupos de células en el epitelio de los bronquiolos terminales de los animales control con co-expresión de IGF1R y CCSP (Figura 48E), mientras que en los mutantes condicionales se aprecian zonas con ausencia de células con expresión de estos marcadores (Figura 48F). A las dos semanas después del tratamiento (D14) la mayoría de los bronquiolos terminales de los ratones control recuperan una expresión casi normal de IGF1R y CCSP (Figura 48G), mientras que en los dobles transgénicos todavía se aprecian grandes zonas con ausencia de IGF1R y CCSP (Figura 48H). Estos resultados indicarían que la regeneración de las células de Clara requiere

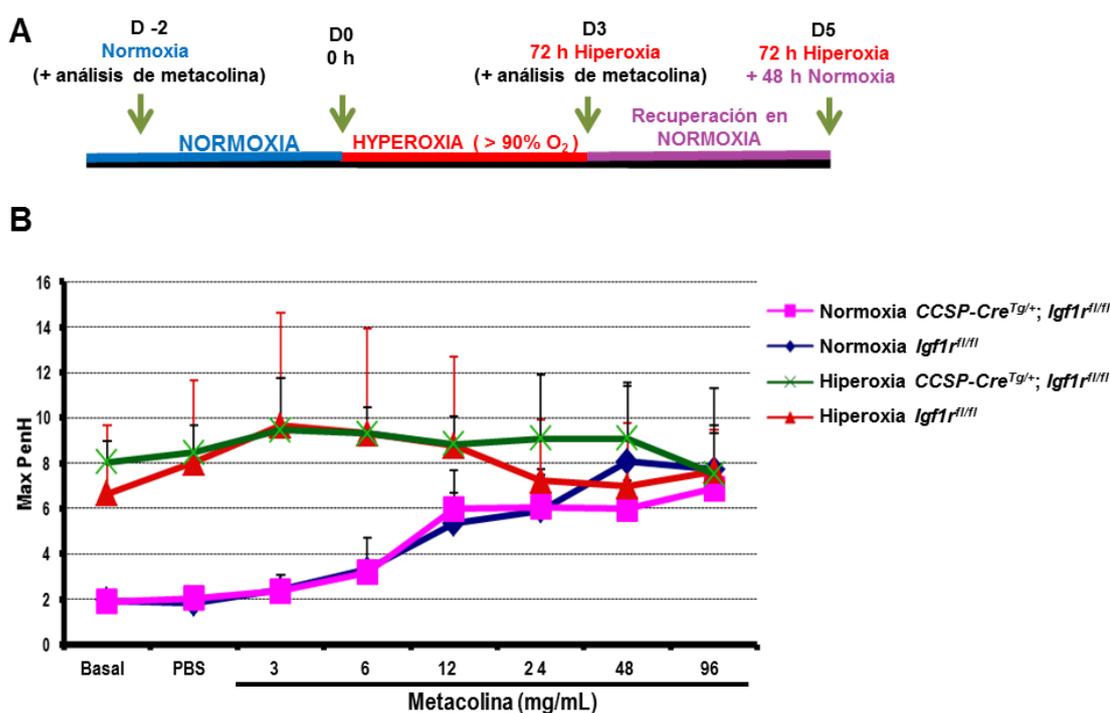
la expresión de IGF1R y su recuperación del daño se ve alterada o retrasada por la falta de este receptor.



**Figura 48. Expresión de IGF1R y CCSP en los bronquiolos terminales de mutantes condicionales *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* durante la regeneración pulmonar tras ablación con naftaleno.** Tinciones inmunohistoquímicas en secciones longitudinales de bronquiolos terminales de pulmones adultos de 3 meses de animales control (*Igf1r<sup>fl/fl</sup>*) (tríadas de paneles de la izquierda) y bronquiolos afectados en los mutantes condicionales (*CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*) (tríadas de paneles de la derecha). Se realizaron tinciones para IGF1R (panel de la izquierda, en verde), CCSP (panel central, en rojo) y la superposición de estas imágenes con la tinción de DAPI (panel de la derecha, en azul), en diferentes días después de la administración del naftaleno (D0, sin naftaleno; D3, tres días después del naftaleno; D7, 7 días después; D14, 14 días después). **A-B.** Antes de la administración de naftaleno (D0) la expresión de IGF1R es abundante en todo el epitelio bronquiolar, colocalizando con la de CCSP en las células de Clara en ratones control (flechas de colores) (A), mientras que en los ratones mutantes condicionales se aprecian zonas con un descenso en la expresión de IGF1R en el epitelio bronquiolar distal, concomitante al descenso de la intensidad para CCSP (segmento  $\Delta$ ) (B). En estos animales se observa un grupo de células con tinción IGF1R<sup>+</sup>/CCSP<sup>+</sup>, al final del bronquiolo terminal (flechas de colores). **C-D.** A los tres días (D3) se aprecia una reducción de la expresión de IGF1R y CCSP en todo el epitelio bronquiolar con excepción de grupos de células residuales con tinción para IGF1R y CCSP en ambos genotipos (flechas de colores). **E-F.** A los siete días de recuperación tras el naftaleno (D7) se observa un aumento en la proporción de células IGF1R<sup>+</sup> y CCSP<sup>+</sup> (flechas de colores) en ambos genotipos, aunque en el doble mutante se aprecian amplias zonas del epitelio con células IGF1R<sup>-</sup>/CCSP<sup>-</sup> (segmento  $\Delta$ ) (F). **G-H.** Tras 14 días de la dosis de naftaleno, los ratones control han recuperado casi completamente la expresión normal de IGF1R y CCSP (G), mientras que los ratones mutantes todavía mantienen segmentos del epitelio en los que no se han recuperado esta expresión (segmento  $\Delta$ ) (H). al, zona alveolar; bt, bronquiolo terminal. Barras de escala: 50  $\mu$ m.

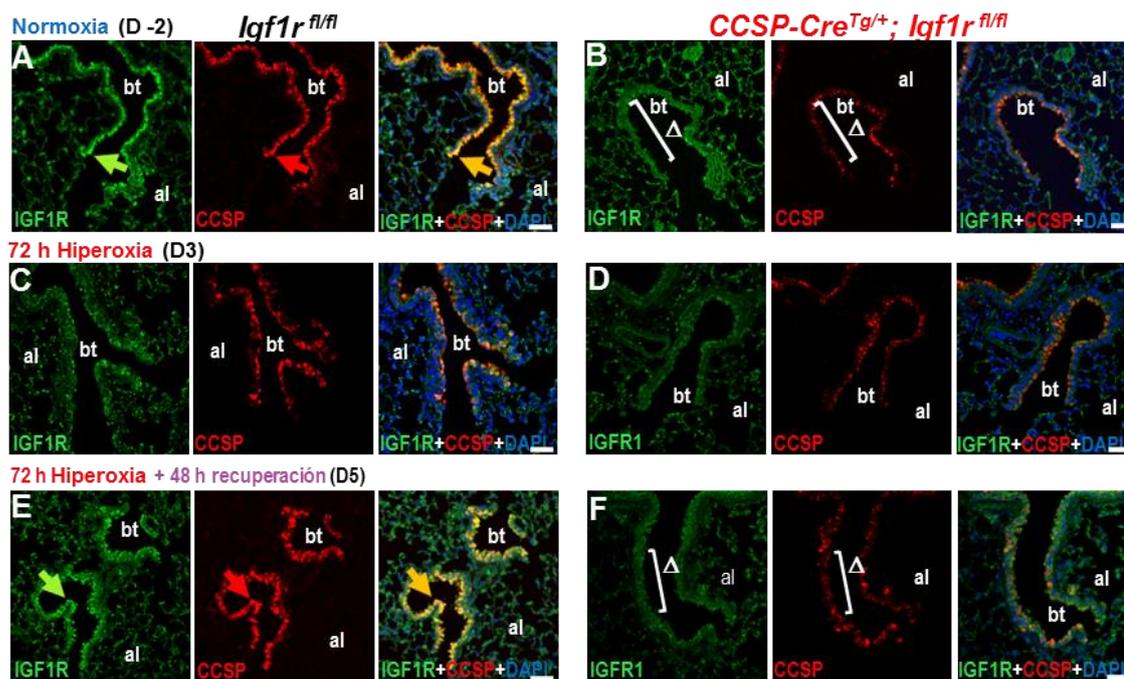
### 5.1.2. La hiperoxia altera la regeneración de las células de Clara que carecen de IGF1R

Para determinar si la delección de IGF1R en las células de Clara afectaba a la función respiratoria (ventilación pulmonar) de los ratones control y mutantes condicionales, éstos se sometieron a un análisis no invasivo de la capacidad respiratoria en un pletismógrafo bien en condiciones normales (Normoxia), bien después de respirar 72h en una atmósfera hiperoxia, y tras instilación con concentraciones crecientes del fármaco broncoconstrictor metacolina. El protocolo de tratamiento y análisis de los ratones se muestra en la Figura 49A. Los resultados de la determinación del valor de la PenH máxima en ambos genotipos se representa en la Figura 49B. No se observan diferencias entre genotipos, aunque los ratones sometidos a hiperoxia presentan una mayor dificultad de ventilación respiratoria. Independientemente del genotipo el tratamiento con metacolina de los ratones en normoxia genera dificultad respiratoria creciente (valores de PenH máxima), hasta alcanzar valores cercanos a los de los animales en hiperoxia, cuyos valores de PenH máxima se mantienen homólogos en atmosfera normal o con presencia creciente de metacolina (Figura 49B).



**Figura 49. Análisis funcional no invasivo de ventilación (función respiratoria) expresado como PenH máxima.** **A.** Procedimiento experimental del tratamiento en hiperoxia: hiperoxia durante 72 h y posterior recuperación durante 48 h en normoxia; y momento del análisis de la función respiratoria en D - 2, D3 y D5. **B.** Determinación de la capacidad de respuesta ventilatoria de las vías aéreas sensibilizadas con metacolina. Los tests de la función pulmonar fueron realizados en ratones control *Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, y mutantes condicionales *CCSP-Cre<sup>Tg+/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* bien en animales expuestos a concentraciones normales (Normoxia), o bien después de respirar 72 h en una atmósfera hiperóxica (> 90% O<sub>2</sub>) (Hiperoxia). En cada animal las medidas fueron realizadas en condiciones basales o tras nebulización de PBS con concentraciones crecientes del broncoconstrictor metacolina. No se encontraron diferencias significativas en Max PenH entre los genotipos en ninguna de las condiciones. Los valores se representan como la media ± error típico (n = 3 por condición).

Dado que la hiperoxia afecta a la homeostasis de las células epiteliales del epitelio respiratorio, se determinó tras el daño en hiperoxia, si la falta de IGF1R en las células de Clara afectaba a los animales mutantes condicionales *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>*. Para ello se determinó la expresión de IGF1R y CCSP en los bronquiolos terminales de estos ratones después de ser sometidos a hiperoxia (D3) y tras su recuperación en atmósfera normal (D5). De nuevo en condiciones normales se aprecia el mosaicismo de la ausencia de IGF1R en zonas del epitelio de los bronquiolos terminales de los ratones doble transgénicos *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>*, que en paralelo sufren una reducción en la expresión de CCSP (Figura 50A-B). Después del tratamiento de los ratones durante 72 h en hiperoxia (D3), se aprecia una reducción en la expresión de IGF1R en algunos bronquiolos terminales tanto en los ratones control, como en los *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>*, que conlleva a una reducción paralela de CCSP (Figura 50C-D). Al dejar a los ratones recuperarse en condiciones normales de oxígeno (Normoxia) durante 48 h, mientras los ratones control recuperan el patrón de expresión de IGF1R y CCSP en el epitelio de los bronquiolos terminales, los animales *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>* no recuperan esta expresión en algunas zonas del epitelio de algunos bronquiolos terminales, dependiendo de la zona pulmonar o del animal estudiado (Figura 50E-F). Estos resultados corroboran que la delección de IGF1R ocurre de forma aleatoria “en mosaico” en las células de Clara, y que en las zonas afectadas la expresión de CCSP se va reduciendo durante la fase de recuperación tras el daño en hiperoxia.



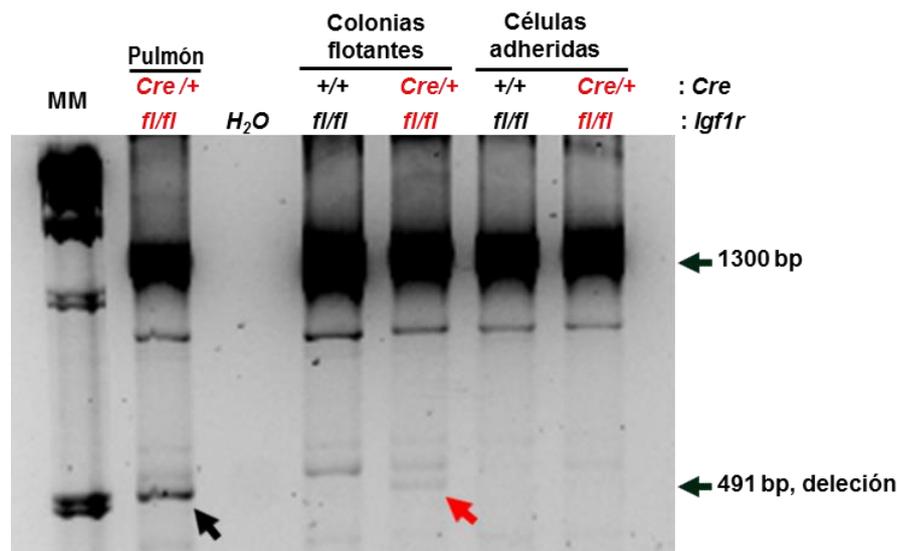
**Figura 50.** Alteración de la expresión de IGF1R y CCSP en las células de Clara de los pulmones de los ratones *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* y *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* después del tratamiento en hiperoxia. Co-inmuntinciones en secciones de bronquiolos terminales de pulmones de ratones adultos de 3 meses con genotipo *Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, (triadas de paneles de la izquierda) y de genotipo *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* (triadas de paneles de la derecha) para determinar IGF1R (panel de la izquierda, en verde), CCSP (panel central, en rojo) y la superposición de estas imágenes con la tinción de DAPI (panel de la derecha, en azul), en tres condiciones de estudio: antes de la hiperoxia (condición de Normoxia), después de la hiperoxia, y durante la recuperación post-hiperoxia. **A-B.** En normoxia (D -2) se observa una expresión abundante de IGF1R colocalizando con la de CCSP en las células de Clara de los ratones control (flechas de colores) (A) mientras que en los ratones mutantes condicionales existen zonas del epitelio terminal con carencia de IGF1R y reducción de la expresión de CCSP (segmento  $\Delta$ ) (B). **C-D.** Después de 72 h en hiperoxia se aprecia un descenso general en la expresión de IGF1R y CCSP en las células de Clara en el epitelio terminal de ambos genotipos, pero es más notable en los dobles mutantes. **E-F.** A las 48 h de recuperación tras el tratamiento en hiperoxia se aprecia una completa recuperación de la expresión de IGF1R y CCSP en toda la extensión del epitelio terminal en los animales control (flechas de colores) (E) mientras que en los mutantes se mantienen grandes segmentos del epitelio en los que no se ha recuperado esta expresión (segmento  $\Delta$ ) (F). al, zona alveolar; bt, bronquiolo terminal. Barras de escala: 50  $\mu$ m.

### 5.1.3. Aumento en el contenido de células indiferenciadas en las colonias de células madre de ratones *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* cultivadas *in vitro*

Con el fin de determinar si IGF1R está implicado en la regeneración de los precursores de las células epiteliales de pulmón (células madre, *stem*), los pulmones de *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* y los mutantes condicionales, *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* se disgregaron a nivel celular usando colagenasa y medio mecánicos para seleccionar, aislar y amplificar *in vitro* las células madre epiteliales pulmonares. Los cultivos de estas células fueron mantenidas durante once días siguiendo, con algunas modificaciones, el protocolo usado en el laboratorio del Dr. Juan José Ventura en Cambridge (Ventura et al., 2007) (Apartado 5.4. de Material y Métodos). Las células conseguidas por la disgregación del pulmón de los ratones de ambos genotipos crecen muy bien hasta la primera semana, con una alta tasa de proliferación los primeros 4-5 días, que exige pasarlas al principio tras 24 h y después cada 48 h. Las células crecen pegadas a la placa, en colonias de tipo stem cells, sobre todo encima o alrededor de fibroblastos presentes

en el cultivo. A partir del día 3 se empiezan a formar unas colonias redondas muy poco adheridas a la placa y que tienden a desprenderse en formas esferoides. Las células que las forman están fuertemente adheridas unas a otras. Estas colonias siguen creciendo en tamaño, algunas son imposibles de disgregar mecánicamente y requieren la acción de la acutasa (necesaria en el día 6 de cultivo). Estas colonias esferoides siguen formándose muy activamente hasta el día 6-7, para después disminuir progresivamente la formación de menos colonias, a partir de las células todavía adheridas al fondo (Figura 52A y 52D). A partir de este momento en el cultivo se observan menos células adheridas al sustrato, tanto fibroblastos como de células esféricas con fenotipo célula madre adherido. También se reduce progresivamente la producción y el crecimiento de las colonias esferoides flotantes. A partir del día 5-6 las más grandes parece que empiezan a sufrir muerte celular probablemente por apoptosis (no determinado) porque en su superficie empiezan a verse células que protruyen al exterior y que presentan vesículas citoplasmáticas. Este efecto resulta en una reducción de su tamaño y eventualmente en su desaparición total del cultivo después de tres semanas. Hasta aproximadamente el día 10-11 del cultivo siguen formándose activamente nuevas colonias (Figura 52B, C y 52E, F), pero a partir de este momento poco a poco el número y tamaño de las esferas con células madre desciende progresivamente, hasta que finalmente acaban por desaparecer a partir de los 20 días de cultivo. Dado que el número de colonias de células madre declina a partir del día 10-11 de cultivo, se decidió realizar un estudio de las células en el día 11.

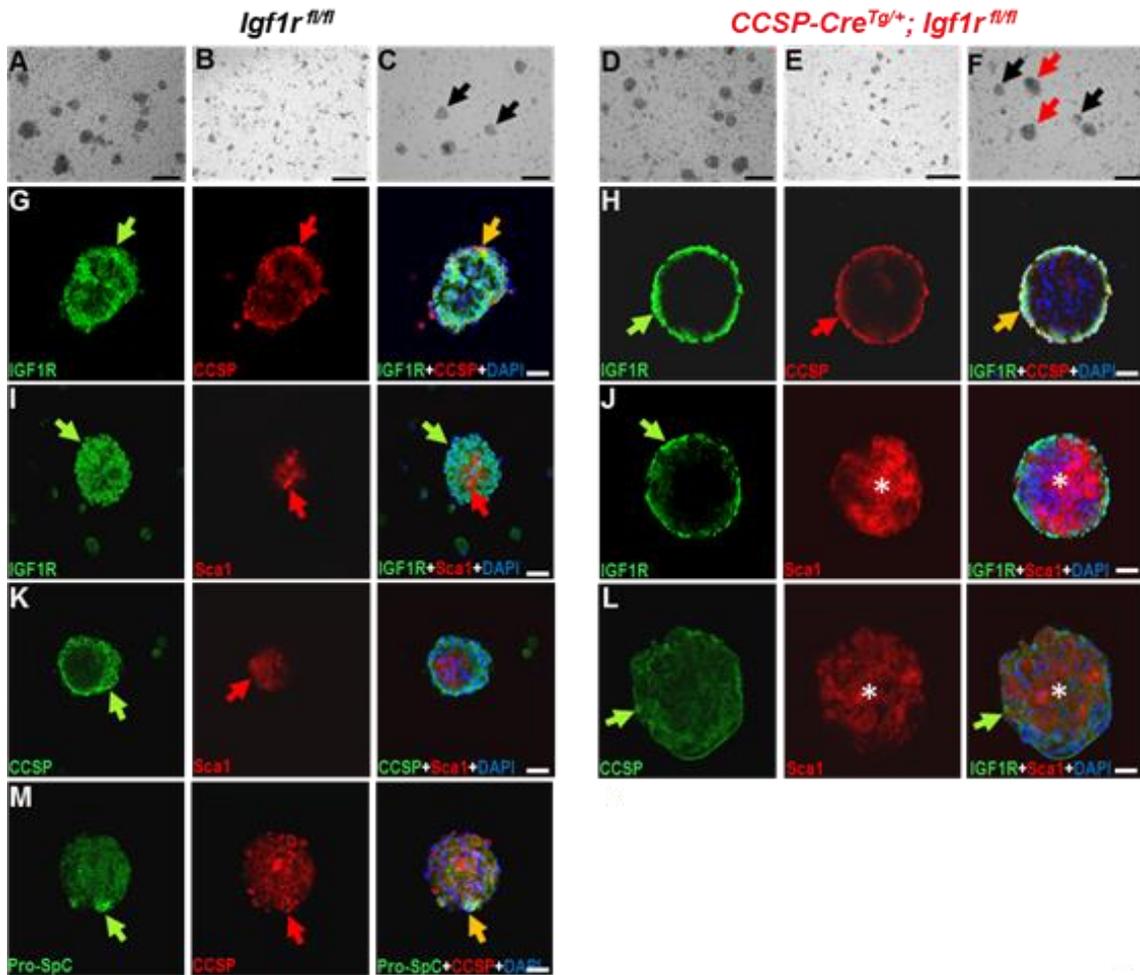
El análisis por PCR de la delección en el locus de *Igf1r* de las colonias de células madre en cultivo in vitro se muestra en la Figura 51. En los cultivos de ratones control no se detecta la banda correspondiente a la delección ni en las células de las colonias flotantes ni en las células adheridas a la placa. Sin embargo en los cultivos derivados de ratones mutantes condicionales *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* se observa claramente presencia de la delección de *Igf1r* en las células de las colonias flotantes recogidas del cultivo por lavado mecánico (flecha roja en Figura 51), pero no en las células adheridas a la placa lisadas in situ para obtener ADN. Éstas últimas se corresponden mayoritariamente a células mesenquimales, donde apenas se observan presencia de colonias de células madre derivadas de los mutantes. Este resultado demuestra que en las colonias de células madre de los cultivos derivados de los pulmones *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* ocurre la delección del exón 3 de *Igf1r*.



**Figura 51. Detección de la delección en el locus *Igf1r*<sup>fl/fl</sup> en cultivos *in vitro* de colonias de células madre pulmonares derivadas de ratones mutantes *CCSP-Cre*<sup>Tg/+</sup>; *Igf1r*<sup>fl/fl</sup> mediante PCR.** Imagen de un gel de agarosa teñido con Gel Red® en que se analizaron muestras por PCR de ADN de células madre derivadas de animales *Igf1r*<sup>fl/fl</sup> y doble mutantes *CCSP-Cre*<sup>Tg/+</sup>; *Igf1r*<sup>fl/fl</sup> para determinar la delección en el locus *Igf1r* en ADNs genómicos de las células madre pulmonares derivadas de ratones mutantes. Se aprecia que en el carril con ADN de colonias flotantes obtenidas de ratones mutantes condicionales aparece la banda de la delección (491 pb) (flecha roja), a la misma altura que el carril con ADN de pulmón de ratones con el mismo genotipo (flecha negra) usado como control.

La observación de las células madre por microfotografía de contraste de fases reveló que en los cultivos procedentes de pulmones de ratones control, las colonias poseían un tamaño medio uniforme alrededor de 150-200  $\mu\text{m}$  de diámetro. Morfológicamente todas las colonias de estos cultivos presentan una morfología irregular, con células proyectándose hacia el exterior de la superficie de la esfera, con apariencia de poca adherencia a la colonia (Figura 52C). Sin embargo, en los cultivos de los ratones doble transgénicos además de las colonias de células madre con apariencia similar a las descritas en los ratones control, se observan colonias de mayor tamaño, 250  $\mu\text{m}$  de diámetro, con apariencia compacta y superficie exterior más regular y lisa, que suponen con un tercio del total de colonias (Figura 52F, flechas rojas).

El análisis inmunohistoquímico de estos dos genotipos de colonias lavadas mecánicamente de la placa de cultivo, adheridas a un porta objeto mediante citospin e inmunoteñidas con marcadores de identidad celular revela diferencias significativas entre ellas (Figura 52G-M).



**Figura 52. Morfología e inmunotinción de colonias de células madre pulmonares derivadas de ratones mutantes  $CCSP-Cre^{Tg/+}; Igf1r^{fl/fl}$  cultivadas *in vitro*.** **A-F.** Microfotografías de contraste de fases de los cultivos de colonias de células madre epiteliales de pulmón derivadas de los ratones control y mutantes. Se observa que las colonias de los cultivos de ratones control poseen un tamaño homogéneo (flechas negras en C), mientras que en los cultivos procedentes de ratones doble mutantes entre las colonias normales (flechas negras), con forma y tamaño como las observadas en (A), aparecen algunas colonias de mayor tamaño (flechas rojas) (F). **G-M.** Microfotografías confocales de inmunotinciones dobles con imágenes para los antígenos indicados: IGF1R, CCSP, Pro-SPC, y Sca-1 (flechas de color) (paneles de la izquierda y centrales) e imágenes superpuestas incluyendo DAPI (panel derecho, en azul). Las imágenes de las colonias de ratones  $CCSP-Cre^{Tg/+}; Igf1r^{fl/fl}$  (H, J y L) corresponden a las colonias grandes observadas en F (flechas rojas), aunque también aparecen en el cultivo colonias pequeñas similares a las de los ratones control (mostradas en G, I, K y M). Las colonias de ratones  $Igf1r^{fl/fl}$  son homogéneamente de menor tamaño y con una forma más regular (rugosa), mientras que las colonias grandes seleccionadas de los cultivos de pulmones doble mutantes poseen una superficie más lisa. **G-H.** Co-tinción con IGF1R y CCSP. Las colonias de los ratones control poseen una mayor proporción de células IGF1R<sup>+</sup>, con algunas de ellas que se co-tiñen con CCSP (flechas de colores) (G). En las colonias de los ratones doble mutantes la tinción de IGF1R aparece exclusivamente en las células de la superficie de la colonia, y sólo algunas de ellas también se co-tiñen con CCSP (flechas de colores) (H). **I-J.** Co-tinción para IGF1R (flecha verde) y Sca1 (flecha roja). En las colonias grandes de los animales mutantes condicionales prácticamente todas las células centrales son Sca1<sup>+</sup> (asterisco), y solo las de la monocapa externa son Sca1<sup>-</sup>, y sí se tiñen con IGF1R (flecha verde) (J). **K-L.** Co-inmunotinciones para CCSP (flecha verde) y Sca1 (flecha roja). En las colonias de los animales control la proporción de células Sca1<sup>+</sup> es mucho más baja (K) que en las colonias grandes de los ratones mutantes condicionales (asterisco), donde no se aprecian células que se co-tiñen con CCSP y Sca1 (L). **M.** Co-inmunotinción de Pro-SPC (verde) y CCSP (rojo). En algunas colonias pequeñas se aprecian grupos de células Pro-SPC<sup>+</sup> (flecha verde) que también se tiñen para CCSP (flecha roja y naranja). Barra de escala: 200  $\mu$ m en A, C, D y F; 500  $\mu$ m en B y E; 50  $\mu$ m en G-M.

Se observa que las células de estas colonias expresan en diferente proporción, localización e intensidad marcadores de células epiteliales pulmonares (IGF1R, CCSP, Pro-SPC) y marcadores epiteliales de células madre (Sca1). En las colonias de ratones control el IGF1R se expresa en células de la parte exterior de la colonia y en todo el soma celular, colocalizando con marcadores de tipo epitelial como CCSP (Figura 52G), pero no colocaliza con células con características de células madre que expresan Sca1 y ocupan el centro de la colonia (Figura 52I). La co-tinción de estas colonias con CCSP y Sca1 demuestra de nuevo que la expresión de estos marcadores es excluyente con las células CCSP+ en la periferia de la colonia y las Sca1+ en el centro (figura 52K). También se observa que en la periferia de la colonia existen pequeños grupos de células que co-expresan CCSP y Pro-Spc (Figura 52M).

Este tipo de doble marcaje ha sido descrito en células de Clara variantes de los BADC y en células puntuales de zonas alveolares en los pulmones de ratones con capacidad de generar tanto células de Clara bronquiolares, como células alveolares AEC2 (Figura 3 de la Introducción) (Rawlins et al., 2009a; Rock and Hogan, 2011).

Las colonias de mayor tamaño observadas en los cultivos de pulmones *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>f/f</sup>* expresan IGF1R tan sólo en las células de la periferia de la colonia, colocalizando esporádicamente con algunas de las pocas células que también expresan CCSP (Figura 52H). En estas colonias IGF1R tampoco colocaliza con Sca1, que se expresa prácticamente en todas las células del interior de la colonia, (Figura 52J). De igual forma que ocurría en las colonias de los pulmones control, y como es de esperar, tampoco se observa colocalización de CCSP y Sca1 en ninguna de las colonias (figura 52HL). Además en este caso la presencia de células CCSP+ en la periferia de la colonia es muy escasa (Figura 52L).

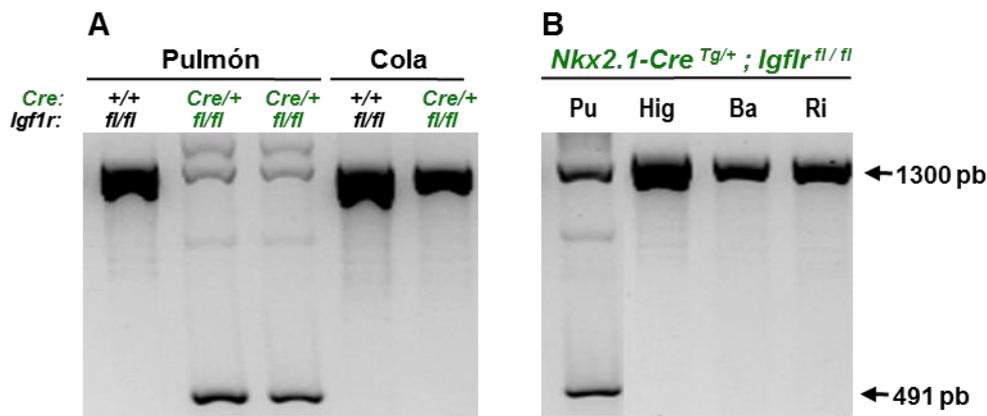
De estos resultados se concluye que existen colonias de células madre pulmonares “atípicas” y más grandes de lo normal en los cultivos derivados de los ratones mutantes condicionales de IGF1R en las células de Clara.

## 5.2. Generación y caracterización preliminar del fenotipo pulmonar en los ratones mutantes condicionales de IGF1R en todo el epitelio respiratorio

Con el objeto de corroborar el fenotipo pulmonar descrito en los animales *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>f/f</sup>*, y con la intención de aumentar la proporción de células epiteliales del pulmón con delección de *Igf1r*, se decidió generar una segunda línea de mutantes condicionales donde se expresase *Cre* en más tipos celulares del epitelio respiratorio. Para ello los animales homocigotos *Igf1r<sup>f/f</sup>* se cruzaron con ratones transgénicos hemocigotos *Nkx2.1-Cre* (Xu et al., 2008) que dirigen la expresión de *Cre* desde estadios tempranos del desarrollo (Tiozzo et al., 2009) (<http://jaxmice.jax.org/strain/008661.html>) a prácticamente todas las células del epitelio respiratorio y que se describe en detalle en el apartado 3.3. de la Introducción. De los cruces se generaron los 4 genotipos de ratones (Figura 23 de Material y Métodos), entre ellos los

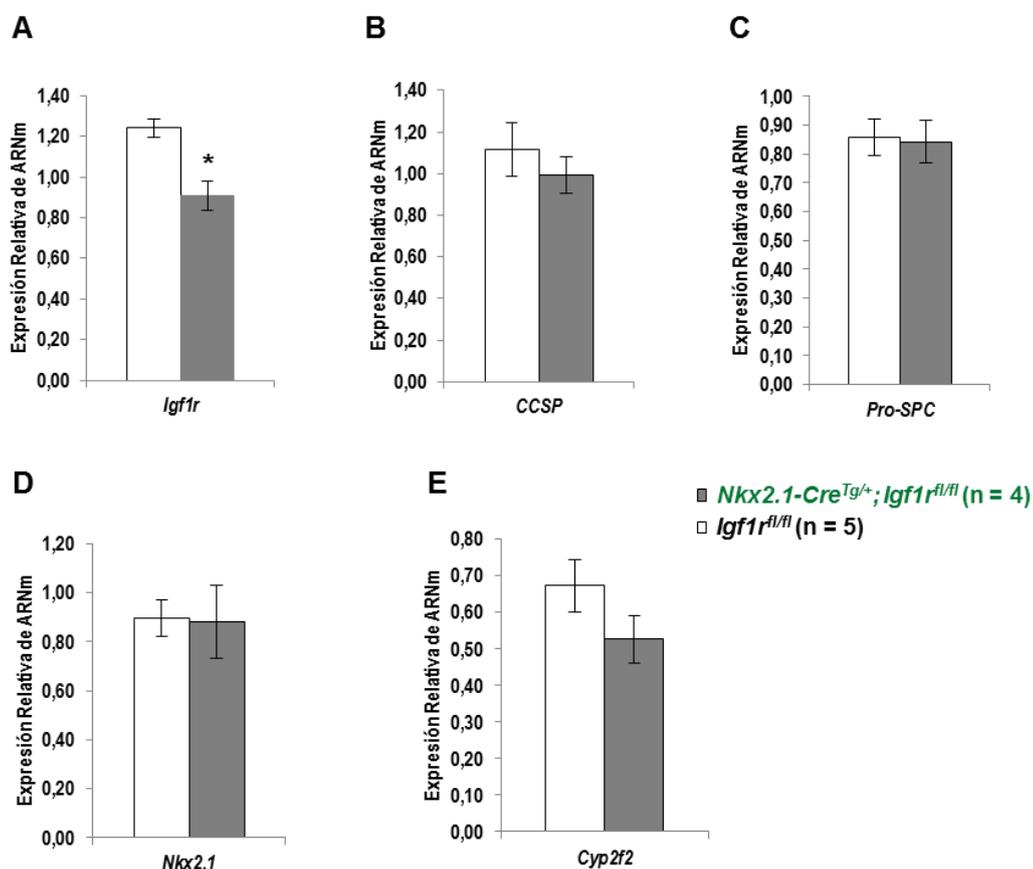
mutantes condicionales de *Igf1r* denominados *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* (Figura 24 de Material y Métodos).

Para comprobar que la delección ocurre a nivel genómico en el locus *Igf1r* de forma específica en el pulmón, el ADN genómico del pulmón y de la cola de ratones mutantes y control *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* se analizaron por PCR para determinar la delección de las secuencias floxeadas en *Igf1r* según se indica en Material y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura 53A, donde se observa que la delección ocurre exclusivamente en el ADN de pulmón de los ratones *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, pero no se observa ni en el ADN genómico de la cola de estos ratones, ni tampoco en ningún de los tejidos en los animales control. Aunque la intensidad de las bandas amplificadas correspondientes a la forma alélica delecionada (491 pb) y sin delección “floxeada” (1300 pb) no son proporcionales a la cantidad de ADN genómico existente. Se aprecia que la banda de la delección es más intensa que la de su forma alélica floxeada (Figura 53A). El análisis de la delección también se realizó en ADN genómico de otros tejidos como hígado, bazo y riñón de ratones *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* en paralelo al del pulmón, sólo se observó presencia de delección de *Igf1r* en el tejido pulmonar (Figura 53B). También se ha observado la presencia de delección en otros tejidos de estos ratones en donde se sabe que los animales *Nkx2.1-Cre* expresan *Cre* aparte del pulmón, como en el cerebro y en tiroides (<http://jaxmice.jax.org/strain/008661.html>) (Xu et al., 2008).



**Figura 53. Detección de la delección en el locus *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* de ratones mutantes condicionales *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* mediante PCR.** Imágenes de geles de agarosa teñidos con Gel Red<sup>®</sup> donde se analizaron muestras de PCR para determinar la delección en el locus *Igf1r* de los mutantes *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* usando ADN genómico de los tejidos especificados. **A.** Resultado de la PCR en ADNs de pulmón y cola de animales con diferentes genotipos. El fragmento correspondiente a la delección (491 pb) sólo se observa en el canal del ADN de pulmón de los ratones doble transgénicos *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, pero no en el de las colas. **B.** Análisis por PCR de ADNs genómicos de los tejidos especificados de ratones mutantes condicionales *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*. La banda de la delección sólo aparece en el pulmón (Pu), pero no en otros tejidos analizados. Nótese que en todos los canales, incluso en los que poseen la banda de delección aparece amplificación de ADN sin sufrir la delección (banda de 1300 pb). Pu, pulmón; Hi, hígado; Ba, bazo; Ri, riñón.

El análisis por qRT-PCR de los niveles de expresión relativa de *Igf1r* en los pulmones de los ratones *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* eran significativamente más bajos que en los animales control (Figura 54A). Dado que en el pulmón de ratones adultos las células de Clara de los bronquiolos terminales y las células AEC2 del epitelio alveolar están supuestamente alteradas en *Igf1r* (Figuras 41, 42 y 43), también se determinaron los niveles de ARNm de estos genes: *CCSP* y *Cyp2f2* de las células de Clara, y *SPC* de las AEC2, y también la del gen *Nkx2.1*, por ser su promotor, el usado por la recombinasa Cre para dirigir su expresión. Sin embargo, en ninguno de estos genes se observan cambios significativos en los niveles de expresión en los pulmones de los ratones *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* (Figura 54B-E), aunque en todos ellos los niveles medios son inferiores a los de los animales control, observándose las mayores diferencias en *CCSP* y sobre todo en *Cyp2f2* (Figura 54B y 54E).

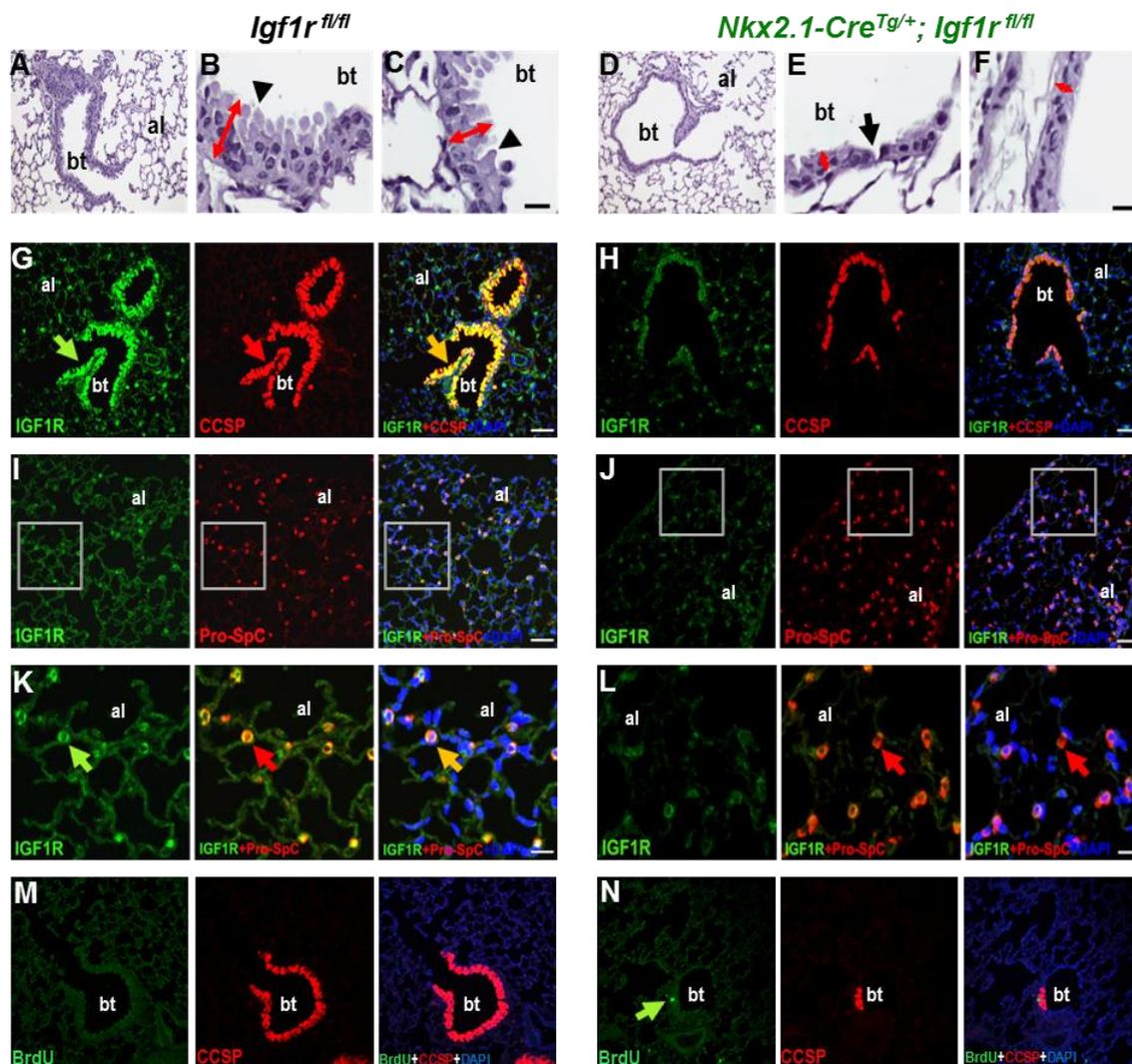


**Figura 54. Niveles de expresión de ARNm de *Igf1r*, *CCSP*, *Pro-SPC*, *Nkx2.1* y *Cyp2f2* en ratones mutantes *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*. Las gráficas representan los datos de qRT-PCR para los genes usando ARN obtenido de pulmones de ratones de ambos genotipos. El gen *Rn18s* (ARN ribosómico 18S) se ha usado como control (n = 5 para los controles y n = 4 para los mutantes condicionales). Perfil de expresión de *Igf1r* (A), *CCSP* (B), *Pro-SPC* (C), *Nkx2.1* (D) y *Cyp2f2* (E). No se observan diferencias en los niveles de *CCSP*, *Pro-SPC*, *Nkx2.1* y *Cyp2f2*, salvo para *Igf1r* en los ratones mutantes. Los datos corresponden a la media ± error típico. (\*  $p < 0,05$  Mann Whitney U-Test).**

El estudio de la histología pulmonar de estos mutantes reveló un fenotipo similar al observado en el epitelio de los bronquiolos terminales de los ratones *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>*, pero mucho más acusado.

Frente a la normal histología del epitelio bronquiolar de los ratones *Igf1<sup>fl/fl</sup>*, grueso, con continuidad de núcleos dispuestos pseudoestratificadamente y con proyecciones apicales en forma de cúpula de las células de Clara (Figura 55A-C), en los mutantes condicionales *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>* el epitelio bronquiolar terminal es más plano, sin las proyecciones cupuladas típicas de las células de Clara, con núcleos dispuestos más separados a la misma altura e incluso en zonas puntuales parece que se pierden las células de Clara, formándose discontinuidades (Figura 55D-E).

Las inmunotinciones para IGF1R de los bronquiolos terminales en los animales control (Figura 55G) muestran intensa tinción frente a ausencia de tinción en los animales mutantes (Figura 55H). Además en estos animales la tinción para CCSP en las células de Clara se aprecia muy reducida (Figura 55H, panel central). En la zona alveolar también se aprecia una reducción de la expresión generalizada de IGF1R en los mutantes (Figura 55J) comparada con los pulmones control (Figura 55I). A mayor magnificación se aprecia que la reducción de la tinción de IGF1R se corresponde a las células AEC2 que se siguen teñiendo con intensidad normal para Pro-SPC (Figura 55K-L).



**Figura 55. Efecto de la delección condicional de IGF1R en el epitelio pulmonar en los ratones adultos  $Nkx2.1-Cre^{Tg/+}; Igf1r^{fl/fl}$ .** Alteraciones en la morfología y en la expresión génica en el epitelio bronquiolar terminal de los ratones control  $Igf1r^{fl/fl}$  y mutantes condicionales  $Nkx2.1-Cre^{Tg/+}; Igf1r^{fl/fl}$ . **A-F.** Tinciones con H&E mostrando alteraciones histológicas en el epitelio bronquiolar terminal. El bronquiolo terminal de los ratones control muestra un epitelio relativamente alto (flechas rojas) y continuo, con las cúpulas de secreción de las células de Clara muy evidentes (puntas de flecha negras) (A-C). En los ratones mutantes condicionales el epitelio de los bronquiolos terminales es más bajo, y con estrechamientos o falta de células puntuales (flecha negra) (D-E). **G-H.** Imágenes confocales de co-tinciones en el epitelio de bronquiolos terminales para IGF1R (panel de la izquierda, en verde), CCSP en células de Clara (panel central, en rojo) y la superposición de las imágenes anteriores con la tinción nuclear con DAPI (panel de la derecha, en azul). Los ratones control expresan IGF1R en el epitelio bronquiolar (flecha verde) que colocaliza con la expresión de CCSP (flecha roja y naranja) (G). En los bronquiolos de los ratones mutantes condicionales no se aprecia expresión de IGF1R y la tinción para CCSP está más reducida (H). **I-L.** Co-inmunotinción para IGF1R y Pro-SpC en la zona alveolar. Imágenes tomadas a baja magnificación (I-J). En K-L se presenta a mayor magnificación la zona de los recuadros en I-J. En las imágenes de los ratones control (I, K) se aprecia una tinción localizada para IGF1R en la zona alveolar que en muchos casos colocaliza con Pro-SpC en las células AEC2 (flecha roja). En los ratones mutantes condicionales hay células Pro-SpC<sup>+</sup> sin expresión de IGF1R en las células AEC2 de la zona alveolar (flechas roja L). **M-N.** Co-tinción para BrdU (en verde, flecha verde) y CCSP (en rojo) en el bronquiolo terminal de ratones ( $Igf1r^{fl/fl}$ ) (M) y de ratones mutantes condicionales ( $Nkx2.1^{Tg/+}; Igf1r^{fl/fl}$ ) (N). al, zona alveolar; bt, bronquiolo terminal. Barras de escala: 20  $\mu$ m en A-F; 50  $\mu$ m, G-J y 17  $\mu$ m en K-L.

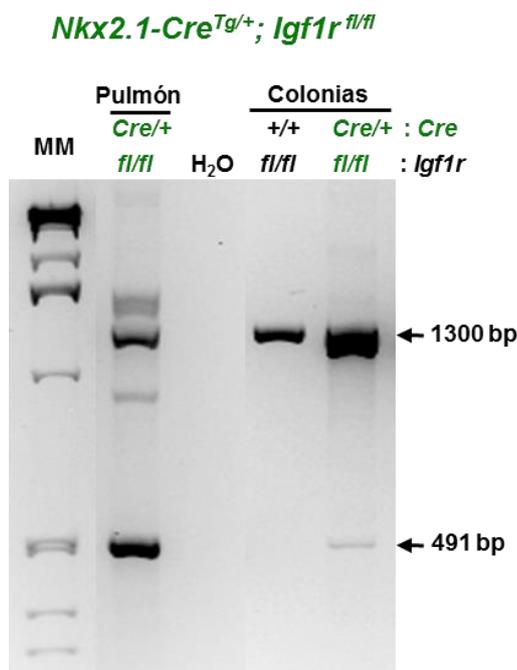
Con objeto de determinar si la delección de *Igf1r* en los pulmones  $Nkx2.1-Cre^{Tg/+}; Igf1r^{fl/fl}$  afectaba a la proliferación celular del epitelio de los bronquiolos terminales se realizó

inmunotinciones para BrdU en secciones de pulmón y las imágenes representativas de los dos genotipos se muestran en la Figura (55M-N). Un recuento preliminar del número de células marcadas muestra un aumento considerable aunque no sea estadísticamente significativo de las células BrdU<sup>+</sup> en el epitelio bronquiolar terminal de los ratones mutantes condicionales (Tabla 9).

<b>Línea</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Células BrdU<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup></b>
<i>Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup></i>	<i>Igf1r<sup>fl/fl</sup></i>	2,78
	<i>Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup></i>	3,92

### **5.2.1. Aumento de células indiferenciadas en las colonias de células madre de los ratones *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* cultivadas *in vitro***

Con el objetivo de determinar si *Igf1r* está implicado en la generación de los precursores de las células epiteliales del pulmón (células madre o *stem*), los pulmones de los ratones adultos de los dos genotipos se disgregaron y mantuvieron *in vitro* en un medio de cultivo que selecciona la supervivencia y proliferación de células madre epiteliales pulmonares para generar colonias redondeadas que crecen semiflotando. Tanto las colonias de células madre normales como las obtenidas de los pulmones mutantes condicionales crecen bien en cultivo, aunque con diferencias apreciables. La determinación de la delección de los segmentos floxeados en *Igf1r* demostró que en el ADN genómico de colonias de células madre mutantes condicionales se ha producido la delección, mientras que ésta no se observa en el ADN genómico obtenido de las colonias derivadas de pulmones control (Figura 56).



**Figura 56. Detección de la delección en el locus *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* en cultivos *in vitro* de colonias de células madre pulmonares derivadas de ratones mutantes *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* mediante PCR. Imagen de un gel de agarosa teñido con Gel Red® en que se analizaron muestras de PCR para determinar la delección en el locus *Igf1r* en ADNs genómicos obtenidos de las colonias de células madre pulmonares derivadas de ratones mutantes. La banda de la delección (491 pb) se aprecia exclusivamente en el carril con ADN de colonias con genotipo *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*. Como control positivo de la PCR se ha usado ADN genómico de pulmón de un ratón mutante condicional *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*.**

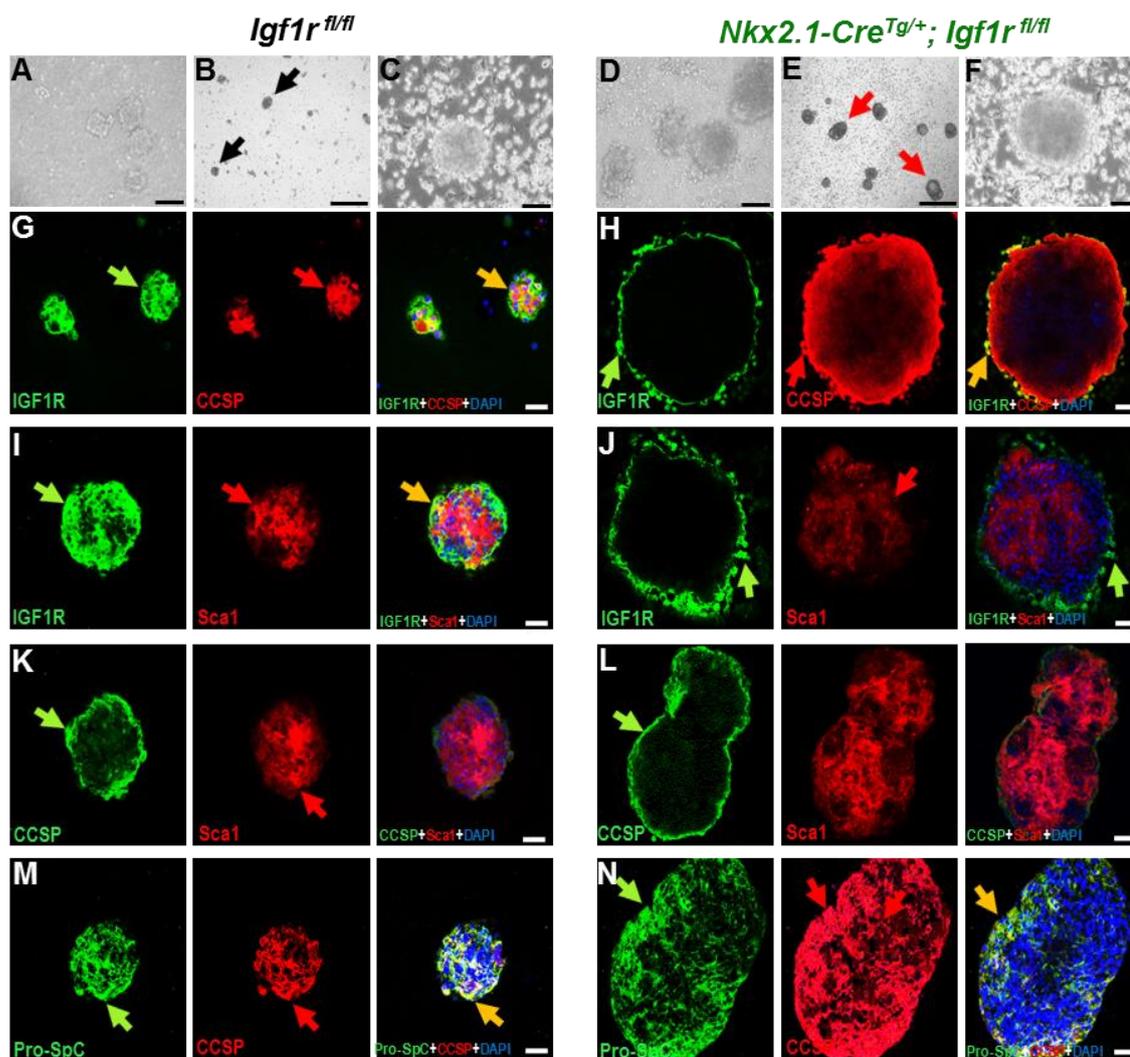
Del mismo modo que para la línea de transgénicos *CCSP<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* las colonias de células madre de los ratones *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* cultivadas *in vitro* se comportan de igual manera en crecimiento y mantenimiento. La observación microscópica de estas colonias demuestra que en el cultivo de células madre mutantes condicionales el número de colonias es mayor y en general son todas más grandes que en los cultivos de colonias de los pulmones control (Figura 57A-B).

En las tinciones inmunocitoquímicas se aprecia que las colonias derivadas de ratones *Igf1r<sup>fl/fl</sup>* son de menor tamaño y poseen una forma más irregular o rugosa, mientras que las colonias de los cultivos de pulmones mutantes condicionales son de mayor tamaño y poseen una superficie más lisa (Figura 57G-N), de forma similar a lo que ocurría en este tipo de cultivos de los animales de la línea de transgénicos *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*. Se observa que las células de estas colonias expresan en diferente proporción, localización e intensidad marcadores de células epiteliales pulmonares (IGF1R, CCSP, Pro-SPC) y marcadores epiteliales de células madre (Sca1). En las colonias de ratones control IGF1R se expresa en células de la parte exterior de la colonia y en todo el soma celular, colocalizando con marcadores de tipo epitelial como CCSP (Figura 57G), pero lo hace en muy pocas células madre que expresan Sca1 y ocupan el centro de la colonia (Figura 57I). La co-tinción de estas colonias con CCSP en la periferia de la colonia y Sca1 en el centro demuestra que la expresión

de estos marcadores es excluyente con las células CCSP<sup>+</sup> y las Sca1<sup>+</sup> (figura 57K). También se observa que en la periferia de la colonia existen grupos de células que co-expresan CCSP y Pro-SPC (figura 57M y 57N). Este tipo de doble marcaje ha sido descrito en células de Clara variantes de los BADJ y en células puntuales de zonas alveolares en los pulmones de ratones con capacidad de generar tanto células de Clara bronquiolares, como células alveolares AEC2 (Figura 3 de la Introducción) (Rawlins et al., 2009a; Rock and Hogan, 2011).

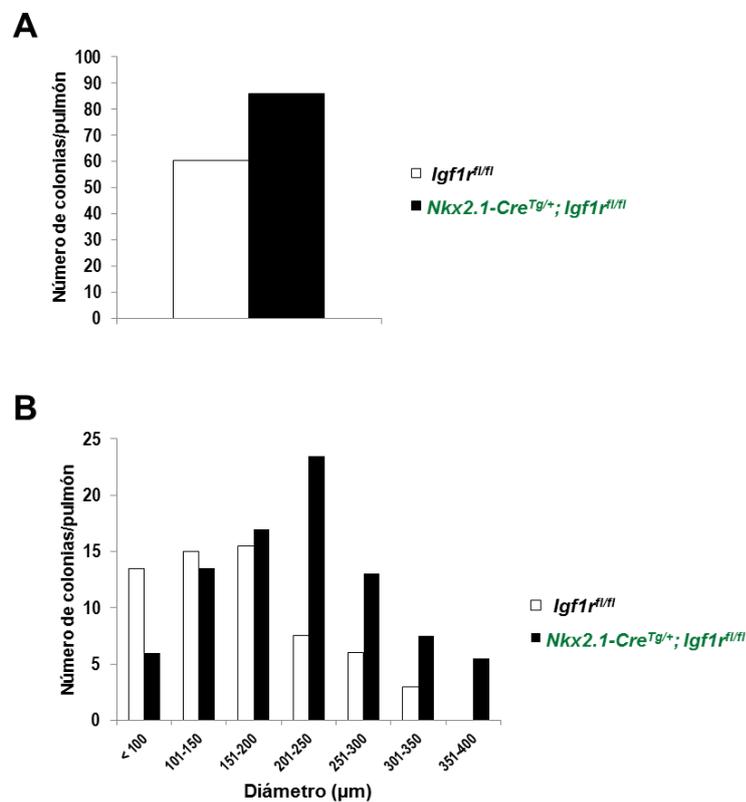
Las colonias grandes observadas en los cultivos de pulmones *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* expresan IGF1R tan sólo en la parte externa de la colonia, colocalizando esporádicamente con algunas células que también expresan CCSP (Figura 57H). En estas colonias IGF1R tampoco colocaliza con Sca1, que se expresa principalmente en las células del interior de la colonia, con excepción de las situadas en la periferia que son IGF1R<sup>+</sup> (Figura 57J). De igual forma que ocurría en las colonias de los pulmones control, tampoco se observa colocalización de CCSP y Sca1 en ninguna de las colonias (figura 57J).

De estos resultados se concluye que en los cultivos derivados de los ratones mutantes condicionales de *Igf1r* la proporción de colonias de células madre pulmonares “atípicas” y más grandes de lo normal, es mayor que en la línea de mutantes condicionales *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*.



**Figura 57. Morfología e inmunotinción de colonias de células madre pulmonares derivadas de ratones mutantes *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>* cultivadas *in vitro*.** A-F. Microfotografías de contraste de fases de colonias de células madre epiteliales derivadas de pulmones de los ratones control *Igf1<sup>fl/fl</sup>* y mutantes condicionales *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>*. Las colonias de ratones control tienen tamaño más reducido (flechas negras en B) que las colonias de los cultivos procedentes de ratones mutantes condicionales (flechas rojas en E). G-N. Microfotografías confocales de colonias con inmunotinciones dobles para los antígenos indicados: IGF1R, CCSP y Pro-SPC en verde (paneles de la izquierda), y CCSP y Sca-1 en rojo (paneles centrales), y superposición de las imágenes anteriores con la tinción nuclear con DAPI (panel derecho, en azul). G-H. Co-tinción con IGF1R y CCSP. Las colonias de los ratones control poseen alta proporción de células IGF1R<sup>+</sup>, y muchas de ellas se co-tiñen con CCSP (flechas de colores) (G). En las colonias de los ratones mutantes condicionales la tinción de IGF1R aparece exclusivamente en la superficie de las células periféricas de la colonia. Mientras que la tinción para CCSP aparece con mayor extensión al interior de la colonia, por lo que muy pocas células se co-tiñen con IGF1R y CCSP (flechas de colores) (H). I-J. Co-tinción para IGF1R y Sca1. En las colonias de animales control se aprecian muchas células teñidas para IGF1R en la periferia y las células Sca1<sup>+</sup> se agrupan en el centro (I). Aunque la mayoría de las células IGF1R<sup>+</sup> son Sca1<sup>-</sup>, algunas de ellas co-expresan ambos marcadores (flechas de colores en I). Las colonias de animales mutantes condicionales sólo expresan IGF1R en las células de la monocapa externa (flechas verdes) y el resto son Sca1<sup>+</sup> (flechas rojas) (J). K-L. Co-inmunotinciones para CCSP y Sca1. En las colonias control la proporción de células Sca1<sup>+</sup> (flecha roja) es mucho más baja (K) que en las colonias grandes de los ratones mutantes (L). Nótese que en ambas colonias las células CCSP<sup>+</sup> están sobre todo en la periferia (flechas verdes). M-N. Co-inmunotinción de Pro-SPC y CCSP. En las colonias de ambos genotipos se aprecian grupos de células Pro-SPC<sup>+</sup> (flecha verde) que también se tiñen para CCSP (flecha roja y naranja). Barra de escala: 100  $\mu$ m en A, C, D y F; 500  $\mu$ m en B y E; 50  $\mu$ m en G-N.

Como se ha mencionado anteriormente la falta de IGF1R aumenta el tamaño y el número de las colonias con genotipo *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>*. Para corroborar estos datos procedimos a contar y medir las colonias de ambos genotipos en los citospins. En la Figura 58A se representa el número de colonias por pulmón de ratón para ambos genotipos obtenidos en un experimento. Se aprecia un mayor número de colonias en los cultivos derivados de los ratones mutantes condicionales *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>*. Al medir el diámetro de las colonias de ambos genotipos se apreció un mayor número de colonias con mayor diámetro en las colonias derivadas de los ratones *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>* (Figura 58B). Aunque estos resultados son provisionales podrían indicar que la delección de *Igf1r* en las células del epitelio además de aumentar el número de células indiferenciadas, estaría también implicado en aumento de proliferación y consecuente aumento del número y diámetro de las colonias de células madre en el modelo estudiado.



**Figura 58. Efecto de la delección de *Igf1r* sobre el tamaño de las colonias de células madre pulmonares de ratones *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>*.** Representación gráfica del número de colonias y su distribución por tamaños en un cultivo de 11 días de colonias de ratones control *Nkx2.1-Cre<sup>+/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>* y de mutantes condicionales *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>*. **A.** La gráfica representa el número de colonias por pulmón de ratón obtenidos en los citospins de los cultivos de los ratones control y mutantes condicionales. Se aprecia un mayor número de colonias en los ratones mutantes condicionales que en los ratones control. **B.** Distribución del número de colonias por tamaños en los ratones de ambos genotipos. En los ratones mutantes condicionales *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1<sup>fl/fl</sup>* se aprecia un mayor número de células con mayor diámetro. En cambio en los ratones control aumenta el número de colonias en rangos de diámetro menores.

## **DISCUSIÓN**



## 1. Expresión de los genes del sistema IGF/Ins en el pulmón de ratón: IGF1R aunque posee una expresión constitutiva, ésta es más alta en células del epitelio respiratorio

Antes de proceder al estudio funcional, se ha considerado oportuno evaluar la expresión de genes del sistema IGF/Ins en diferentes estadios del desarrollo del pulmón murino para poder entender mejor su funcionalidad en este órgano. Se analizó a nivel de ARN, y más en detalle, a nivel celular mediante tinciones inmunohistoquímicas la expresión de IGF1R e IGF2 en el pulmón prenatal, y de IGF1R, IGF1 e IGF2 en el pulmón adulto. Los perfiles de la expresión de ARNm de genes del sistema de IGF/Ins (*Igf1*, *Igf2*, *Igf1r*, *Igfbp2*, *InsrA* e *InsrB*) mediante qRT-PCR demuestran que todos los componentes analizados se expresan a lo largo del desarrollo del pulmón de ratón. Se aprecia que estos genes se expresan en todos los estadios analizados, salvo *Igf2* cuyos niveles son elevados en E16,5 y van decreciendo progresivamente hasta ser casi indetectable a partir del estadio P15, resultado que corrobora datos publicados donde se menciona que *Igf2* en condiciones normales no se expresa en estadios postnatales del ratón (Giannoukakis et al., 1993). Los niveles de *Igf1* son más elevados en los estadios tempranos del desarrollo, para descender significativamente a lo largo de la vida postnatal hasta los 3 meses, y todavía más a partir de esta edad. Este perfil de expresión es bastante similar al observado para los receptores analizados, *Igf1r*, *InsrA* e *InsrB*, aunque *Igf1r* muestra una expresión más constante con la edad. Estos resultados corroboran los observados por otros autores usando microarrays (Kho et al., 2009), y también son similares a los obtenidos por Nagata et al. mediante qRT-PCR para *Igf1*, *Igf2* e *Igf1r* en estadios embrionarios (Nagata et al., 2007), así como a los obtenidos para *Igf1* e *Igf2* en ratas mediante otras técnicas (Klempt et al., 1992; Wallen and Han, 1994). Llama la atención que el perfil de expresión de *Igfbp2* es casi complementario al de estos cinco genes, ya que su nivel de expresión es bajo hasta el nacimiento y sus mayores niveles se observan en los estadios postnatales. La presencia de ARNm de estos genes en diferentes niveles y con cambios dinámicos durante los diferentes estadios del desarrollo del pulmón sugiere una posible implicación funcional y diferencial durante el desarrollo pulmonar en el ratón.

El estudio inmunohistoquímico de la expresión de IGF1R confirma una expresión generalizada, casi ubicua de esta proteína en el pulmón (Retsch-Bogart et al., 1996), aunque hay algunos tipos celulares que claramente destacan por su contenido, y con un patrón muy similar tanto en el pulmón prenatal E18,5 como en el adulto. Los niveles más altos se aprecian en el músculo liso perivascular, destacando también su presencia en la mayoría de las células epiteliales pulmonares, sobre todo en las células de Clara de los bronquiolos terminales y en las AEC2 alveolares, pero también en la parte apical de las células ciliadas y en las células neuroendocrinas de los bronquiolos. Las únicas células epiteliales en donde no se aprecian niveles altos de IGF1R son las células AEC1. IGF1R también se encuentra en las células

endoteliales y en los macrófagos, cómo ya se había descrito previamente en el pulmón de pacientes humanos (Han et al., 2003; Krein et al., 2003).

La presencia de IGF2 en el pulmón prenatal se limita sobre todo a las células del epitelio bronquiolar, datos que coinciden con los publicados para embriones de rata (Wallen and Han, 1994). En este trabajo se describe una presencia ubicua de IGF1 en el pulmón adulto, aunque también destaca su presencia en el epitelio de los bronquiolos. En humanos, su expresión también es ubicua, realizando su presencia en las células mesenquimales y macrófagos de pulmones de pacientes con síndrome de distrés respiratorio (Krein et al., 2003).

La localización de los IGFs, y sobre todo la del receptor IGF1R como ejecutor autónomo celular de la actividad de sus ligandos, concuerda con las alteraciones generalizadas encontradas en los embriones y neonatos mutantes *Igf1r<sup>-/-</sup>* e *Igf1<sup>-/-</sup>*. Éstas son aquellas relacionadas sobre todo con la diferenciación del epitelio alveolar, del músculo liso, vascularización e inflamación en los pulmones embrionarios de los ratones *Igf1<sup>-/-</sup>* descritos aquí y por otros autores (Pichel et al., 2003; Moverare-Skrtic et al., 2009; Epaud et al., 2012; Pais, 2013). Además también concuerda con el fenotipo observado en las células de Clara de los bronquiolos terminales o de las células madre epiteliales de pulmones adultos de los ratones mutantes condicionales de *Igf1r* descritos en este trabajo.

## 2. Acción de IGF1 en el desarrollo y maduración del pulmón embrionario

Como se ha demostrado aquí y se ha publicado en trabajos previos, está claro que IGF1, a través de IGF1R, participa en el desarrollo del pulmón actuando sobre la diferenciación de múltiples tipos celulares ubicados en compartimentos pulmonares definidos, tales como el epitelio alveolar, mesénquima y endotelio vascular (Pichel et al., 2003; Moreno-Barriuso et al., 2006; Epaud et al., 2012). Durante la morfogénesis y maduración del pulmón embrionario diferentes genes con función reguladora, entre los que se incluyen factores de transcripción (Cardoso, 1995; Minoo et al., 1995; Kimura et al., 1996), factores de crecimiento (Korfhagen et al., 1994; Serra et al., 1994; Simonet et al., 1995; Zhou et al., 1996a) y/o receptores de factores de crecimiento (Peters et al., 1994; Miettinen et al., 1995; Sibilina and Wagner, 1995; Xu et al., 1998), ejercen un efecto positivo o negativo coordinado en la activación de otros genes que permiten el desarrollo normal del pulmón. Trabajos previos de nuestro grupo habían encontrado una serie de genes con expresión diferencial de sus ARNm mediante un análisis transcripcional usando *microarrays*. En esta Tesis se ha intentado corroborar las alteraciones en la expresión de algunos de estos genes seleccionados por sus propiedades reguladoras para poder validarlos como posibles genes diana de IGF1. La validación se ha realizado tanto en pulmones de ratones *Igf1<sup>-/-</sup>* *in vivo*, como en cultivos *in vitro*, bien en explantes de sus lóbulos pulmonares o mediante el cultivo de células mesenquimales obtenidas de los ratones mutantes o en líneas celulares de carcinomas de pulmón. En estos estudios también se

evaluaron cambios en los niveles de expresión de diferentes genes del sistema IGF/Ins, pero sobre todo de IGF1R. Estos resultados se discuten a continuación.

### **2.1 La deficiencia de IGF1 en los pulmones E18,5 causa alteración de la expresión de genes reguladores a nivel proteico, aumentando la expresión de Nfib y reduciendo la de Klf2, Egr1 y Ctgf**

En estudios previos de nuestro laboratorio sobre la caracterización del fenotipo pulmonar del ratón en el estadio E18,5 se había observado que la deficiencia de IGF1 durante la embriogénesis provoca una hipoplasia pulmonar prenatal desproporcionada, además de la presencia de membranas hialinas y colapso en los alveolos. También induce una deposición anómala generalizada de la matriz extracelular, reducción del músculo liso, alteraciones vasculares e inflamación pulmonar (Pais, 2013). Además éstos ratones presentaban reducciones en la expresión de factores de transcripción como Ttf1, Sp3, Foxf1a y Foxf2 en el periodo perinatal (Pichel et al., 2003; Moreno-Barriuso et al., 2006). Posteriormente, para profundizar en las causas de este fenotipo pulmonar se realizó un estudio más exhaustivo de la expresión diferencial de genes a nivel transcripcional usando microarrays para ARN, que identificó 19 genes cuya expresión aumenta y 40 genes cuya expresión disminuye en los pulmones de embriones E18,5 *Igf1*<sup>-/-</sup> (Pais, 2013)). Entre los genes expresados diferencialmente a nivel transcripcional, se decidió centrar la atención en el estudio a nivel proteico de aquellos que resultaban interesantes funcionalmente por cumplir dos criterios: i) que poseyeran función o capacidad reguladora de funciones celulares (como factores de transcripción, factores de crecimiento, receptores, etc.), y ii) que previamente hubiesen sido referidos con funciones relacionadas con la organogénesis pulmonar, con células de origen pulmonar, o dependientes o relacionadas con IGF1 en cualquier otro contexto. De la lista de los genes mencionados se seleccionaron seis que cumplían estas condiciones. Éstos fueron los factores de transcripción Nfib, Klf2, Egr1 y c-Jun, y los factores de matriz celular o proteínas matricelulares Cyr61 y Ctgf (Pais, 2013). Las razones por las que se han seleccionado se exponen a continuación.

Nfib es un factor de transcripción que regula la expresión de genes de diferenciación en el pulmón (Steele-Perkins et al., 2005). Además juega un papel importante en la progresión del ciclo celular, apoptosis y transformación celular, regulando la transcripción de genes diana para la adecuada adipogénesis y diferenciación mesequimal (Geurts et al., 1998; Nilsson et al., 2005; Italiano et al., 2008; Persson et al., 2009; Pierron et al., 2009; Mitani et al., 2010). La carencia de Nfib en ratones resulta en una aparente detención en la maduración pulmonar fetal tardía, y de forma semejante a como ocurre en los ratones *Igf1*<sup>-/-</sup>, presentan hipoplasia, aumento de la proliferación y de la apoptosis, y reducción de la expresión de varios marcadores de diferenciación terminal en el pulmón E18,5 (Steele-Perkins et al., 2005). Además del pulmón

presentan defectos en el cerebro y se mueren poco después del nacimiento (Grunder et al., 2002; Dooley et al., 2011).

Klf2, es un factor de transcripción altamente expresado en el pulmón, además de en otros órganos, induciendo la diferenciación celular y desarrollo de los tejidos. (Anderson et al., 1995; Kuo et al., 1997). Tiene un papel importante en la biología vascular y es esencial para el desarrollo normal del pulmón siendo su expresión aumentada durante la maduración prenatal del pulmón de ratón (Wani et al., 1999; Xu et al., 2012). Además, la vía de PI3K, una de las vías canónicas de señalización de IGF1, posee un papel clave en la mediación de la acción de Klf2 (Nayak et al., 2011).

El factor de crecimiento de respuesta inmediata (Egr1) fue identificado originalmente como un gen que se induce rápidamente en respuesta a una gran variedad de estímulos, incluyendo factores de crecimiento, citoquinas, fuerzas físicas, hipoxia, y daño, implicados en el progreso de las enfermedades vasculares (Silverman and Collins, 1999). Como factor de transcripción, puede inducir la expresión de un conjunto de genes vasculares, tales como PDGFA y B, bFGF, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , y la molécula de adhesión intracelular 1 (Silverman and Collins, 1999). La expresión de Egr1 es ubicua y baja en muchos tejidos, exhibiendo un patrón de expresión distinto en el cerebro. Además en el contexto de nuestro trabajo cabe destacar que Egr1 había sido considerado un gen diana de IGF1 (Jhun et al., 1995; Dupont et al., 2001). Al igual que ocurre en el pulmón de los mutantes *Igf1*<sup>-/-</sup>, los pulmones perinatales deficientes de T1 $\alpha$ /Podoplanina, proteína que se expresa en las membranas apicales de las células AEC2, también tiene una expresión reducida de Egr1 (Millien et al., 2006).

c-Jun pertenece a la familia de los factores de transcripción AP-1, que incluyen Fos y Jun. Estudios de la expresión de c-Jun indican que éste pertenece a la clase de genes de respuesta inmediata, que son rápidamente y de forma transitoria inducidos en respuesta a estímulos mitogénicos en las células quiescentes (Curran and Franza, 1988). Los estudios de la expresión de c-Jun durante el desarrollo embrionario indican que se expresa casi ubicuamente, aunque con una importancia especial en los tejidos que contienen regiones de células que se dividen rápidamente (Wilkinson et al., 1989). Su expresión aumenta en el pulmón de ratón en el estadio E18,5 (Xu et al., 2012) y los ratones que carecen de c-Jun mueren entre el día embrionario E12,5 y E13,5 (Hilberg et al., 1993; Johnson et al., 1993). Así en E12,5, todos los fetos deficientes en c-Jun muestran defectos del septo interventricular en el corazón y la separación incompleta de la aorta y la arteria pulmonar, lo que se traduce en el tronco arterioso persistente que indican que c-Jun es esencial para el desarrollo normal del tracto de salida cardíaca (Eferl et al., 1999). Como gen diana de IGF1, se ha descrito que éste es capaz de estimular la transcripción de c-Jun en varios contextos celulares (Chiou and Chang, 1992; Monnier et al., 1994; Lagarrigue et al., 1995; Monno et al., 2000; Che et al., 2002) entre ellos en la organogénesis de la vesícula óptica por el Grupo de la Dra. Isabel Varela (Frago et al., 2000).

Cyr61 y Ctgf, renombradas recientemente con los nombres de CCN1 y CCN2, respectivamente, son proteínas secretadas asociadas a proteoglicanos heparan sulfato, que se unen a la matriz extracelular (ECM), y participan dependiendo del contexto en la señalización celular estimulando mitosis, adhesión, apoptosis producción de ECM, arresto del crecimiento y migración en múltiples tipos celulares. Son proteínas de respuesta inmediata temprana (immediate early response genes), que también responden a estímulos de estrés, y entre otras funciones median la progresión de fibrosis en riñón y pulmón. Poseen también actividad pro-angiogénica clara, posiblemente actuando de mediadores de la señalización entre la ECM e integrinas de la superficie celular. En su día fueron consideradas IGFBPs de baja afinidad, y por ello fueron denominadas IGFBP10 e IGFBP8, respectivamente (Brigstock, 2003; Perbal, 2004; Holbourn et al., 2008). Su expresión es elevada en el pulmón, cuyos niveles aumentan en el estadio E17,5 (Xu et al., 2012), pero sobre todo se expresan en el epitelio respiratorio y en bronquiolos, aunque Ctgf también se expresa en el endotelio capilar (Ning et al., 2004). Además de estar implicadas en el cáncer de pulmón también participan en la angiogénesis y en el desarrollo pulmonar, como lo demuestran los fenotipos de los ratones mutantes. Los ratones deficientes de Cyr61 presentan un fenotipo relacionado con la angiogénesis placentaria, mientras que los deficientes de Ctgf poseen un fenotipo pulmonar muy similar a los deficientes de *Igf1*, con hipoplasia pulmonar y alteración en la maduración del septo alveolar. Curiosamente, los pulmones de los ratones deficientes de Ctgf presentan una reducción en la proporción de células positivas para IGF1 en la zona alveolar, y una concomitante disminución de los niveles totales de IGF1 (Mo et al., 2002; Baguma-Nibasheka and Kablar, 2008). En cambio, los pulmones fetales estimulados a crecer por la oclusión traqueal muestran un incremento en la expresión de Ctgf e IGF1 (Mesas-Burgos et al., 2009). Estos datos apoyan fuertemente una posible regulación cruzada de expresión entre estas dos proteínas durante el desarrollo del pulmón, que encajaría con una categorización temprana de Ctgf como IGFBP8 (Kim et al., 1997; Brigstock, 2003).

Cuando se determinaron los niveles de expresión a nivel de proteína de estos seis genes en los pulmones E18,5 *Igf1*<sup>-/-</sup>, comparándolos con los normales, se demostró que sólo había cambios significativos de las proteínas de Nfib, Klf2, Egr1 y Ctgf. Se observa que Nfib se sobre-expresa y Klf2, Egr1 y Ctgf bajan su expresión a nivel de proteína en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup>, cambios acordes con los descritos para sus ARNm (Pais, 2013). Curiosamente, estos cambios de expresión en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> altamente proliferativos se correlacionan con la expresión de estos genes en el cáncer de pulmón. Así, mientras que Nfib se ha descrito como un oncogén en el pulmón debido a su alta expresión en los tumores de pulmón, Klf2 y Ctgf, y también Cyr61, se han considerado genes supresores de tumores debido a su reducción de la expresión en estos carcinomas (Tong et al., 2004; Chien et al., 2006; Chen et al., 2007; Dooley et al., 2011; Xie et al., 2011).

En cambio no se apreciaron cambios en los niveles de la proteína matricelular Cyr61, que era el gen con mayor reducción de la expresión a nivel de ARNm en los pulmones

mutantes. De la misma forma tampoco se encontraron diferencias en la expresión de la proteína de c-Jun, cuyo ARNm sí está reducido en los mutantes. Aunque se desconocen las razones concretas de estas discrepancias, éstas podrían estar relacionadas con que estos dos genes son considerados de respuesta inmediata temprana relacionados con el acto de respirar de los ratones normales al nacer (Dolinay et al., 2006; Millien et al., 2006). Mientras los neonatos E18,5 normales respiran y aumentan la expresión de ARNm de estos genes en el período de 20 minutos antes de su sacrificio, los embriones *Igf1*<sup>-/-</sup> que no respiran en este tiempo, podrían no generar alteraciones de su expresión, siendo el resultado final que los niveles de sus transcritos estén reducidos en los pulmones E18,5. Sin embargo puede que los cambios de ARNm ocurridos en este corto periodo de tiempo no se traduzcan en cambios de niveles de proteína. Estos genes también han sido considerados de respuesta temprana en el contexto de la respiración de los neonatos (Dolinay et al., 2006; Millien et al., 2006). Además muestran reducciones significativas en los niveles de proteína, lo que les implicaría más como dependientes de la señalización de IGF1 durante la organogénesis prenatal del pulmón, arrastrada desde momentos anteriores al estrés pulmonar causado por la respiración del neonato. Algunos de éstos, como *Egr1*, *Cy61* o *c-Jun*, ya habían sido descritos como mediadores de la señalización de IGFs/Ins en otros contextos, por ejemplo en fibroblastos (Dupont et al., 2001; Dupont et al., 2003).

Diversos estudios previos realizados en nuestro laboratorio sobre la caracterización de los pulmones embrionarios de ratones *Igf1*<sup>-/-</sup> o los realizados por otros autores en los *Igf1r*<sup>-/-</sup> indican que ambos mutantes presentan un fuerte retraso en el crecimiento y en la progresión de la organogénesis pulmonar (Pichel et al., 2003; Moreno-Barriuso et al., 2006; Epaud et al., 2012). Una posible explicación para los cambios de expresión proteica de *Nfib*, *Klf2*, *Egr1* y *Ctgf* en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> podría ser que son consecuencia de su retraso en el desarrollo, debido a la falta de señalización de IGF1 (Pais, et al., 2013). Efecto evidenciado por las diferencias en los cambios de expresión génica entre los resultados obtenidos por Xu *et al.*, que identifican alteraciones en genes reguladores a lo largo del normal desarrollo pulmonar (Xu et al., 2012) y los presentados en esta Tesis.

### **2.2. Expresión y señalización intracelular diferencial del sistema IGF/Ins en los ratones mutantes para *Igf1*<sup>-/-</sup>**

Entre los diferentes genes del sistema IGF/Ins evaluados tan sólo se encontró disminución en los niveles de ARNm de *Igfbp2* en los pulmones E18,5 *Igf1*<sup>-/-</sup>. Este dato contrasta con los resultados encontrados en la cóclea de estos mismos ratones *Igf1*<sup>-/-</sup>, donde se encontró que los niveles de este gen estaban más elevados que en los ratones normales (Sanchez-Calderon et al., 2010). Estas discrepancias pueden ser debidas a las diferencias de especificidad de tejido de los mecanismos de señalización y compensación de los IGFs. Es curioso que no existan diferencias en los niveles de *Igf2* ni de *Igf1r* para intentar compensar la

falta de IGF1. En este sentido en los pulmones prenatales de los ratones *Igf2*<sup>-/-</sup> sí se ha descrito que los niveles del ARNm de IGF1 son más elevados (Silva et al., 2006).

A pesar de las alteraciones histológicas encontradas en los pulmones E18,5 *Igf1*<sup>-/-</sup>, tampoco se aprecian diferencias relevantes en los patrones pulmonares de inmunotinciones para IGF1R e IGF2. Llama la atención que los altos niveles de IGF1R observados en el epitelio bronquiolar no implican modificaciones histológicas o moleculares relacionados con este compartimento celular en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup>. Es posible que los altos niveles de IGF2 observados en el epitelio bronquiolar de las vías respiratorias, compense la deficiencia de IGF1 en los mutantes y por lo tanto, el mantenimiento de la señalización normal de IGF1R aunque se necesitan estudios más exhaustivos para demostrar este supuesto. Sin embargo, se han observado pequeñas diferencias en los patrones de expresión de IGF1R en las células endoteliales de los capilares sanguíneos alveolares.

Con el objeto de profundizar en la caracterización del efecto de la falta de IGF1 sobre la maduración pulmonar prenatal, hemos analizado la señalización intracelular de los pulmones de los embriones E18,5. Las MAP quinasas ERK y p38, conocidas como mediadoras típicas de la señalización de IGF1R, juegan un papel crucial regulando la proliferación y diferenciación celular de gran variedad de tejidos, incluyendo el pulmón embrionario (Ferrell, 1996; Shapiro et al., 1997; Lee et al., 2001; Thrane et al., 2001; Kling et al., 2002). Los resultados obtenidos demuestran que los pulmones de los embriones *Igf1*<sup>-/-</sup> presentan mayores niveles de activación de ERK1/2 pero sin diferencias en los de p38. Esto apunta a que ERK2 es el mediador fundamental en la señalización de IGF1 durante la organogénesis fetal del pulmón, y que es importante para mantener el equilibrio entre la proliferación y la diferenciación de células pulmonares prenatales. Cambios en la fosforilación de ERK1/2 han sido previamente descritos durante el desarrollo embrionario de pulmón murino, en donde disminuye su activación durante la diferenciación pulmonar en paralelo a la reducción en la proliferación (Wang et al., 2005). Teniendo en cuenta que IGF1 es un factor de crecimiento que media la activación de ERK1/2, este resultado encajaría con el reducido tamaño del pulmón, su menor diferenciación y los mayores niveles de proliferación de los pulmones E18,5 *Igf1*<sup>-/-</sup> (Pichel et al., 2003; Moreno-Barriuso et al., 2006; Pais, 2013).

La señalización de IGFs por la vía de PI3K/AKT es históricamente la más canónica. Wang *et al.* han descrito cómo varían los niveles de AKT durante la diferenciación del pulmón embrionario de ratón. Según estos autores, la actividad de AKT alcanza sus valores más altos en estadios tempranos del desarrollo (E12) y va disminuyendo considerablemente hasta que en el estadio E18,5 alcanza sus valores más bajos, asociando este descenso a la diferenciación y maduración pulmonar y a su papel anti-apoptótico (Wang et al., 2005). Además, AKT también juega un importante papel en angiogénesis, maduración y en la permeabilidad vascular (Chen et al., 2005). Aunque los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> presentan un retraso en la diferenciación y maduración pulmonar generalizado y alteraciones en la vascularización

(Moreno-Barriuso et al., 2006; Pais, 2013), los niveles de activación de AKT no se ven afectados en los pulmones sin IGF1. Sin embargo este dato corrobora que los niveles de apoptosis en sus pulmones tampoco varían respecto a los ratones normales (Pais, 2013).

En la literatura se ha descrito que la señalización de IGF1 mediada por IGF1R activa la ruta de STATs, incluyendo STAT3, durante el desarrollo de diversos órganos del ratón, entre ellos el pulmón (Zong et al., 2000). A pesar de ello, los niveles de activación de STAT3 tampoco se ven afectados en los pulmones embrionarios E18,5 *Igf1*<sup>-/-</sup>.

El hecho de que sólo se aprecien diferencias en la señalización de ERK2 (aumentada en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup>), pero no ERK1, p38, AKT o STAT3 podría ser debido a que los pulmones de los embriones E18,5 al carecer de IGF1 desde el momento de formarse el cigoto, podrían haber sufrido procesos de compensación de la señalización por vías alternativas, normalizando la señalización durante la embriogénesis. Sin embargo, en la cóclea de estos mismos animales la activación de ERK1/2 y AKT está reducida y la de p38 muy incrementada (Sanchez-Calderon et al., 2010), demostrándose de nuevo que los mecanismos de acción de IGF1 durante el desarrollo embrionario difieren en cada órgano.

### **2.3. IGF1 induce la morfogénesis, maduración del septo y alteraciones de los niveles de expresión de genes reguladores en los pulmones prenatales cultivados ex vivo**

La acción de IGF1 sobre los cultivos ex vivo de explantes de pulmones E16,5 provocó cambios morfogénicos de los lóbulos pulmonares e inducción de la maduración del epitelio alveolar, pero también cambios en la expresión génica, como se discutirá a continuación. Esto por una parte demuestra que el sistema de cultivo pulmonar ex vivo en la interfase aire/medio de pulmones embrionarios es válido en embriogénesis tardía (E16,5) (Prince et al., 2004; Chen et al., 2006), así como también lo es para estudiar los procesos de morfogénesis temprana, sobre todo de la ramificación del árbol de las vías respiratorias (Zhao et al., 1996; Lebeche et al., 1999; Xiao et al., 2003; Del Moral et al., 2006; Finney et al., 2008; Carraro et al., 2010; Del Moral and Warburton, 2010). Sin embargo también se deben entender las limitaciones de este tipo de cultivos para reflejar completamente los eventos fisiológicos, celulares y moleculares que suceden en los pulmones in vivo. La principal limitación es la ausencia de riego sanguíneo, y por lo tanto de la apropiada vascularización pulmonar, que es imprescindible que ocurra en paralelo a una correcta diferenciación y maduración alveolar (Hislop, 2002; Han et al., 2003; Vu et al., 2003; Hislop, 2005; Parera et al., 2005; van Tuyl et al., 2005; Moreno-Barriuso et al., 2006). Aunque no se ha valorado, la falta de riego sanguíneo probablemente conlleve hipoxia cuya consecuencia redundará en muerte celular y en alteraciones en el programa normal de diferenciación y maduración que ocurre en el pulmón in vivo.

El hecho de que IGF1 induzca cambios morfológicos apreciables en los explantes pulmonares, como la apertura de espacios aéreos y el adelgazamiento de las células del epitelio que los recubre, indica que éste posee un efecto morfogénico sobre este órgano.

Además, al demostrar que las células epiteliales que mayor cambio sufren son las alveolares de tipo AEC2 induciendo su maduración a las de tipo AEC1, exhibe adicionalmente la acción directa del factor favoreciendo la maduración alveolar, y corroboran los resultados observados in vivo en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> (Pichel et al., 2003; Moreno-Barriuso et al., 2006; Pais, 2013). El efecto morfogénico y de maduración alveolar también se ha verificado de forma más clara e intensa en los explantes con genotipo *Igf1*<sup>-/-</sup>, que en los normales. La razón de este efecto diferencial podría ser que los explantes *Igf1*<sup>-/-</sup> expresan mayores niveles de IGF1R, y por lo tanto la acción del IGF1 añadido exógenamente es más efectiva activando la señalización de IGF1R.

El estudio de la expresión a nivel de proteína de los genes reguladores seleccionados como posibles dianas de IGF1 en los explantes pulmonares reveló resultados muy interesantes, aunque alguno de ellos fue inesperado. Al igual que lo observado in vivo los niveles de Nfib en los explantes cultivados sin añadir IGF1 fueron más altos en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup>. Sin embargo, la adición de IGF1, paradójicamente provocó un aumento de los niveles de este gen en los explantes de ambos genotipos. *Klf2*, *Ctgf* y *Cyr61* aumentaron su expresión en los explantes después del tratamiento con IGF1, pero lo hicieron en función de su genotipo. Mientras que *Klf2* y *Cyr61* aumentaron exclusivamente en explantes *Igf1*<sup>-/-</sup>, *Ctgf* aumentó sólo en los pulmones *Igf1*<sup>+/+</sup>. Los notables aumentos en la expresión de Nfib, *Klf2* y *Cyr61* en los cultivos *Igf1*<sup>-/-</sup> pueden ser consecuencia de los mayores niveles de IGF1R en estos explantes, y también reforzaría la propuesta de estos genes a ser mediadores o diana de la acción de IGF1 en la maduración pulmonar prenatal. Las razones de las discrepancias en los resultados para los diferentes genes se desconocen, pero en parte pueden ser consecuencia del uso de este particular modelo experimental que no refleja completamente los eventos celulares y moleculares que suceden en los pulmones in vivo. Como gen control del diseño experimental se incluyó la valoración de los cambios en los niveles de laminina, proteína con expresión dependiente de IGF1 durante la organogénesis pulmonar (Pais, 2013). En este escenario, la laminina aumentó su expresión tras la adición de IGF1 en los explantes de ambos genotipos. De igual forma, la expresión de IGF1R aumentó su expresión en los explantes *Igf1*<sup>-/-</sup>, posiblemente para compensar la falta de IGF1 endógeno, y tras la adición del factor exógeno, probablemente por un efecto de retroalimentación o feedback, la expresión del receptor fue reprimida por la presencia del ligando en los explantes de ambos genotipos. Respecto a este efecto resulta curioso resaltar que los pulmones E18,5 *Igf1*<sup>-/-</sup> no presentaban diferencias en los niveles de proteína IGF1R. Este efecto de control por retroalimentación negativa de la expresión de IGF1R por su ligando IGF1 ya se había descrito en otros sistemas de cultivos in vitro, como por ejemplo en la línea celular HEK293 (Shen et al., 2012). Este comportamiento de la expresión de IGF1R, al igual que ocurre con la laminina, también sirve como un control interno del modelo experimental de los cultivos de los explantes pulmonares, validando hasta cierto punto los resultados obtenidos al usar este modelo.

A pesar de las discrepancias encontradas, el sistema de cultivos ex vivo demuestra que IGF1 induce la proliferación en el pulmón distal, la morfogénesis y la diferenciación diferencial por la modulación de la expresión de *Nfib*, *Klf2*, *Cyr61* y *Ctgf*, aunque los mecanismos moleculares que subyacen a su interdependencia en la expresión de estos genes requerirán mayor elucidación.

### **2.4. Los factores de transcripción *Nfib*, *Klf2* y *Egr1* y la proteínas matricelulares *Cyr61* y *Ctgf* son genes diana de IGF1 en el desarrollo pulmonar**

En esta Tesis se demuestra que la expresión proteica de *Nfib* está aumentada en pulmones E18,5 de ratones *Igf1*<sup>-/-</sup>, corroborando lo determinado para su ARNm (Pais, 2013). La expresión de *Nfib* en los pulmones E18,5 se observa principalmente en las células mesenquimales (Grunder et al., 2002; Pais, 2013), y los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> de este estadio presentan mayor proporción de células mesenquimales en los septos alveolares (Moreno-Barriuso et al., 2006). Por otra parte y de forma inversa la expresión de *Nfib* aumenta con la adición de IGF1 a los cultivos de explantes pulmonares. Paradójicamente, la función de *Nfib* en el crecimiento pulmonar queda demostrada por el fenotipo de los pulmones prenatales de los ratones *Nfib*<sup>-/-</sup>, que son hipoplásicos e inmaduros, con fenotipos similares a los *Igf1*<sup>-/-</sup> (Grunder et al., 2002; Steele-Perkins et al., 2005). Ambos resultados indican que de alguna forma el crecimiento y diferenciación del pulmón mediado por IGF1 pasa por la alteración de la expresión de *Nfib*.

La expresión proteica de *Klf2* y *Egr1* desciende en los pulmones E18,5 *Igf1*<sup>-/-</sup>, al igual que ocurría con la de su ARNm (Pais, 2013). Además, la de *Klf2* aumenta mucho en los pulmones cultivados al añadirle IGF1. *Klf2* se expresa mucho en el pulmón y posee funciones clave en su desarrollo y maduración como indica el fenotipo de los ratones nulos para este gen (Wani et al., 1999). El gran aumento de su expresión en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> tratados con IGF1 indica que su función en la maduración pulmonar podría estar mediada por IGF1. Pudiera ser que la función mediada por este factor estuviera relacionada con la vascularización y permeabilidad vascular en la que participa *Klf2* (Bruning et al., 1997; Ayadi et al., 2001; Bhattacharya et al., 2005). Por su parte también se ha descrito que la expresión de *Egr1* está regulada por IGF1 e IGF1R y las MAP kinasas (Catania et al., 1999; Criswell et al., 2005). Trabajos previos de nuestro laboratorio detectaron alteraciones en el desarrollo vascular que se reflejaron en cambios en *Vegfa*, *Flt1/VegfR1*, *KLF2*, *Egr1*, *CTGF* y expresión *Cyr61* (Pauling and Vu, 2004). Por lo tanto, *Vegf1a* a través de la señalización de *Flt1* es importante para el desarrollo vascular embrionario en el pulmón que implica la acción de IGF1. La deficiencia de *Klf2* provoca la desestabilización del vaso sanguíneo, *Nfib* se expresa en las células pulmonares del musculo liso, y *Ctgf* y *Cyr61* están implicados en la vasculogénesis (Compernelle et al., 2002; Steele-Perkins et al., 2005; Wu et al., 2008; Chen and Lau, 2009). En conjunto, estos datos demuestran claramente que la falta de IGF1 altera la expresión de

múltiples genes y de las vías de genes responsables por la diferenciación epitelial, mesenquimal y endotelial del pulmón.

Nuestra atención también se centró por el bajo nivel de transcripción de genes de respuesta inmediata-temprana, como son los factores de transcripción de la matriz extracelular Cyr61 y Ctgf en los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup>. Es posible que estos genes pudiesen en una acción independiente de IGF1 aumentar sus niveles de ARNm como resultado del período de 20 minutos de respiración normal realizado por los embriones *Igf1*<sup>+/+</sup>. Por este motivo, los pulmones de ratones mutantes con dificultades respiratorias también se muestran alterados en los niveles de transcripción de los genes de respuesta inmediata-temprana (Dolinay et al., 2006; Millien et al., 2006). Sin embargo, desde que IGF1 se identificó en otro contexto como inductor específico de muchos de estos genes se puede postular de que los cambios en la expresión de tales genes en el pulmón dependen de la señalización de IGF1 (Dupont et al., 2001). La expresión reducida de Cyr61 y c-Jun a nivel de ARNm en los pulmones deficientes de *Igf1*, dos genes que se han interrelacionado funcionalmente con el sistema de IGFs (Bruning et al., 1997; Brigstock, 2003), no se reflejan a nivel de proteína *in vivo*. De esto modo se puede decir que Klf2, Ctgf y Cyr61 aumentan su expresión en los explantes pulmonares después del tratamiento con IGF1, pero dependiendo del genotipo. Datos recientes de nuestro laboratorio destacan la importancia de IGF1 en la regulación de la producción de ECM durante la embriogénesis pulmón. Los pulmones que carecen de IGF1 mostraron una alteración general en la deposición de la matriz extracelular reforzada por los cambios en la expresión de ARNm de los genes implicados en las vías moleculares que regulan la adhesión celular, la adhesión focal, uniones estrechas y la interacción de los receptores de la ECM (Pais, 2013). Las proteínas matricelulares Cyr61 y Ctgf son en sí mismas inductores de la acumulación de ECM (Brigstock, 2003). IGF1 y la señalización de su receptor se han implicado en la regulación de proteínas de adhesión celular, como cadherinas y lamininas (Mauro and Surmacz, 2004; Lee et al., 2006a) siendo esta última esencial para la maduración del pulmón (Relan and Schuger, 1999; Nguyen and Senior, 2006). En este contexto hemos encontrado que los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> cultivados tienen menos cantidad de laminina y que su expresión se induce en presencia de IGF1 exógeno.

Por último mencionar que de los resultados obtenidos del estudio de los pulmones *Igf1*<sup>-/-</sup> se deduce que de los dos ligandos principales de IGF1R, IGF1 y IGF2, es IGF1 el que mayor relevancia funcional posee durante la organogénesis prenatal de este órgano. El papel del IGF2 en el desarrollo del pulmón es menos crítica que la descrita aquí para IGF1, ya que su deficiencia no afectan a la supervivencia neonatal y sólo genera un fenotipo pulmonar prenatal muy sutil, caracterizado por septos alveolares algo más gruesos y algo desorganizados, tan sólo evidentes en los embriones nacidos a su vez de madres deficientes de IGF2 (Silva et al., 2006). Además, los pulmones mutantes de los ratones *Igf2*<sup>-/-</sup> presentan niveles de expresión de IGF1 más elevados que en el ratón normal, probablemente como un intento de compensar la deficiencia de IGF2, para substituirlo funcionalmente (Silva et al., 2006). Por el contrario, la

relevante función pulmonar del IGF1 descrita en esta Tesis y en estudios previos, está avalada por el fenotipo pulmonar severo, acompañado de la falta de compensación por otros genes del sistema de IGFs en los embriones *Igf1*<sup>-/-</sup>.

### **2.5. El tratamiento con corticosterona induce maduración del septo pero no la viabilidad postnatal de los ratones mutantes para *Igf1*<sup>-/-</sup>**

Los resultados presentados demuestran que la falta de IGF1 durante la embriogénesis provoca alteraciones en las vías moleculares y en genes reguladores clave que conducen a una hipoplasia pulmonar intrauterina, acompañada de un gran retraso en la maduración pulmonar distal, que finalmente conlleva a la muerte neonatal de los ratones estos ratones. Por otra parte está bien documentado que los glucocorticoides aumentan el desarrollo del pulmón al promover la remodelación de tejidos y la maduración alveolar antes del nacimiento (Wallace et al., 1995, 1996; Mendelson, 2000; Chinoy, 2003). Estos resultados abren la posibilidad de que la acción de los IGFs y los glucocorticoides están interrelacionados durante la maduración pulmonar prenatal en roedores. En este sentido, hay trabajos en ratas que sugieren que la terapia con glucocorticoides induce la maduración pulmonar a través del sistema de los IGFs (Oue et al., 1999). Por otra parte también se había observado que la corticosterona acelera la maduración pulmonar en los ratones *Igf2*<sup>-/-</sup> corrigiendo su fenotipo (Silva et al., 2006). Por lo tanto, en nuestro intento de rescatar el fenotipo pulmonar de los embriones *Igf1*<sup>-/-</sup> mediante un tratamiento con corticosterona a las madres gestantes, hemos observado una clara mejora en la maduración histológica alveolar reflejado en una mayor diferenciación de las células en este compartimento pulmonar. Este efecto se ha encontrado tanto en los pulmones *Igf1*<sup>+/+</sup> como en los *Igf1*<sup>-/-</sup>. Sin embargo, a pesar del efecto positivo sobre la maduración del septo alveolar ninguno de los embriones E18,5 *Igf1*<sup>-/-</sup> fueron capaces de respirar y sobrevivir postnatalmente. Aunque es posible que la razón de la muerte de estos animales no sea exclusivamente debida a la inmadurez pulmonar, el hecho de haber encontrado lesiones edematosas con presencia de células sanguíneas en los alveolos de algunos de estos animales neonatos parece indicar que sí puede contribuir a ello. Además, este resultado podría explicarse perfectamente por la inmadurez vascular prenatal que presentan los ratones *Igf1*<sup>-/-</sup>, como descrito previamente en nuestro laboratorio (Pichel et al., 2003; Moreno-Barriuso et al., 2006).

### **2.6. Efecto diferencial de IGF1 sobre la expresión de genes reguladores en células pulmonares de origen mesenquimal embrionario y epitelial**

La determinación de la acción de IGF1 se realizó en distintos tipos celulares pulmonares cultivados *in vitro*: células pulmonares embrionarias de origen mesenquimal, primarias o inmortalizadas, normales y *Igf1*<sup>-/-</sup>, y células de origen epitelial derivadas de carcinomas pulmonares. En estos estudios se valoraron cambios en la proliferación y en la

morfología celular. También se evaluaron los niveles de expresión de algunos de los genes con función reguladora descritos como dianas de IGF1 en el desarrollo prenatal del pulmón, entre ellos *Nfib*, *Klf2*, *Cyr61*, *Ctgf*, e *IGF1R*. En la lista de factores de transcripción se incluyó un gen adicional, el *FoxM1*. Las razones para incluir a *FoxM1* en este estudio son varias. Es un gen con expresión en el pulmón, cuyos niveles descienden en el estadio E17,5 (Xu et al., 2012) pero sin embargo, su expresión sí se encuentra elevada en la cóclea de los embriones E18,5 *Igf1*<sup>-/-</sup>, con una localización sub-celular mucho más abundante en el núcleo, postulándose como un importante gen diana de IGF1 para el desarrollo coclear (Sanchez-Calderon et al., 2010). Los ratones mutantes para *FoxM1* se mueren por alteraciones en la maduración pulmonar prenatal (Krupczak-Hollis et al., 2004; Kim et al., 2005; Ramakrishna et al., 2007; Kalin et al., 2008). *FoxM1* se expresa en células que se dividen activamente y es importante para la progresión del ciclo celular. También posee funciones más diversas como la regulación de la proliferación, diferenciación y migración celular, o la reparación del ADN, e incluso la producción de surfactante en células alveolares pulmonares (Teh et al., 2002; Kalinichenko et al., 2004; Lee et al., 2004; Kim et al., 2006; Myatt and Lam, 2007; Yoshida et al., 2007; Gemenetzidis et al., 2009; Li et al., 2009; Nakamura et al., 2010). *FoxM1* se sobreexpresa en múltiples tipos de tumores, incluidos los de pulmón. Además se expresa en diversos tipos de células durante embriogénesis, entre las que se encuentran las células mesenquimales y epiteliales del pulmón embrionario (Ye et al., 1997; Kalinichenko et al., 2003; Zhao et al., 2006; Kalin et al., 2008).

En algunos casos para valorar la especificidad de acción de IGF1, se añadió IGF2 como control a los cultivos, y su acción se valoró en paralelo.

IGF1 (Palmade et al., 1994; Oh et al., 2002; Diaz-Araya et al., 2003; Rajski et al., 2010; Hung et al., 2013) e *IGF1R* (Caro et al., 1988; Werner et al., 1989; Santos et al., 1994; Chetty et al., 2004) se expresa tanto en células mesenquimales como en epiteliales.

El estudio del efecto de IGF1 sobre las células mesenquimales embrionarias pulmonares, se inició usando fibroblastos inmortalizados (LMEFs) derivados de embriones de pulmón, para posteriormente ser realizado en células mesenquimales mantenidas en cultivos primarios, usadas en el tercer o cuarto pase tras su obtención. La razón de este cambio estuvo en que las líneas celulares de LMEFs *Igf1*<sup>+/+</sup> e *Igf1*<sup>-/-</sup> establecidas poseían una gran variabilidad fenotípica entre sí, incluso en un mismo genotipo. Poseían morfología muy variable, desde una forma alargada de un fibroblasto típico a una morfología mucho más poligonal y con muchas inclusiones vacuolares. Además, su índice de proliferación también era muy diferente independientemente del genotipo, razón por la que se decidió no realizar ensayos de proliferación con ellas. Esta variabilidad se manifestó en los resultados obtenidos de su expresión génica. Los estudios presentados aquí se realizaron con una línea celular de LMEFs de cada genotipo, pero desconocemos si los datos obtenidos de su uso son un reflejo de su situación *in vivo*, o de un efecto estocástico en su selección para realizar los experimentos.

A diferencia de lo esperado, es significativo que en ningún tipo de células mesenquimales se han encontrado cambios importantes en la expresión génica de los genes reguladores estudiados. En líneas de LMEFs analizadas tan sólo se ha encontrado que IGF1 provoca una reducción en los niveles de Klf2, reducción que sólo es significativa en la línea *Igf1<sup>+/+</sup>*, mientras que en las *Igf1<sup>-/-</sup>* tan sólo hay una tendencia a la reducción de su expresión. También hay una tendencia a la reducción de Ctgf, y no tan clara de Cyr61 en los LMEFs *Igf1<sup>-/-</sup>* tras el tratamiento con IGF1.

En los cultivos primarios de células mesenquimales se observa una reducción significativa de Cyr61 y Ctgf, y aumento de FoxM1, en las células *Igf1<sup>-/-</sup>*. Al menos los niveles de ARNm y proteína de Cyr61 y Ctgf, reflejan los datos observados *in vivo* en los pulmones E18,5 *Igf1<sup>-/-</sup>* (Pais, 2013). Llama la atención que IGF1 no modifique de forma más significativa los niveles de expresión de Nfib, Cyr61 y de Ctgf, ya que es elevada en fibroblastos y en el mesénquima pulmonar (Lau and Nathans, 1985; Steffen et al., 1998; Dupont et al., 2001; Steele-Perkins et al., 2005). En los cultivos de explantes pulmonares IGF1 induce aumento de expresión tanto de Cyr61 (en los de genotipo *Igf1<sup>-/-</sup>*), como de Ctgf (en los *Igf1<sup>+/+</sup>*). En concreto, Ctgf ha sido implicado en fibrosis pulmonar, enfermedad mediada por mio-fibroblastos, aumentando su expresión durante la enfermedad (Allen et al., 1999; Allen and Spiteri, 2002). Además, en otro contexto, se ha observado que el tratamiento *in vivo* con IGF1 en ratones con cardiomiopatías ejerce un efecto terapéutico de la enfermedad, rebajando los niveles de Ctgf y reduciendo la proliferación de fibroblastos (Touvron et al., 2012). Dada la naturaleza extracelular de Cyr61 y Ctgf, y con implicaciones funcionales de unión a IGF1, vascularización y adhesión celular (Brigstock, 2003), puede que éstos por su característica de genes de respuesta inmediata temprana, estén mediando las funciones de respuesta a IGF1 en tiempos cortos, (Dolinay et al., 2006; Millien et al., 2006), mientras que en nuestros estudios realizados a más largo plazo (24 y 48 horas) no se aprecian cambios en su expresión.

Tampoco se ha observado que IGF1 afecte a la localización intracelular de los factores de transcripción analizados. En todos los casos es claramente nuclear, sin evidencias de su presencia en el citoplasma. En este sentido, nuestros datos contrastan con los obtenidos por análisis de *Western blot* para FoxM1 en el extracto de oído interno de embriones *Igf1<sup>-/-</sup>* en el laboratorio de la Dra. Isabel Varela, donde encuentran que su localización es más abundante en el núcleo de los mutantes, mientras que es eminentemente citoplasmática en los embriones control (Sanchez-Calderon et al., 2010). Todas estas discrepancias pueden ser debidas a las diferencias de tipo celular, del órgano de origen de las células, uso de cultivos *in vitro*, etc.

Al analizar el efecto de IGF1 sobre las células epiteliales pulmonares de origen tumoral H1299, observamos efectos más claros sobre los niveles de expresión génica de los genes analizados, indicando que estas células son más sensibles a la acción de este factor de crecimiento. En general aumenta la expresión de Nfib (al igual que ocurre en los explantes de pulmones), reduce la de Cyr61, Ctgf y Klf2 (al contrario que en los explantes de pulmones)

(Pais, 2013), y también inhibe la de FoxM1. El significado de estos resultados no es fácil de explicar, porque aunque se quisiera postular que estarían de acuerdo con la hipótesis de que IGF1 pudiese inducir de alguna forma la diferenciación de estas células epiteliales en cultivo, no parece ser el caso, ya que su proliferación también aumenta tras la adición del factor.

IGF1 induce un aumento significativo de la proliferación de las células pulmonares en cultivo, tanto de origen mesenquimal (*Igf1<sup>+/+</sup>* e *Igf1<sup>-/-</sup>*), como las epiteliales H1299. Además, este efecto parece específico y exclusivo de IGF1 a través de IGF1R, ya que IGF2 no afecta de forma significativa a ninguno de estos tipos celulares. En realidad este resultado está de acuerdo con múltiples estudios previos que demuestran que IGF1 induce la proliferación celular de fibroblastos y células epiteliales derivadas de diversos tejidos (Leof et al., 1982; Takahashi et al., 1990; Qureshi et al., 1997; Stull et al., 2002). Estudios recientes profundizan en el mecanismo y demuestran que la estimulación continua de IGF1 induce la asociación prolongada de PI3K con IGF1R, y que la actividad de PI3K unido a IGF1R es esencial para la proliferación celular inducida por IGF1 (Fukushima et al., 2012).

La regulación de la expresión de IGF1R en respuesta a IGF1 es muy parecida a la obtenida en los cultivos *ex vivo* de explantes de lóbulos pulmonares, para el caso de los LMEFs *Igf1<sup>+/+</sup>*, las células mesenquimales *Igf1<sup>-/-</sup>* y las células de la línea H1299. En estos tipos celulares la expresión de IGF1R se comporta como lo esperado en un principio después de la adición del factor exógeno. En general la expresión del receptor se reprime por la presencia del ligando, que cómo ya se ha mencionado podría ser debido a un efecto de retroalimentación negativa, cómo ya se había descrito en otros sistemas de cultivos de células *in vitro*, como por ejemplo en la línea celular HEK293 (Shen et al., 2012). Este comportamiento de la expresión de IGF1R, sirve como un control interno del modelo experimental usado, validando hasta cierto punto los resultados obtenidos al usar estas células. Sin embargo, esta regulación no es tan clara para el caso de los LMEFs *Igf1<sup>-/-</sup>* y las células mesenquimales *Igf1<sup>+/+</sup>*, curiosamente los tipos de células que tras la adición de IGF1 manifiestan menos cambios en la expresión génica de los genes analizados. Es razonable que las células mesenquimales *Igf1<sup>+/+</sup>* no respondan tanto a IGF1, porque ellas mismas lo podrían estar produciendo y usando de forma auto- o paracrina, pero no explicaría lo que ocurre en los LMEFs *Igf1<sup>-/-</sup>*.

Dado que los estudios *in vitro* en cultivos de células pulmonares realizados para testar las funciones de los IGFs y el efecto de IGF1 sobre los candidatos a ser sus genes diana, no han respondido a las expectativas, se decidió realizar estos estudios usando modelos animales, en concreto ratones mutantes condicionales de IGF1R, que permitiesen un análisis funcional en un contexto más natural *in vivo*.

### 3. Fenotipo de los ratones mutantes condicionales de *Igf1r* en el epitelio pulmonar

Se ha descrito como IGF1 a través de su receptor de alta afinidad juega un papel importante en el desarrollo pulmonar embrionario del ratón, regulando el crecimiento y la diferenciación de diferentes tipos celulares del pulmón. La señalización de los IGFs también se sabe que colabora en el mantenimiento de la homeostasis pulmonar en el pulmón adulto, y como ya se ha mencionado en la introducción, existen múltiples trabajos que le atribuyen un papel importante en la autorrenovación y reparación del pulmón tras una lesión, que conllevan a enfermedades respiratorias muy relevantes a nivel sanitario como el síndrome de dificultad respiratoria, la fibrosis pulmonar idiopática, el asma y el cáncer de pulmón, tanto en modelos animales como en pacientes (Han et al., 1996a; Han et al., 1996b; Miyazaki et al., 1998; Chetty and Nielsen, 2002; Krein and Winston, 2002; Krein et al., 2003; Moorehead et al., 2003; Chetty et al., 2004; Ahamed et al., 2005; Chetty et al., 2005; Frankel et al., 2005; Nagata et al., 2007; Zaher et al., 2007; Dziadziuszko et al., 2008; Choi et al., 2009; Linnerth et al., 2009; Werner and Bruchim, 2009; Yin et al., 2009; Gallagher and LeRoith, 2011; Yang and Winslet, 2011; Kim et al., 2012a; Kim et al., 2012b). En este sentido, diferentes autores han propuesto que el bloqueo de la reducción de la señalización de IGFIR como una estrategia adecuada para el tratamiento de algunas de estas patologías pulmonares como por ejemplo la fibrosis, o la oncogénesis y progresión tumoral de los carcinomas (Sachdev and Yee, 2007; Pollak, 2012; Hung et al., 2013).

Con el objeto de modelar en el ratón la falta de señalización de los IGFs en el pulmón y así poder estudiar sus consecuencias in vivo, y sabiendo que los ratones mutantes knockout totales *Igf1<sup>-/-</sup>* e *Igf1r<sup>-/-</sup>* se mueren al nacer (Liu et al., 1993; Epaud et al., 2012) (Pais et al 2013), se decidió generar y estudiar el fenotipo pulmonar de dos modelos de ratones mutantes condicionales de IGF1R específicos del epitelio pulmonar, mediante el uso del sistema Cre/loxP. En el primero de los modelos, la línea *CCSP-CreTg/+; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, Cre se expresa y elimina específicamente *Igf1r* en un subtipo concreto de células epiteliales pulmonares, las células epiteliales de Clara (Bertin et al., 2005). En la segunda línea mutante condicional, la *Nkx2.1-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, Cre dirige la delección de *Igf1r* a la mayor parte de las células epiteliales de las vías respiratorias, incluyendo la tráquea, los bronquios y bronquiolos, y también a las células AEC2 (Xu et al., 2008; Tiozzo et al., 2009) ([jaxmice.jax.org/strain/008661.html](http://jaxmice.jax.org/strain/008661.html)). Los ratones doble transgénicos de ambas líneas se han obtenido realizando cruces entre los ratones transgénicos de cada una de las líneas Cre y los ratones homocigotos *Igf1r<sup>fl/fl</sup>*. Los resultados indican que los genotipos de los ratones que se obtienen de los cruces aparecen en las proporciones mendelianas esperadas, y que los mutantes condicionales son viables, con fenotipos aparentes bastante normales y fértiles, y por lo tanto demuestran que la delección de *Igf1r* conseguida en el epitelio pulmonar no es fundamental para la vida ni la reproducción de los ratones.

Los análisis de DNA genómico mediante PCR demuestran que tanto los ratones *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* como los *Nkx2.1-Cre; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* poseen delección de *Igf1r* específicamente en la tráquea y en el pulmón. Como era de esperar, la PCR muestra menos intensidad en la banda de la delección de *Igf1r* en los pulmones de los ratones *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, ya que la proporción de células afectadas es menor que en los pulmones de ratones *Nkx2.1-Cre; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*. Dado que el análisis por PCR se realiza en el ADN genómico del tejido pulmonar completo, la proporción de éste con la delección de *Igf1r* es relativamente pequeña en la línea *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, y considerablemente mayor en el obtenido de pulmones *Nkx2.1-Cre; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*. En los primeros la delección en el pulmón sólo debería ocurrir en las células de Clara, y adicionalmente a células que potencialmente pudiesen derivar de su linaje, como pueden ser las células ciliadas y las células mucosecretoras, todas ellas presentes en los bronquios y bronquiolos (Bertin et al., 2005; Snyder et al., 2009; Tompkins et al., 2009; Morrissey and Hogan, 2010; Rock et al., 2010; Sullivan et al., 2010), mientras en los segundos se extendería a todas las células del epitelio respiratorio, incluyendo las células AEC2 de la zona alveolar además de todos los epiteliales de bronquios y bronquiolos (Xu et al., 2008; Tiozzo et al., 2009).

Al analizar la expresión de IGF1R a nivel celular mediante inmunohistoquímica se pone de manifiesto que en los pulmones *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* la delección no ocurre en todas las células epiteliales de Clara, sino en zonas localizadas de los bronquiolos, dependiendo de la zona del pulmón y con variabilidad entre pulmones de diferentes animales. Estos resultados inducen a pensar que la delección ocurre en mosaico. Este mosaicismo podría ser debido a que el transgen *CCSP-Cre* no expresa *Cre* en todas las células de Clara, sino en forma de mosaico, fenómeno ampliamente descrito en los ratones transgénicos convencionales generados por microinyección (Wilkie et al., 1986). Sin embargo, el análisis inmunohistoquímico de la expresión de IGF1R en la línea *Nkx2.1-Cre; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* muestra una falta de expresión mucho más generalizada de IGF1R tanto en el epitelio bronquiolar, como en las células AEC2.

Aunque la caracterización realizada de estas líneas de mutantes condicionales es preliminar, estas diferencias obtenidas de los datos de la delección de *Igf1r* por PCR del ADN genómico o por inmunohistoquímica, también se reflejan en otros aspectos analizados en estas líneas. Por ejemplo, en la reducción de los niveles de expresión del ARNm de *Igf1r* realizados por qRT-PCR. Aunque los pulmones de ambos mutantes muestran niveles reducidos de *Igf1r*, la reducción sólo es significativa en el pulmón de los ratones *Nkx2.1-Cre; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*. También se aprecia en la proporción y número de colonias de células madre pulmonares de gran tamaño obtenidas, en ambos casos más elevado también en los cultivos derivados de los pulmones *Nkx2.1-Cre; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*.

### 3.1. La carencia de IGF1R en las células epiteliales altera la diferenciación epitelial en los bronquiolos terminales

La delección de IGF1R en el epitelio pulmonar no genera un fenotipo vistoso, y en realidad no compromete en absoluto la función respiratoria, ni siquiera después del daño con hiperoxia en los ratones mutantes *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*. A nivel histológico ambas líneas de mutantes condicionales muestran alteraciones similares en el epitelio de los bronquiolos terminales: un adelgazamiento o aplanamiento considerable, una ausencia de la morfología “cupulada” típica de las células de Clara, y una reducción de la densidad nuclear que podría ser un síntoma de pérdida de células. Esta pérdida de células explicaría la falta de continuidad en el epitelio que se aprecia esporádicamente sobre todo en los ratones *Nkx2.1-Cre; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*. En ambas líneas se aprecia una disminución considerable en la inmunotinción para la CCSP en las células de Clara de los bronquiolos terminales, coincidiendo con la falta de tinción para IGF1R. Estos datos, en combinación con el retraso de la diferenciación observado de este tipo celular después del daño con naftaleno en la línea *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, o el aumento de la proporción de las células indiferenciadas en las colonias de células madre de los cultivos en ambas líneas, podrían interpretarse como una alteración de la diferenciación de las células de Clara.

Los cambios morfológicos observados en las células de Clara se parecen en parte a los observados en los pulmonares de los animales deficientes de CCSP (*CCSP<sup>-/-</sup>*), en dónde la falta de CCSP genera alteraciones ultraestructurales relevantes, como carencia de gránulos de secreción y reducción del contenido en retículo endoplasmático rugoso (Giangreco et al., 2002). Alteraciones similares en la morfología del epitelio bronquiolar también se han encontrado en ratones deficientes de *Sox2* y *FoxM1*, factores de transcripción implicados en la diferenciación del epitelio pulmonar y necesarios para mantener la pluripotencialidad de las células precursoras y su adecuada diferenciación a los diferentes tipos epiteliales de las vías respiratorias (no ciliadas, ciliadas y mucosecretoras) (Tompkins et al., 2009; Ustiyani et al., 2012).

Resulta curioso que a pesar de que por tinciones inmunohistoquímicas se aprecia un descenso en la expresión de CCSP, aunque las dos líneas de mutantes los niveles medios son menores en ninguna se aprecia un descenso significativo en los niveles de su ARNm. Sin embargo, aunque tampoco significativa, sí se aprecia una reducción de casi el 25% en los niveles de expresión de ARNm de *Cyp2f2* en la línea *Nkx2.1-Cre; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, un gen específico de las células de Clara. Las razones de las discrepancias en los niveles de CCSP no se conocen, y requerirá realizar experimentos adicionales para aclarar estos resultados. Sería interesante, por ejemplo, determinar si hay una reducción en los niveles totales de proteína CCSP en el pulmón completo (p.e por *Western blot*, evaluar precisamente si el descenso de expresión de CCSP sólo ocurre en las células de Clara de los bronquiolos terminales, pero no en otras zonas

más proximales de las vías respiratorias que también contienen células de Clara, o estudiar cambios en la estabilidad del ARNm de CCSP mediados por el IGF1R. En la línea *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* una de las posibles razones de esta discrepancia entre los niveles de proteína y ARNm podría ser el gran mosaicismo observado en la expresión de *Cre*, que no permite generar diferencias cuantitativas cuando se analizan los niveles de ARNm de CCSP en extractos del pulmón completo.

El fenotipo en el epitelio bronquiolar terminal es siempre mucho más generalizado y acusado en los ratones *Nkx2.1-Cre; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* cuando se comparan zonas sin expresión de IGF1R (es decir, que ya han sufrido la delección mediada por *Cre* en *Igf1r*) entre ambas líneas. Esto puede ser consecuencia de que la delección en el locus *Igf1r* durante la diferenciación de las células epiteliales, ocurre siempre antes en esta línea que en la línea *CCSP-Cre; Igf1r<sup>fl/fl</sup>*. La razón de ello estribaría en que la expresión de *Nkx2.1*, y por lo tanto la de *Cre* en el transgen *Nkx2.1-Cre*, precede a la de CCSP (y por lo tanto la de *Cre* en el transgen *CCSP-Cre*) durante la ontogenia y diferenciación de las células del epitelio pulmonar (Morrissey and Hogan, 2010; Reynolds and Malkinson, 2010; Chen et al., 2011). Es más, la expresión de CCSP está controlada por transactivación del promotor de su gen por el factor de transcripción *Nkx2.1* (Nord et al., 2000; Cassel et al., 2002). Si la delección en *Igf1r* durante la diferenciación epitelial ocurre antes, IGF1R también faltará antes y por lo tanto cabe esperar un fenotipo más acusado.

En ninguna de las líneas de mutantes condicionales *Igf1r<sup>-/-</sup>* se aprecian diferencias significativas en la proliferación celular del epitelio, por lo que parece que la delección de IGF1R en este tipo celular no afecta a su proliferación en las condiciones normales del desarrollo. Sin embargo en los ratones *Nkx2.1-Cre; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* la media del número de células marcadas con BrdU muestra una tendencia a ser casi 1,5 veces más alta, aunque las diferencias con los animales control no son significativas por la dispersión de datos y porque el número de células BrdU<sup>+</sup> durante las dos horas de marcaje es muy bajo. Será interesante determinar la tasa de proliferación del epitelio durante los procesos de regeneración del epitelio bronquiolar tras el daño, por ejemplo inducido con naftaleno, experimento no incluido en esta Tesis. Paradójicamente, no sería de extrañar que la carencia de expresión de IGF1R o alteraciones de su señalización en el pulmón aumente sus tasas de proliferación celular. De hecho los pulmones de los embriones prenatales *Igf1r<sup>-/-</sup>* e *Igf1<sup>-/-</sup>* también presentan índices de proliferación celular mucho más altos que los animales normales (Moreno-Barriuso et al., 2006; Epaud et al., 2012) (Pais, 2013). En este sentido cabe mencionar que el aumento de la proliferación en células deficientes de IGF1R parece depender del tipo celular. Por ejemplo, se ha descrito que la mutación condicional de IGF1R en el epitelio de la próstata también aumenta su proliferación, generando hiperplasias, e incluso carcinomas cuando las células además poseen alteraciones en los mecanismos de supresión de tumores mediados por p53 (Sutherland et al., 2008). Por el contrario, la mutación condicional *in vivo* de *Igf1r* en hepatocitos, células de Sertoli o queratinocitos de la epidermis reduce sus índices de

proliferación (Cadoret et al., 2005; Desbois-Mouthon et al., 2006; Sadagurski et al., 2006; Froment et al., 2007).

Otra de las razones del fenotipo histológico observado en el epitelio bronquiolar de los mutantes también pudiese ser consecuencia de alteraciones en los niveles de la muerte celular, dado que IGF1R es un receptor con funciones de supervivencia celular ampliamente documentadas, incluido en el contexto del desarrollo pulmonar. En este sentido está descrito que los niveles de apoptosis están considerablemente elevados en los pulmones prenatales de embriones *Igf1r*<sup>-/-</sup> (Epaud et al., 2012).

Además de los cambios que parece que sufren las células de Clara en las dos líneas de mutantes condicionales, también sería interesante determinar si sufren alteraciones en otros tipos de células epiteliales que pudiesen verse afectadas por su posible origen en un precursor común con las células de Clara (Reynolds and Malkinson, 2010; Rock and Hogan, 2011; Wansleeben et al., 2013). Aunque en inmunotinciones con un anticuerpo para Glu-tubulina parece que la proporción de células ciliadas esté reducida en los bronquiolos terminales de la línea *CCSP-Cre*<sup>Tg/+</sup>; *Igf1r*<sup>fl/fl</sup>, será preciso una mejor cuantificación de estas células para sacar conclusiones. De la misma forma será necesario cuantificar las proporciones de otros tipos celulares, usando marcadores específicos.

Aunque en la línea *Nkx2.1-Cre*; *Igf1r*<sup>fl/fl</sup> la falta de IGF1R también se extiende a las AEC2, no se han apreciado cambios morfológicos evidentes en la zona alveolar de los pulmones de los ratones de esta línea. Este resultado está en consonancia con que no se distinguen alteraciones en los niveles de expresión de la proteína SPC, un marcador de identidad de las células AEC2 (Morrisey and Hogan, 2010; Reynolds and Malkinson, 2010; Chen et al., 2011), ni a nivel de ARNm, ni por tinción inmunohistoquímica. El hecho de que tampoco se hayan detectado alteraciones en los niveles de ARNm de *Nkx2.1* indica que la carencia de *Igf1r* no altera la expresión de este factor de transcripción. Por lo tanto no parece que exista interferencia en la regulación del promotor endógeno de *Nkx2.1*, por competencia con el promotor de este gen localizado en el transgen *Nkx2.1-Cre*, que es el que también dirige *Cre* para generar la delección en el locus *Igf1r*. La evaluación de los posibles efectos de la mutación de *Igf1r* en el pulmón de esta línea de mutantes, y en concreto en el mantenimiento de la homeostasis de la zona alveolar requerirá estudios adicionales, como por ejemplo realizar un análisis morfométrico detallado del pulmón, o evaluar la capacidad de regeneración tras un daño específico en el compartimento alveolar.

### **3.2. IGF1R es necesario para una adecuada regeneración del epitelio bronquiolar terminal tras el daño**

Los experimentos para determinar la implicación de IGF1R en la resistencia pulmonar al daño y regeneración de las células epiteliales se han realizado sometiendo a los animales a

la toxicidad del naftaleno, que produce muerte celular de las células de Clara (Volckaert et al., 2011), y también mediante hiperoxia, que aunque daña principalmente el parénquima alveolar también afecta el epitelio bronquiolar (Weinberger et al., 2002; Pagano and Barazzone-Argiroffo, 2003; Asselin-Labat and Filby, 2012). En esta Tesis sólo se describen los experimentos realizados en los ratones mutantes condicionales *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>*; *Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, que cómo ya se ha mencionado presentan alteraciones en la diferenciación de las células de Clara, aunque no de forma generalizada debido a su mosaicismo.

Las células de Clara del epitelio bronquiolar más distal expresan altos niveles de IGF1R. Al eliminarse estas células con naftaleno, la expresión de IGF1R en esta zona del epitelio pulmonar se pierde casi por completo en el tercer día tras la lesión (D3). Las células ciliadas que se transdiferencian para recubrir la zona afectada tras la lesión (Volckaert et al., 2011), y que también presentan expresión de IGF1R en la parte apical, tampoco mantienen la expresión de IGF1R que en principio poseían. Cuando en el D7 las células de Clara empiezan a regenerarse, y después repueblan casi completamente el epitelio en D14, la expresión de IGF1R se va recuperando progresivamente, y en paralelo la expresión de CCSP. En los pulmones de ratones *CCSP-Cre<sup>Tg/+</sup>*; *Igf1r<sup>fl/fl</sup>*, la dinámica de recuperación de la expresión de CCSP e IGF1R en las células de Clara no afectadas por la delección de *Igf1r* es la misma que en los ratones normales. En las zonas del epitelio con la mutación en *Igf1r* (sin expresión de IGF1R) la expresión de CCSP es mucho más baja, pero perfectamente identificable en las células de Clara afectadas por la pérdida de IGF1R. El hecho que durante la regeneración, en los días D7 e incluso en el D14, existan zonas del epitelio con deficiencia de IGF1R que no recuperen esta mínima expresión de CCSP, demuestra que la falta del receptor de IGFs altera o retrasa la diferenciación de las células de Clara durante su regeneración.

En nuestros experimentos de ablación de las células de Clara con naftaleno, en el D3 las células de los BASCs además de expresar bajos niveles de CCSP también expresan IGF1R. Estas células CCSP<sup>+</sup> resistentes al naftaleno son consideradas las progenitoras de las células bronquiales que se regeneran (Reynolds et al., 2000; Rawlins et al., 2008; Rawlins et al., 2009b), ya que no hay evidencia de células basales en las vías respiratorias más pequeñas del ratón (Pack et al., 1981) y consideradas las precursoras epiteliales en las vías respiratorias más proximales. Si en estas células progenitoras de las de Clara se activa el promotor de CCSP, aunque sea con baja actividad, también permitirá que se active el transgen *CCSP-Cre* para producir la recombinasa *Cre* y causar la delección de IGF1R en las células de los BASCs. Aunque no se ha estudiado en detalle, sería de esperar que IGF1R también esté expresado en las denominadas células de Clara *variantes* o *Clara<sup>V</sup>* en zonas más proximales de los bronquiolos, ya que estas células también se suponen precursoras de las de Clara (Giangreco et al., 2007; Rawlins et al., 2009a; Rawlins et al., 2009b; Reynolds and Malkinson, 2010; Rock and Hogan, 2011; Wansleeben et al., 2013). Es posible que la eliminación de IGF1R en esta población de células precursoras de las de Clara altere de alguna forma su programa de

diferenciación, y por lo tanto impidiendo que el epitelio del bronquiolo terminal se regenere adecuadamente.

En los pulmones de los ratones normales, después de las 72 h de hiperoxia, las células de Clara de los bronquiolos distales sufren un considerable descenso de la expresión tanto de CCSP como de IGF1R, para recuperar la expresión normal a las 48 horas después de terminado el daño. El descenso de CCSP tras la hiperoxia coincide con lo descrito previamente (Ramsay et al., 2003). Sin embargo existen discrepancias con datos previos obtenidos para IGF1R en pulmones de ratas sometidas a hiperoxia durante 48 h, ya que los autores observan que los niveles de IGF1R aumentan ligeramente tras la hiperoxia (Narasaraju et al., 2006). Las causas de estas diferencias son desconocidas, pero podrían ser debidas a diferencias en el protocolo del tratamiento de los animales, o a diferencias en la respuesta a la hiperoxia del epitelio bronquiolar entre ratones y ratas. Descensos en la expresión de CCSP también se han descrito en otros modelos de daño pulmonar, como por ejemplo en el pulmón de ratas a las que se le ha provocado inflamación pulmonar aguda tras la administración de polisacáridos (Arsalane et al., 2000). En los animales mutantes condicionales  $CCSP-Cre^{Tg/+}; Igf1r^{fl/fl}$ , las zonas del epitelio bronquiolar sin IGF1R apenas sufren una bajada en la expresión de CCSP, porque aunque con bajos niveles sigue apreciándose tras la hiperoxia, y siguen también manteniéndose en estos niveles bajos tras las 48 horas después de finalizada la hiperoxia.

En todos los casos en que se ha determinado simultáneamente la expresión de IGF1R y CCSP en el epitelio de los bronquiolos terminales mediante co-inmunotinciones, los niveles de expresión de ambas proteínas siempre cambian en paralelo. Esto es así tanto en los pulmones normales como en los mutantes condicionales, y tanto en condiciones normales como tras el daño con naftaleno o hiperoxia. Este paralelismo da a entender que IGF1R controla férreamente la expresión de CCSP. Para apoyar esta hipótesis en la regulación de la expresión de CCSP participan entre otros los factores de transcripción Nkx2.1/TTF1 y c-Jun (Nord et al., 2000; Cassel et al., 2002; Ramsay et al., 2003), genes cuya expresión se ha demostrado que está reducida o alterada en los pulmones de ratones neonatos o prenatales  $Igf1^{-/-}$  (Pichel et al., 2003; Moreno-Barriuso et al., 2006; Pais, 2013).

Múltiples evidencias experimentales obtenidas de la caracterización fenotípica de los ratones *knock out* de CCSP ( $CCSP^{-/-}$ ) demuestran que esta proteína es esencial para mantener la homeostasis pulmonar debido a sus funciones antifibróticas, antitumorales, antiinflamatorias y de protección de lesiones en las vías respiratorias. En este sentido los ratones deficientes de CCSP poseen mayores síntomas de inflamación tras las infecciones víricas o de tras inducirles asma alérgica (Harrod et al., 1998; Ray et al., 2005), y en este sentido los pulmones de embriones prenatales  $Igf1^{-/-}$  también presentan expresión elevada y presencia de células inflamatorias (Pais, 2013). Será interesante estudiar si los pulmones de los nuevos ratones mutantes  $CCSP-Cre; Igf1r^{fl/fl}$  y  $Nkx2.1-Cre; Igf1r^{fl/fl}$  presentan síntomas de inflamación. Los ratones  $CCSP^{-/-}$  también son más propensos a desarrollar fibrosis pulmonar (Lee et al., 2006b),

sin embargo los resultados obtenidos de ratones con fibrosis inducida por bleomicina, y con la señalización reducida de IGF1R mediante el tratamiento con el anticuerpo A12 bloqueante de su actividad, discreparían de la interrelación CCSP/IGF1R, ya que en este caso el bloqueo de la señalización por IGF1R curan la fibrosis (Choi et al., 2009; Kim et al., 2012c). Los ratones  $CCSP^{-/-}$  cuando se tratan con el carcinógeno nitrosaminado NNK también son más susceptibles a generar tumores pulmonares (Yang et al., 2004). Aunque desconocemos si la falta de IGF1R en el epitelio pulmonar poseen esta sensibilidad a desarrollar tumores, el índice de proliferación de los pulmones  $Nkx2.1-Cre; Igf1r^{fl/fl}$  es considerablemente más elevado durante la regeneración tras la lesión con naftaleno (datos no presentados aquí). Será interesante someter a estos ratones a un desafío de susceptibilidad a tumores (tratamiento con mutágenos, oncogenes o con genes supresores de tumores comprometidos), para determinar su susceptibilidad tumorigénica en el pulmón. Aunque es lógico considerar que la carencia de IGF1R genere señalización anti-proliferativa, existen excepciones dependiendo del tejido, que como ya se ha mencionado, la mutación condicional de IGF1R en el epitelio de la próstata aumenta la proliferación, y genera hiperplasias y carcinomas prostáticos (Sutherland et al., 2008).

En nuestro estudio observamos que los ratones mutantes condicionales  $CCSP-Cre^{Tg/+}; Igf1r^{fl/fl}$  tampoco poseen problemas de ventilación respiratoria tras la hiperoxia, incluso después de someterlos a dosis crecientes del fármaco broncoconstrictor metacolina. Este resultado es en parte esperado, porque las alteraciones en estos ratones están limitadas a las células epiteliales de Clara, y no debería afectar a la fisiología respiratoria. Será interesante determinar si la capacidad ventilatoria pulmonar de los animales mutantes  $Nkx2.1-Cre; Igf1r^{fl/fl}$  sometidos a hiperoxia está alterada, ya que en estos ratones la carencia de IGF1R se extiende al epitelio del compartimento alveolar, zona del pulmón más sensible a la hiperoxia. El interés de estos experimentos estaría fundamentado por trabajos previos obtenidos en ratones mutantes con un alelo hipomorfo de  $Igf1r$ , con niveles reducidos de IGF1R en todo el organismo, que al ser sometidos a hiperoxia presentan resistencia al daño pulmonar, caracterizado por una mayor supervivencia, mejores parámetros ventilatorios y carencia de edema alveolar (Ahamed et al., 2005).

Está ampliamente documentado que la señalización mediada por IGF1/IGF1R está implicada en la génesis y/o progresión de muchas enfermedades pulmonares como la broncodisplasia pulmonar, la fibrosis, el asma, e incluso el cáncer de pulmón, tanto en modelos animales, como en pacientes (Chetty et al., 2005; Narasaraju et al., 2006) (Han et al., 1996b; Khandwala et al., 2000; Yu and Rohan, 2000; Furstenberger and Senn, 2002; Krein and Winston, 2002; Krein et al., 2003; Chetty et al., 2004; Pollak et al., 2004; Zaher et al., 2007; Pollak, 2008; Werner and Bruchim, 2009; Yin et al., 2009; Dziadziuszko et al., 2010; Rajski et al., 2010; Gallagher and LeRoith, 2011; Shersher et al., 2011; Yang and Winslet, 2011; Pollak, 2012). Cómo se ha mencionado más arriba la reducción de la expresión de IGF1R o el bloqueo de su señalización en modelos animales, redundan en un menor daño pulmonar tras una lesión,

por eso será interesante valorar el posible uso clínico de fármacos para el tratamiento de enfermedades respiratorias en donde esté demostrada la señalización mediada por IGF1R. Para el bloqueo de IGF1R existen múltiples fármacos en período de evaluación en ensayos clínicos, que en su mayoría son anticuerpos monoclonales pensados y diseñados para el tratamiento del cáncer de pulmón (Dziadziuszko et al., 2008; Kim et al., 2009; Massoner et al., 2010; Belani et al., 2012; Pollak, 2012). Sería interesante probar a extender su uso en otras enfermedades pulmonares. Para ello será fundamental disponer de modelos animales y protocolos experimentales que modelen estas enfermedades y que nos permitan estudiar sus bases moleculares y testar fármacos adecuados para su tratamiento.

### **3.3. La falta de IGF1R en el epitelio pulmonar genera colonias más grandes de células madre cultivadas *in vitro* incrementando el número de progenitores indiferenciados**

Los datos presentados sobre el cultivo *in vitro* de colonias de células madre derivadas de ratones mutantes condicionales *CCSP-Cre; Igf1r<sup>f/f</sup>* y *Nkx2.1-Cre; Igf1r<sup>f/f</sup>*, son preliminares y necesitan ser replicados y sobre todo ampliados para poder sacar conclusiones claras y definitivas. Sin embargo el hecho de que los resultados obtenidos de colonias de las dos líneas coincidan o se complementen también les da mayor fiabilidad. Los datos obtenidos de los cultivos de colonias *CCSP-Cre; Igf1r<sup>f/f</sup>* son bastante difíciles de filtrar y diferenciar de los obtenidos de las colonias control *Igf1r<sup>f/f</sup>*. A pesar de los múltiples experimentos realizados con estas células, se han podido obtener pocas conclusiones definitivas. La razón de esto es doble, por una parte es probablemente consecuencia del alto mosaicismo que presentan estos animales en la delección de *Igf1r* en el pulmón, generándose cultivos poco puros con una gran cantidad de colonias que no han sufrido la delección (con genotipo *Igf1r<sup>f/f</sup>*). Por otra parte se puede deber a que las células pierden IGF1R ya en etapas avanzadas durante su camino hacia la diferenciación, cuando ya se activa la expresión del marcador de diferenciación CCSP (y la concomitante expresión de *Cre*) que las conduce a la línea de diferenciación a células bronquiales de Clara y ciliadas (Rawlins et al., 2009b). En este caso dependiendo de la efectividad y rapidez de *Cre* para producir la delección de IGF1R, es posible que existan pocas células que hayan sufrido la delección con características de células madre, para mantenerse en un medio de cultivo que selecciona negativamente células con programas de diferenciación activados. En realidad esta baja proporción de células *Igf1r<sup>-/-</sup>* se aprecia en las PCRs para determinar la delección en las colonias de estos ratones. A pesar de la alta sensibilidad de la técnica, se generan bandas de amplificación apenas perceptibles del fragmento del alelo de *Igf1r* con la delección. Por el contrario, en el caso de los cultivos derivados de los animales *Nkx2.1-Cre; Igf1r<sup>f/f</sup>*, el fenotipo final de las colonias es mucho más diferenciable del de las colonias control. En este caso el promotor de *Nkx2.1* que dirige *Cre* se activa en etapas de destino celular más tempranas y las células probablemente sufren la delección de *Cre* en estadios más tempranos de la diferenciación epitelial (Tiozzo et al., 2009; Morrissey and Hogan,

2010; Whitsett et al., 2011). De esta forma las células de las colonias se mantienen un estado más indiferenciado y permiten que se generen colonias con un mayor número de células con este fenotipo, antes de que ocurra la delección. Aunque no se ha cuantificado, el rendimiento en el número de colonias modificadas en estos cultivos también debería ser mayor porque la delección de IGF1R mediada por Cre con expresión controlada por el promotor de Nkx2.1, al igual que lo hace la expresión endógena de Nkx2.1, se extiende también al compartimento de las células alveolares AEC2 (Tiozzo et al., 2009; Morrissey and Hogan, 2010; Whitsett et al., 2011). Hasta el momento no se han apreciado indicios significativos de que el número de colonias totales generados a partir de los ratones *Nkx2.1-Cre; Igf1r<sup>f/f</sup>* sea más alto, pero será otro parámetro a tener en cuenta para su determinación en experimentos futuros.

Hasta hace unos años, e incluso algunos autores lo siguen suponiendo así hoy en día, se consideraba que las células madre bronquioalveolares (BASCs) que co-expresan bajos niveles de CCSP y SpC, y localizadas sobre todo en las uniones bronquioalveolares o BADJ, eran la que contribuían a generar células del epitelio de las bronquiolos y de los alveolos. Sin embargo, un trabajo muy detallado del grupo de la Dra. Brigid Hogan en la Universidad de Duke (Durham, NC) publicado en el año 2009, demuestra casi irrefutablemente que las células que expresan CCSP sólo van a contribuir a la generación de células bronquiolares, sobre todo células de Clara, pero también ciliadas, pero nunca células del compartimento alveolar (Rawlins et al., 2009b). Un estudio más reciente del mismo grupo también demuestra que las células alveolares AEC2 que expresan SPC, se comportan como células madre del epitelio alveolar, y tras un daño alveolar masivo son capaces de regenerar más células AEC2, y también diferenciarse a las células AEC1 (Barkauskas et al., 2013). En las colonias derivadas de los cultivos de tipo *Igf1r<sup>f/f</sup>* sólo aparecen esporádicamente células o grupos muy pequeños de células que son SpC<sup>+</sup> en la parte exterior de las colonias, sin embargo aparecen casi siempre, y también en su periferia, células que se tiñen suavemente para CCSP. Esto podría indicar que la mayoría de las colonias en el cultivo son de origen bronquiolar, o alternativamente que las células SPC<sup>+</sup> son menos tolerantes al medio de cultivo que selecciona células madre, y se mueren más rápidamente. En estas colonias *Igf1r<sup>f/f</sup>*, también siempre se observa una proporción de células IGF1R<sup>+</sup> en la periferia, muchas de ellas co-expresando CCSP. En todos los casos en el centro de la colonia siempre existe una proporción variable de células pequeñas y fuertemente adheridas entre sí, con características de células madre porque expresan Sca1. En las colonias grandes de los pulmones mutantes condicionales de ambos genotipos, se aprecian esporádicamente células muy en la periferia que expresan CCSP y muy raramente SpC. En estas colonias tampoco se observan células IGF1R<sup>+</sup>, o si se detectan están como adheridas a la periferia, nunca inmersas en la masa celular de las colonias, como ocurre en las colonias control. Dado que se supone que estas colonias poseen delección de IGF1R, estas células podrían originarse debido a no haber sufrido una delección efectiva de IGF1R, por un efecto mosaico en la expresión de Cre por el promotor del transgen (es decir unas expresarían Cre y otras no, por lo tanto unas sufren delección y otras no). Otra

explicación es que se hubiesen adherido a la parte externa de la colonia durante su procesamiento para el citospin.

Los cultivos de colonias de células madre pulmonares *in vitro* demuestran que la supresión de *Igf1r* durante la diferenciación celular epitelial aumenta la proporción de células progenitoras epiteliales de pulmón, generando colonias más grandes y con mayor proporción de células precursoras indiferenciadas. Este resultado puede interpretarse como un resultado del balance entre tres procesos celulares: el índice de proliferación, la capacidad de diferenciación y la tasa de muerte de las células en las colonias. Puede que las células *Igf1r<sup>-/-</sup>* en las colonias en cultivo proliferen más, que se mueran menos, o alternativamente que se diferencien menos eficientemente, y por lo tanto resistan mejor las condiciones del cultivo que las selecciona como células indiferenciadas. Según este último supuesto las células de las colonias normales *Igf1<sup>fl/fl</sup>* se deberían morir en mayor cantidad que en las colonias mutantes. Y este parece ser el caso porque cuando se observan los cultivos bajo el microscopio las colonias de los cultivos control presentan contornos más irregulares, con restos celulares desprendiéndose, que se podrían corresponder con células muertas. Por el contrario las colonias mutantes siempre presentan un aspecto más compacto y denso, sin restos celulares alrededor. Sin embargo estas observaciones no concordarían con los mayores índices de apoptosis encontrados en los pulmones prenatales *Igf1r<sup>-/-</sup>* (Epaud et al., 2012). Será interesante determinar la tasa de apoptosis en ambos tipos de colonias para aclarar un posible efecto diferencial sobre la muerte celular. Tampoco se han determinado cuantitativamente los índices de proliferación para determinar diferencias entre colonias de diferente genotipo. Cabría esperar que la proliferación fuese más alta en las células deficientes de *Igf1r*, ya que la proliferación en los pulmones embrionarios de ratones *Igf1r<sup>-/-</sup>* e *Igf1<sup>-/-</sup>* también es más elevada (Moreno-Barriuso et al., 2006; Epaud et al., 2012; Pais, 2013). Sin embargo, datos preliminares obtenidos de la incorporación de BrdU no parecen indicar diferencias entre las colonias *Nkx2.1-Cre; Igf1r<sup>fl/fl</sup>* y sus controles. Por exclusión, la mejor hipótesis parece ser que el fenotipo de las colonias deficientes de IGF1R es sobretodo resultado de un retraso en la diferenciación de las células, que se beneficiarían de las condiciones de cultivo favorables en un medio selectivo para células indiferenciadas. Esta interpretación estaría avalada por el retraso de la diferenciación encontrado en las células epiteliales de los pulmones prenatales *Igf1r<sup>-/-</sup>* e *Igf1<sup>-/-</sup>* (Moreno-Barriuso et al., 2006; Epaud et al., 2012; Pais, 2013), y también por el retraso en la diferenciación observado en las células del epitelio bronquiolar tras la lesión por naftaleno. Aunque no cabe descartar que el resultado final sea un equilibrio entre diferentes procesos celulares, parece que la alteración de la diferenciación sea el más relevante para generar el fenotipo de las colonias con delección condicional de IGF1R.

La implicación de IGF1R en la biología de las células madre es un tema relativamente reciente y novedoso, empezando a dispararse el número de publicaciones en este campo desde hace unos seis años a esta parte. Dos revisiones bibliográficas recientes discuten diferentes aspectos publicados sobre la participación de la señalización mediada por IGFs en

en el mantenimiento y diferenciación de las células madre pluripotentes (Li and Geng, 2010; Ratajczak et al., 2010). La bibliografía al respecto sostiene que el IGF1R desempeña un papel crítico en la regulación de las funciones de las células madre de diferentes orígenes, tanto embrionarias como específicas de tejido (Torella et al., 2004; Bendall et al., 2007; Thum et al., 2007; Wang et al., 2007a; Fleissner and Thum, 2008; Padin-Iruegas et al., 2009). La señalización de los IGFs, tanto a través de la vía de PI3K, como de las MAP kinasas, sustentaría la capacidad de autorenovación y diferenciación de las células madre, de promover su supervivencia y migración, y también la de prevenir su senescencia (Nguyen et al., 2007; Ponte et al., 2007; Huang et al., 2009; Chen and Khillan, 2010). Fundamentando estos datos, también hay trabajos que demuestran que los IGFs aumentan la expresión y la actividad de proteínas como Oct4, Nanog y telomerasa, que son factores críticos en la generación de células madre pluripotentes inducidas (Torella et al., 2004; Bendall et al., 2007; Thum et al., 2007; Wang et al., 2007a; Gonzalez et al., 2008; Kimber et al., 2008; Huang et al., 2009).

Sin embargo, aunque estos estudios hacen referencia a células madre embrionarias, o de diferentes tipos de tejidos, como endotelio, mesénquima, músculo cardíaco, médula ósea, etc., poco se sabe de momento de la implicación de IGF1R en el pulmón normal. Lo poco que se sabe está relacionado sobre todo a la participación de la señalización de IGF1R en el comportamiento de las células madre de cáncer de pulmón, bien a través de la mediación de Fibulina-3 (Chen and Khillan, 2010) o  $\beta$ -Catenina/Pou5/Sox2 (Xu et al., 2013), o alternativamente como mediador de la señalización de Notch-1 (Elias et al., 2010). Como se ha mencionado las dos vías principales mediadoras de la señalización de IGF1R, PI3K y MAP kinasas, participan de alguna forma en la biología de las células madre. Hay autores que sostienen que el balance de la señalización entre ellas, y la señalización cruzada con otro tipo de vías de transducción de señales como la vía de Wnt y la vía de los SMADs, serían las responsables de mantener la proporción adecuada de células madre (Dalton, 2013). Existen datos publicados de ratones mutantes de mediadores de señalización de IGF1R, tanto de la vía de PI3K como de la de MAPK que presentan alteraciones en el comportamiento de las células madre pulmonares. Por una parte los animales deficientes de PTEN, una fosfatasa que antagoniza la ruta de señalización PI3K-AKT/PKB, afecta a la diferenciación de diversos linajes de células epiteliales de pulmón, causando una disminución del número de células diferenciadas terminalmente, que hacen que las células del BADC formen masas con características de células madre pro-carcinogénicas (Tiozzo et al., 2009). La alteración de esta vía, al menos en lo referente a PTEN, no encaja en los resultados obtenidos de los cultivos de células madre de los mutantes condicionales de IGF1R en el epitelio pulmonar. En ambos casos se observa un aumento en el contenido de células madre epiteliales en el pulmón, un resultado antagónico al esperado. En contrapartida, los animales mutantes con ausencia de actividad catalítica de la p38 $\alpha$ , una MAP kinasa que se ha descrito que regula la totipotencialidad de las células madre pulmonares en humanos (Oeztuerk-Winder et al., 2012),

presentan un epitelio de pulmón inmaduro e hiperproliferativo que es altamente sensible a la tumorigénesis inducida por la mutación en K-ras (G12V), mediante la activación de PDK1 (independiente de Akt y de la actividad de ERK), de la mejora de la supervivencia, y aumentando la proliferación, con una selección específica de células positivas para Sca-1/Sox9 con alto poder tumorigénico y metastático (Ventura et al., 2007; Voisset et al., 2013). La concordancia de estos resultados con los descritos en esta Tesis en lo relativo a los cultivos de células madre de los ratones mutantes condicionales de IGF1R, apoya la hipótesis de que IGF1R esté implicado en el control de las células madre pulmonares a través de la señalización por p38 $\alpha$ .

Cabe la posibilidad de que la señalización por la vía Wnt también medie las acciones de IGF1R sobre precursores epiteliales del pulmón, ya que genes de esta vía o sus dianas, como Wnt5a y  $\beta$ -catenina, regulan la totipotencialidad de las células madre embrionarias (Sato et al., 2004), y específicamente la diferenciación de las células madre o progenitoras bronquiolares a células diferenciadas del epitelio respiratorio, sin aumentar su tasa de proliferación (Mucenski et al., 2005; Reynolds et al., 2008; Ghosh et al., 2013). Pero aunque se desconoce su posible alteración en los pulmones de los mutantes condicionales de IGF1R en el pulmón adulto, la expresión de genes de esta vía de transducción de señales se ha demostrado que está alterada en los pulmones embrionarios *Igf1*<sup>-/-</sup> (Pais, 2013). Por todo ello, la vía de señalización de Wnt también pudiera estar implicada en la mediación de la generación y diferenciación de las células progenitoras epiteliales pulmonares.

Los datos preliminares obtenidos del cultivo de células madre de los ratones mutantes condicionales *CCSP-Cre; Igf1r*<sup>fl/fl</sup> y *Nkx2.1-Cre; Igf1r*<sup>fl/fl</sup> abren un abanico de posibilidades para abordar su estudio con mayor profundidad. Entre ellas cabe mencionar: i) la posibilidad de que estos animales sean propensos a generar tumores de pulmón después de someterlos a un compromiso con oncogenes, mutaciones de genes supresores de tumores, o incluso con mutágenos; ii) la posibilidad de que tengan resistencia diferencial al daño del epitelio de forma aguda, así como a generar lesiones a largo plazo después de un daño más prolongado o crónico (fibrosis, asma, EPOC, etc.), debido a una mayor plasticidad de sus células madre pulmonares; y iii) la posibilidad que sus células madre pulmonares tengan mayor flexibilidad para recolonizar pulmones dañados, y así ser susceptibles de ser usadas para la regeneración tisular del pulmón dañado, no sólo usando células madre pulmonares *Igf1r*<sup>-/-</sup>, sino extrapolando este resultado al uso de células normales tratadas farmacológicamente para mantener bloqueada la señalización por IGF1R. Como se aprecia, el avance de la comprensión de los mecanismos moleculares de la señalización por IGF1R en el control de la diferenciación de las células madre del epitelio pulmonar usando animales modelo facilita el desarrollo de estrategias experimentales extrapolables a la terapia específica de pacientes, no sólo en enfermedades en las que estas células tengan relevancia, como el cáncer de pulmón u otras enfermedades respiratorias, sino también en posibles aplicaciones de la modulación del

comportamiento de las células madre pulmonares para favorecer la regeneración del pulmón dañado, o incluso en ingeniería tisular para generar tejido pulmonar *in vitro*.



## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. Los genes del sistema IGF/Ins se expresan en el pulmón de ratón en todos los estadios de su desarrollo, salvo *Igf2* que no se expresa postnatalmente. A excepción de *Igfbp2*, sus niveles son más elevados en los estadios embrionarios y decrecen con la edad.
2. Aunque IGF1R se expresa de forma ubicua en el pulmón murino, sus niveles son altos en el epitelio. En el pulmón adulto destaca su presencia en el epitelio bronquiolar, se encuentra en las células ciliadas y las neuroendocrinas, y sobre todo en las células de Clara. En el epitelio alveolar IGF1R se expresa en los neumocitos de tipo 2, y es indetectable en los de tipo 1.
3. La carencia de IGF1 durante el desarrollo prenatal de los ratones, modifica *in vivo* los niveles de proteínas con función reguladora descrita en el pulmón como factores de transcripción y proteínas matricelulares, aumentando la expresión de Nfib y reduciendo la de Klf2, Egr1 y Ctgf. También reduce la expresión del ARNm de *Igfbp2* y los niveles de activación de ERK2.
4. En los pulmones embrionarios *Igf1<sup>-/-</sup>* cultivados *ex vivo*, IGF1 exógeno induce la remodelación del septo alveolar y la diferenciación del epitelio respiratorio distal, aumentando la expresión de los factores de transcripción Nfib y Klf2, y de la proteína de matriz extracelular Cyr61.
5. IGF1 manifiesta una mayor acción sobre las células pulmonares de tipo epitelial que sobre las mesenquimales embrionarias, tanto induciendo su proliferación como modulando la expresión de los factores de transcripción Nfib, Klf2 y FoxM1, y de las proteínas matricelulares Cyr61 y Ctgf.
6. La carencia de IGF1R en el epitelio respiratorio produce alteraciones morfológicas en el epitelio de los bronquiolos terminales de ratones adultos, y conlleva una alteración o retraso en la diferenciación de las células de Clara, manifestándose sobre todo durante su regeneración tras un daño selectivo con naftaleno.
7. La deficiencia de IGF1R en las células madre de pulmón adulto cultivadas *in vitro* bloquea su diferenciación, generando un aumento del tamaño de las colonias y de la proporción de células progenitoras.



## **BIBLIOGRAFIA**



- Abbas, A., Imrie, H., Viswambharan, H., Sukumar, P., Rajwani, A., Cubbon, R.M., Gage, M., Smith, J., Galloway, S., Yuldeshava, N., *et al.* (2011). The insulin-like growth factor-1 receptor is a negative regulator of nitric oxide bioavailability and insulin sensitivity in the endothelium. *Diabetes* 60, 2169-2178.
- Adams, T.E., McKern, N.M., and Ward, C.W. (2004). Signalling by the type 1 insulin-like growth factor receptor: interplay with the epidermal growth factor receptor. *Growth Factors* 22, 89-95.
- Ahamed, K., Epaud, R., Holzenberger, M., Bonora, M., Flejou, J.F., Puard, J., Clement, A., and Henrion-Caude, A. (2005). Deficiency in type 1 insulin-like growth factor receptor in mice protects against oxygen-induced lung injury. *Respiratory research* 6, 31.
- Alejandre-Alcazar, M.A., Kwapiszewska, G., Reiss, I., Amarie, O.V., Marsh, L.M., Sevilla-Perez, J., Wygrecka, M., Eul, B., Kobrich, S., Hesse, M., *et al.* (2007). Hyperoxia modulates TGF-beta/BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 292, L537-549.
- Altemeier, W.A., and Sinclair, S.E. (2007). Hyperoxia in the intensive care unit: why more is not always better. *Current opinion in critical care* 13, 73-78.
- Allen, J.T., Knight, R.A., Bloor, C.A., and Spiteri, M.A. (1999). Enhanced insulin-like growth factor binding protein-related protein 2 (Connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 21, 693-700.
- Allen, J.T., and Spiteri, M.A. (2002). Growth factors in idiopathic pulmonary fibrosis: relative roles. *Respiratory research* 3, 13.
- Anderson, K.P., Kern, C.B., Crable, S.C., and Lingrel, J.B. (1995). Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Kruppel-like factor: identification of a new multigene family. *Molecular and cellular biology* 15, 5957-5965.
- Angus, G.E., and Thurlbeck, W.M. (1972). Number of alveoli in the human lung. *J Appl Physiol* 32, 483-485.
- Annunziata, M., Granata, R., and Ghigo, E. (2011). The IGF system. *Acta diabetologica* 48, 1-9.
- Apfeld, J., and Kenyon, C. (1998). Cell nonautonomy of *C. elegans* daf-2 function in the regulation of diapause and life span. *Cell* 95, 199-210.
- Arsalane, K., Broeckaert, F., Knoops, B., Wiedig, M., Toubreau, G., and Bernard, A. (2000). Clara cell specific protein (CC16) expression after acute lung inflammation induced by intratracheal lipopolysaccharide administration. *American journal of respiratory and critical care medicine* 161, 1624-1630.
- Asselin-Labat, M.L., and Filby, C.E. (2012). Adult lung stem cells and their contribution to lung tumourigenesis. *Open biology* 2, 120094.
- Ayadi, A., Zheng, H., Sobieszczuk, P., Buchwalter, G., Moerman, P., Alitalo, K., and Wasyluk, B. (2001). Net-targeted mutant mice develop a vascular phenotype and up-regulate *egr-1*. *The EMBO journal* 20, 5139-5152.
- Baguma-Nibasheka, M., and Kablar, B. (2008). Pulmonary hypoplasia in the connective tissue growth factor (Ctgf) null mouse. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237, 485-493.

Baker, J., Liu, J.P., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75, 73-82.

Barkauskas, C.E., Crouce, M.J., Rackley, C.R., Bowie, E.J., Keene, D.R., Stripp, B.R., Randell, S.H., Noble, P.W., and Hogan, B.L. (2013). Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *The Journal of clinical investigation* 123, 3025-3036.

Baserga, R., Peruzzi, F., and Reiss, K. (2003). The IGF-1 receptor in cancer biology. *International journal of cancer Journal international du cancer* 107, 873-877.

Baserga, R., Sell, C., Porcu, P., and Rubini, M. (1994). The role of the IGF-I receptor in the growth and transformation of mammalian cells. *Cell proliferation* 27, 63-71.

Batchelor, D.C., Hutchins, A.M., Klempt, M., and Skinner, S.J. (1995). Developmental changes in the expression patterns of IGFs, type 1 IGF receptor and IGF-binding proteins-2 and -4 in perinatal rat lung. *Journal of molecular endocrinology* 15, 105-115.

Beck, K.D., Powell-Braxton, L., Widmer, H.R., Valverde, J., and Hefti, F. (1995). IGF1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron* 14, 717-730.

Belani, C.P., Goss, G., and Blumenschein, G., Jr. (2012). Recent clinical developments and rationale for combining targeted agents in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cancer treatment reviews* 38, 173-184.

Bendall, S.C., Stewart, M.H., Menendez, P., George, D., Vijayaragavan, K., Werbowetski-Ogilvie, T., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Yang, J., Bosse, M., *et al.* (2007). IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature* 448, 1015-1021.

Bertin, G., Poujeol, C., Rubera, I., Poujeol, P., and Tauc, M. (2005). In vivo Cre/loxP mediated recombination in mouse Clara cells. *Transgenic research* 14, 645-654.

Berube, K., Prytherch, Z., Job, C., and Hughes, T. (2010). Human primary bronchial lung cell constructs: the new respiratory models. *Toxicology* 278, 311-318.

Bhattacharya, R., Senbanerjee, S., Lin, Z., Mir, S., Hamik, A., Wang, P., Mukherjee, P., Mukhopadhyay, D., and Jain, M.K. (2005). Inhibition of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by the Kruppel-like factor KLF2. *The Journal of biological chemistry* 280, 28848-28851.

Bokov, A.F., Garg, N., Ikeno, Y., Thakur, S., Musi, N., DeFronzo, R.A., Zhang, N., Erickson, R.C., Gelfond, J., Hubbard, G.B., *et al.* (2011). Does reduced IGF-1R signaling in IGF1r<sup>+/-</sup> mice alter aging? *PloS one* 6, e26891.

Borcuk, A.C., Gorenstein, L., Walter, K.L., Assaad, A.A., Wang, L., and Powell, C.A. (2003). Non-small-cell lung cancer molecular signatures recapitulate lung developmental pathways. *The American journal of pathology* 163, 1949-1960.

Breeze, R.G., and Wheeldon, E.B. (1977). The cells of the pulmonary airways. *The American review of respiratory disease* 116, 705-777.

Brigstock, D.R. (2003). The CCN family: a new stimulus package. *The Journal of endocrinology* 178, 169-175.

- Bruning, J.C., Winnay, J., Cheatham, B., and Kahn, C.R. (1997). Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells. *Molecular and cellular biology* 17, 1513-1521.
- Buckpitt, A., Chang, A.M., Weir, A., Van Winkle, L., Duan, X., Philpot, R., and Plopper, C. (1995). Relationship of cytochrome P450 activity to Clara cell cytotoxicity. IV. Metabolism of naphthalene and naphthalene oxide in microdissected airways from mice, rats, and hamsters. *Molecular pharmacology* 47, 74-81.
- Burri, P.H. (2006). Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biology of the neonate* 89, 313-322.
- Cadoret, A., Desbois-Mouthon, C., Wendum, D., Leneuve, P., Perret, C., Tronche, F., Housset, C., and Holzenberger, M. (2005). c-myc-induced hepatocarcinogenesis in the absence of IGF-I receptor. *International journal of cancer Journal international du cancer* 114, 668-672.
- Cadoret, A., Rey, C., Wendum, D., Elriz, K., Tronche, F., Holzenberger, M., and Housset, C. (2009). IGF-1R contributes to stress-induced hepatocellular damage in experimental cholestasis. *The American journal of pathology* 175, 627-635.
- Camacho-Hubner, C., Woods, K.A., Clark, A.J., and Savage, M.O. (2002). Insulin-like growth factor (IGF)-I gene deletion. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 3, 357-361.
- Cao, Y.X., Ramirez, M.I., and Williams, M.C. (2003). Enhanced binding of Sp1/Sp3 transcription factors mediates the hyperoxia-induced increased expression of the lung type I cell gene T1alpha. *Journal of cellular biochemistry* 89, 887-901.
- Cardoso, W.V. (1995). Transcription factors and pattern formation in the developing lung. *The American journal of physiology* 269, L429-442.
- Cardoso, W.V. (2000). Lung morphogenesis revisited: old facts, current ideas. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 219, 121-130.
- Caro, J.F., Poulos, J., Ittoop, O., Pories, W.J., Flickinger, E.G., and Sinha, M.K. (1988). Insulin-like growth factor I binding in hepatocytes from human liver, human hepatoma, and normal, regenerating, and fetal rat liver. *The Journal of clinical investigation* 81, 976-981.
- Carraro, G., del Moral, P.M., and Warburton, D. (2010). Mouse embryonic lung culture, a system to evaluate the molecular mechanisms of branching. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Cassel, T.N., Berg, T., Suske, G., and Nord, M. (2002). Synergistic transactivation of the differentiation-dependent lung gene Clara cell secretory protein (secretoglobin 1a1) by the basic region leucine zipper factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha and the homeodomain factor Nkx2.1/thyroid transcription factor-1. *The Journal of biological chemistry* 277, 36970-36977.
- Catania, M.V., Copani, A., Calogero, A., Ragonese, G.I., Condorelli, D.F., and Nicoletti, F. (1999). An enhanced expression of the immediate early gene, Egr-1, is associated with neuronal apoptosis in culture. *Neuroscience* 91, 1529-1538.
- Cohen, P. (2006). The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 867-873.
- Compennolle, V., Brusselmans, K., Acker, T., Hoet, P., Tjwa, M., Beck, H., Plaisance, S., Dor, Y., Keshet, E., Lupu, F., et al. (2002). Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung

maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nature medicine* 8, 702-710.

Conejero, L., Higaki, Y., Baeza, M.L., Fernandez, M., Varela-Nieto, I., and Zubeldia, J.M. (2007). Pollen-induced airway inflammation, hyper-responsiveness and apoptosis in a murine model of allergy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 37, 331-338.

Costa, R.H., Kalinichenko, V.V., and Lim, L. (2001). Transcription factors in mouse lung development and function. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 280, L823-838.

Crapo, J.D., Barry, B.E., Foscue, H.A., and Shelburne, J. (1980). Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. *The American review of respiratory disease* 122, 123-143.

Criswell, T., Beman, M., Araki, S., Leskov, K., Cataldo, E., Mayo, L.D., and Boothman, D.A. (2005). Delayed activation of insulin-like growth factor-1 receptor/Src/MAPK/Egr-1 signaling regulates clusterin expression, a pro-survival factor. *The Journal of biological chemistry* 280, 14212-14221.

Crystal, R.G., Randell, S.H., Engelhardt, J.F., Voynow, J., and Sunday, M.E. (2008). Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proceedings of the American Thoracic Society* 5, 772-777.

Curran, T., and Franza, B.R., Jr. (1988). Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* 55, 395-397.

Che, W., Lerner-Marmarosh, N., Huang, Q., Osawa, M., Ohta, S., Yoshizumi, M., Glassman, M., Lee, J.D., Yan, C., Berk, B.C., *et al.* (2002). Insulin-like growth factor-1 enhances inflammatory responses in endothelial cells: role of Gab1 and MEKK3 in TNF-alpha-induced c-Jun and NF-kappaB activation and adhesion molecule expression. *Circulation research* 90, 1222-1230.

Chen, C.C., and Lau, L.F. (2009). Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41, 771-783.

Chen, J., Somanath, P.R., Razorenova, O., Chen, W.S., Hay, N., Bornstein, P., and Byzova, T.V. (2005). Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo. *Nature medicine* 11, 1188-1196.

Chen, L., and Khillan, J.S. (2010). A novel signaling by vitamin A/retinol promotes self renewal of mouse embryonic stem cells by activating PI3K/Akt signaling pathway via insulin-like growth factor-1 receptor. *Stem Cells* 28, 57-63.

Chen, P.P., Li, W.J., Wang, Y., Zhao, S., Li, D.Y., Feng, L.Y., Shi, X.L., Koeffler, H.P., Tong, X.J., and Xie, D. (2007). Expression of Cyr61, CTGF, and WISP-1 correlates with clinical features of lung cancer. *PLoS one* 2, e534.

Chen, S., Rong, M., Platteau, A., Hehre, D., Smith, H., Ruiz, P., Whitsett, J., Bancalari, E., and Wu, S. (2011). CTGF disrupts alveolarization and induces pulmonary hypertension in neonatal mice: implication in the pathogenesis of severe bronchopulmonary dysplasia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 300, L330-340.

Chen, X., Hyatt, B.A., Mucenski, M.L., Mason, R.J., and 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, 11724-11729.

- Cheng, C.M., Joncas, G., Reinhardt, R.R., Farrer, R., Quarles, R., Janssen, J., McDonald, M.P., Crawley, J.N., Powell-Braxton, L., and Bondy, C.A. (1998). Biochemical and morphometric analyses show that myelination in the insulin-like growth factor 1 null brain is proportionate to its neuronal composition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 5673-5681.
- Cheng, J., and Du, J. (2007). Mechanical stretch simulates proliferation of venous smooth muscle cells through activation of the insulin-like growth factor-1 receptor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 1744-1751.
- Chetty, A., Andersson, S., Lassus, P., and Nielsen, H.C. (2004). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-1 receptor (IGF-1R) expression in human lung in RDS and BPD. *Pediatric pulmonology* **37**, 128-136.
- Chetty, A., Cao, G.J., Severgnini, M., Simon, A., Warburton, R., and Nielsen, H.C. (2008). Role of matrix metalloprotease-9 in hyperoxic injury in developing lung. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* **295**, L584-592.
- Chetty, A., Manzo, N., Waxman, A.B., and Nielsen, H.C. (2005). Modulation of IGF-binding protein-2 and -3 in hyperoxic injury in developing rat lung. *Pediatric research* **58**, 222-228.
- Chetty, A., and Nielsen, H.C. (2002). Regulation of cell proliferation by insulin-like growth factor 1 in hyperoxia-exposed neonatal rat lung. *Molecular genetics and metabolism* **75**, 265-275.
- Chien, W., Yin, D., Gui, D., Mori, A., Frank, J.M., Said, J., Kusanoco, D., Marchevsky, A., McKenna, R., and Koeffler, H.P. (2006). Suppression of cell proliferation and signaling transduction by connective tissue growth factor in non-small cell lung cancer cells. *Molecular cancer research : MCR* **4**, 591-598.
- Chinoy, M.R. (2003). Lung growth and development. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **8**, d392-415.
- Chiou, S.T., and Chang, W.C. (1992). Insulin-like growth factor I stimulates transcription of the c-jun proto-oncogene in Balb/C 3T3 cells. *Biochemical and biophysical research communications* **183**, 524-531.
- Chitnis, M.M., Yuen, J.S., Protheroe, A.S., Pollak, M., and Macaulay, V.M. (2008). The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**, 6364-6370.
- Choi, J.E., Lee, S.S., Sunde, D.A., Huizar, I., Haugk, K.L., Thannickal, V.J., Vittal, R., Plymate, S.R., and Schnapp, L.M. (2009). Insulin-like growth factor-I receptor blockade improves outcome in mouse model of lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* **179**, 212-219.
- Chu, Y.W., Schmitz, S., Choudhury, B., Telford, W., Kapoor, V., Garfield, S., Howe, D., and Gress, R.E. (2008). Exogenous insulin-like growth factor 1 enhances thymopoiesis predominantly through thymic epithelial cell expansion. *Blood* **112**, 2836-2846.
- Dalton, S. (2013). Signaling networks in human pluripotent stem cells. *Current opinion in cell biology* **25**, 241-246.
- DeChiara, T.M., Efstratiadis, A., and Robertson, E.J. (1990). A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* **345**, 78-80.

DeChiara, T.M., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* **64**, 849-859.

Del Moral, P.M., Sala, F.G., Tefft, D., Shi, W., Keshet, E., Bellusci, S., and Warburton, D. (2006). VEGF-A signaling through Flk-1 is a critical facilitator of early embryonic lung epithelial to endothelial crosstalk and branching morphogenesis. *Developmental biology* **290**, 177-188.

Del Moral, P.M., and Warburton, D. (2010). Explant culture of mouse embryonic whole lung, isolated epithelium, or mesenchyme under chemically defined conditions as a system to evaluate the molecular mechanism of branching morphogenesis and cellular differentiation. *Methods Mol Biol* **633**, 71-79.

Delafontaine, P., Song, Y.H., and Li, Y. (2004). Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**, 435-444.

Desbois-Mouthon, C., Wendum, D., Cadoret, A., Rey, C., Leneuve, P., Blaise, A., Housset, C., Tronche, F., Le Bouc, Y., and Holzenberger, M. (2006). Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R knockout. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**, 773-775.

Dhar, A., and Ray, A. (2010). The CCN family proteins in carcinogenesis. *Experimental oncology* **32**, 2-9.

Diaz-Araya, G., Borg, T.K., Lavandero, S., Loftis, M.J., and Carver, W. (2003). IGF-1 modulation of rat cardiac fibroblast behavior and gene expression is age-dependent. *Cell communication & adhesion* **10**, 155-165.

Dietrich, P., Dragatsis, I., Xuan, S., Zeitlin, S., and Efstratiadis, A. (2000). Conditional mutagenesis in mice with heat shock promoter-driven cre transgenes. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **11**, 196-205.

DiGirolamo, D.J., Mukherjee, A., Fulzele, K., Gan, Y., Cao, X., Frank, S.J., and Clemens, T.L. (2007). Mode of growth hormone action in osteoblasts. *The Journal of biological chemistry* **282**, 31666-31674.

Dinchuk, J.E., Cao, C., Huang, F., Reeves, K.A., Wang, J., Myers, F., Cantor, G.H., Zhou, X., Attar, R.M., Gottardis, M., *et al.* (2010). Insulin receptor (IR) pathway hyperactivity in IGF-IR null cells and suppression of downstream growth signaling using the dual IGF-IR/IR inhibitor, BMS-754807. *Endocrinology* **151**, 4123-4132.

Dolinay, T., Kaminski, N., Felgendreher, M., Kim, H.P., Reynolds, P., Watkins, S.C., Karp, D., Uhlig, S., and Choi, A.M. (2006). Gene expression profiling of target genes in ventilator-induced lung injury. *Physiological genomics* **26**, 68-75.

Dooley, A.L., Winslow, M.M., Chiang, D.Y., Banerji, S., Stransky, N., Dayton, T.L., Snyder, E.L., Senna, S., Whittaker, C.A., Bronson, R.T., *et al.* (2011). Nuclear factor I/B is an oncogene in small cell lung cancer. *Genes & development* **25**, 1470-1475.

Dorman, J.B., Albinder, B., Shroyer, T., and Kenyon, C. (1995). The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **141**, 1399-1406.

Duan, C. (2002). Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins. *The Journal of endocrinology* **175**, 41-54.

Duan, C., Ren, H., and Gao, S. (2010). Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. *General and comparative endocrinology* 167, 344-351.

Dupont, J., Dunn, S.E., Barrett, J.C., and LeRoith, D. (2003). Microarray analysis and identification of novel molecules involved in insulin-like growth factor-1 receptor signaling and gene expression. *Recent progress in hormone research* 58, 325-342.

Dupont, J., and Holzenberger, M. (2003a). Biology of insulin-like growth factors in development. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews* 69, 257-271.

Dupont, J., and Holzenberger, M. (2003b). IGF type 1 receptor: a cell cycle progression factor that regulates aging. *Cell Cycle* 2, 270-272.

Dupont, J., Khan, J., Qu, B.H., Metzler, P., Helman, L., and LeRoith, D. (2001). Insulin and IGF-1 induce different patterns of gene expression in mouse fibroblast NIH-3T3 cells: identification by cDNA microarray analysis. *Endocrinology* 142, 4969-4975.

Dzadzadzuszko, R., Camidge, D.R., and Hirsch, F.R. (2008). The insulin-like growth factor pathway in lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 3, 815-818.

Dzadzadzuszko, R., Merrick, D.T., Witta, S.E., Mendoza, A.D., Szostakiewicz, B., Szymanowska, A., Rzyman, W., Dzadzadzuszko, K., Jassem, J., Bunn, P.A., Jr., *et al.* (2010). Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) gene copy number is associated with survival in operable non-small-cell lung cancer: a comparison between IGF1R fluorescent in situ hybridization, protein expression, and mRNA expression. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28, 2174-2180.

Eferl, R., Sibilica, M., Hilberg, F., Fuchsbichler, A., Kufferath, I., Guertl, B., Zenz, R., Wagner, E.F., and Zatloukal, K. (1999). Functions of c-Jun in liver and heart development. *The Journal of cell biology* 145, 1049-1061.

Eliasz, S., Liang, S., Chen, Y., De Marco, M.A., Machek, O., Skucha, S., Miele, L., and Bocchetta, M. (2010). Notch-1 stimulates survival of lung adenocarcinoma cells during hypoxia by activating the IGF-1R pathway. *Oncogene* 29, 2488-2498.

Epauld, R., Aubey, F., Xu, J., Chaker, Z., Clemessy, M., Dautin, A., Ahamed, K., Bonora, M., Hoyeau, N., Flejou, J.F., *et al.* (2012). Knockout of insulin-like growth factor-1 receptor impairs distal lung morphogenesis. *PLoS one* 7, e48071.

Eramo, A., Haas, T.L., and De Maria, R. (2010). Lung cancer stem cells: tools and targets to fight lung cancer. *Oncogene* 29, 4625-4635.

Evans, M.J., Cabral-Anderson, L.J., and Freeman, G. (1978). Role of the Clara cell in renewal of the bronchiolar epithelium. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 38, 648-653.

Fang, P., Schwartz, I.D., Johnson, B.D., Derr, M.A., Roberts, C.T., Jr., Hwa, V., and Rosenfeld, R.G. (2009). Familial short stature caused by haploinsufficiency of the insulin-like growth factor I receptor due to nonsense-mediated messenger ribonucleic acid decay. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94, 1740-1747.

Fernandez, A.M., Dupont, J., Farrar, R.P., Lee, S., Stannard, B., and Le Roith, D. (2002). Muscle-specific inactivation of the IGF-I receptor induces compensatory hyperplasia in skeletal muscle. *The Journal of clinical investigation* 109, 347-355.

Ferrell, J.E., Jr. (1996). MAP kinases in mitogenesis and development. *Current topics in developmental biology* 33, 1-60.

Finney, B.A., del Moral, P.M., Wilkinson, W.J., Cayzac, S., Cole, M., Warburton, D., Kemp, P.J., and Riccardi, D. (2008). Regulation of mouse lung development by the extracellular calcium-sensing receptor, CaR. *The Journal of physiology* 586, 6007-6019.

Fleissner, F., and Thum, T. (2008). The IGF-1 receptor as a therapeutic target to improve endothelial progenitor cell function. *Mol Med* 14, 235-237.

Frago, L.M., Camerero, G., Canon, S., Paneda, C., Sanz, C., Leon, Y., Giraldez, F., and Varela-Nieto, I. (2000). Role of diffusible and transcription factors in inner ear development: implications in regeneration. *Histology and histopathology* 15, 657-666.

Frankel, S.K., Moats-Staats, B.M., Cool, C.D., Wynes, M.W., Stiles, A.D., and Riches, D.W. (2005). Human insulin-like growth factor-1A expression in transgenic mice promotes adenomatous hyperplasia but not pulmonary fibrosis. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 288, L805-812.

Fredberg, J.J., and Kamm, R.D. (2006). Stress transmission in the lung: pathways from organ to molecule. *Annual review of physiology* 68, 507-541.

Friedman, S.L. (2004). Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology* 1, 98-105.

Friend, K.E., Khandwala, H.M., Flyvbjerg, A., Hill, H., Li, J., and McCutcheon, I.E. (2001). Growth hormone and insulin-like growth factor-I: effects on the growth of glioma cell lines. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 11, 84-91.

Froment, P., Vigier, M., Negre, D., Fontaine, I., Beghelli, J., Cosset, F.L., Holzenberger, M., and Durand, P. (2007). Inactivation of the IGF-I receptor gene in primary Sertoli cells highlights the autocrine effects of IGF-I. *The Journal of endocrinology* 194, 557-568.

Fu, J.H., and Xue, X.D. (2007). Gene expressions and roles of matrix metalloproteinases-8 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in hyperoxia-induced pulmonary fibrosis in neonatal rats. *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics* 9, 1-5.

Fukushima, T., Nakamura, Y., Yamanaka, D., Shibano, T., Chida, K., Minami, S., Asano, T., Hakuno, F., and Takahashi, S. (2012). Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity bound to insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor, which is continuously sustained by IGF-I stimulation, is required for IGF-I-induced cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* 287, 29713-29721.

Funaki, H., Yamamoto, T., Koyama, Y., Kondo, D., Yaoita, E., Kawasaki, K., Kobayashi, H., Sawaguchi, S., Abe, H., and Kihara, I. (1998). Localization and expression of AQP5 in cornea, serous salivary glands, and pulmonary epithelial cells. *The American journal of physiology* 275, C1151-1157.

Furstenberger, G., and Senn, H.J. (2002). Insulin-like growth factors and cancer. *The lancet oncology* 3, 298-302.

Gahete, M.D., Cordoba-Chacon, J., Anadumaka, C.V., Lin, Q., Bruning, J.C., Kahn, C.R., Luque, R.M., and Kineman, R.D. (2011). Elevated GH/IGF-I, due to somatotrope-specific loss of both IGF-I and insulin receptors, alters glucose homeostasis and insulin sensitivity in a diet-dependent manner. *Endocrinology* 152, 4825-4837.

- Gallagher, E.J., and LeRoith, D. (2011). Minireview: IGF, Insulin, and Cancer. *Endocrinology* 152, 2546-2551.
- Gemenetzidis, E., Bose, A., Riaz, A.M., Chaplin, T., Young, B.D., Ali, M., Sugden, D., Thurlow, J.K., Cheong, S.C., Teo, S.H., *et al.* (2009). FOXM1 upregulation is an early event in human squamous cell carcinoma and it is enhanced by nicotine during malignant transformation. *PLoS one* 4, e4849.
- Geurts, J.M., Schoenmakers, E.F., Roijer, E., Astrom, A.K., Stenman, G., and van de Ven, W.J. (1998). Identification of NFIB as recurrent translocation partner gene of HMGIC in pleomorphic adenomas. *Oncogene* 16, 865-872.
- Ghosh, M.C., Gorantla, V.K., Makena, P.S., Luellen, C.L., Sinclair, S.E., Schwingshackl, A., and Waters, C.M. (2013). Insulin Like Growth Factor-1 Stimulates Differentiation of ATII Cells to ATI-Like Cells Through Activation of Wnt5a. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*.
- Giangreco, A., Arwert, E.N., Rosewell, I.R., Snyder, J., Watt, F.M., and Stripp, B.R. (2009). Stem cells are dispensable for lung homeostasis but restore airways after injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 9286-9291.
- Giangreco, A., Groot, K.R., and Janes, S.M. (2007). Lung cancer and lung stem cells: strange bedfellows? *American journal of respiratory and critical care medicine* 175, 547-553.
- Giangreco, A., Reynolds, S.D., and Stripp, B.R. (2002). Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *The American journal of pathology* 161, 173-182.
- Giangreco, A., Shen, H., Reynolds, S.D., and Stripp, B.R. (2004). Molecular phenotype of airway side population cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 286, L624-630.
- Giannoukakis, N., Deal, C., Paquette, J., Goodyer, C.G., and Polychronakos, C. (1993). Parental genomic imprinting of the human IGF2 gene. *Nature genetics* 4, 98-101.
- Gonzalez, A., Rota, M., Nurzynska, D., Misao, Y., Tillmanns, J., Ojaimi, C., Padin-Iruegas, M.E., Muller, P., Esposito, G., Bearzi, C., *et al.* (2008). Activation of cardiac progenitor cells reverses the failing heart senescent phenotype and prolongs lifespan. *Circulation research* 102, 597-606.
- Gould, V.E., Linnoila, R.I., Memoli, V.A., and Warren, W.H. (1983). Neuroendocrine cells and neuroendocrine neoplasms of the lung. *Pathology annual* 18 Pt 1, 287-330.
- Grunder, A., Ebel, T.T., Mallo, M., Schwarzkopf, G., Shimizu, T., Sippel, A.E., and Schrewe, H. (2002). Nuclear factor I-B (Nfib) deficient mice have severe lung hypoplasia. *Mechanisms of development* 112, 69-77.
- Gualberto, A., Hixon, M.L., Karp, D.D., Li, D., Green, S., Dolled-Filhart, M., Paz-Ares, L.G., Novello, S., Blakely, J., Langer, C.J., *et al.* (2011). Pre-treatment levels of circulating free IGF-1 identify NSCLC patients who derive clinical benefit from figitumumab. *British journal of cancer* 104, 68-74.
- Han, R.N., Buch, S., Tseu, I., Young, J., Christie, N.A., Frndova, H., Lye, S.J., Post, M., and Tanswell, A.K. (1996a). Changes in structure, mechanics, and insulin-like growth factor-related gene expression in the lungs of newborn rats exposed to air or 60% oxygen. *Pediatric research* 39, 921-929.

Han, R.N., Han, V.K., Buch, S., Freeman, B.A., Post, M., and Tanswell, A.K. (1996b). Insulin-like growth factor-I and type I insulin-like growth factor receptor in 85% O<sub>2</sub>-exposed rat lung. *The American journal of physiology* 271, L139-149.

Han, R.N., Post, M., Tanswell, A.K., and Lye, S.J. (2003). Insulin-like growth factor-I receptor-mediated vasculogenesis/angiogenesis in human lung development. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 28, 159-169.

Harrod, K.S., Mounday, A.D., Stripp, B.R., and Whitsett, J.A. (1998). Clara cell secretory protein decreases lung inflammation after acute virus infection. *The American journal of physiology* 275, L924-930.

Hayashida, S., Harrod, K.S., and Whitsett, J.A. (2000). Regulation and function of CCSP during pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in vivo. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 279, L452-459.

He, W., Rose, D.W., Olefsky, J.M., and Gustafson, T.A. (1998). Grb10 interacts differentially with the insulin receptor, insulin-like growth factor I receptor, and epidermal growth factor receptor via the Grb10 Src homology 2 (SH2) domain and a second novel domain located between the pleckstrin homology and SH2 domains. *The Journal of biological chemistry* 273, 6860-6867.

Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N., and Wagner, E.F. (1993). c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* 365, 179-181.

Hislop, A. (2005). Developmental biology of the pulmonary circulation. *Paediatric respiratory reviews* 6, 35-43.

Hislop, A.A. (2002). Airway and blood vessel interaction during lung development. *Journal of anatomy* 201, 325-334.

Holbourn, K.P., Acharya, K.R., and Perbal, B. (2008). The CCN family of proteins: structure-function relationships. *Trends in biochemical sciences* 33, 461-473.

Holbourn, K.P., Perbal, B., and Ravi Acharya, K. (2009). Proteins on the catwalk: modelling the structural domains of the CCN family of proteins. *Journal of cell communication and signaling* 3, 25-41.

Holt, P.G., Strickland, D.H., Wikstrom, M.E., and Jahnsen, F.L. (2008). Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nature reviews Immunology* 8, 142-152.

Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Geloën, A., Even, P.C., Cervera, P., and Le Bouc, Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421, 182-187.

Holzenberger, M., Leneuve, P., Hamard, G., Ducos, B., Perin, L., Binoux, M., and Le Bouc, Y. (2000). A targeted partial invalidation of the insulin-like growth factor I receptor gene in mice causes a postnatal growth deficit. *Endocrinology* 141, 2557-2566.

Holly, J., and Perks, C. (2006). The role of insulin-like growth factor binding proteins. *Neuroendocrinology* 83, 154-160.

Hong, K.U., Reynolds, S.D., Giangreco, A., Hurley, C.M., and Stripp, B.R. (2001). Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 24, 671-681.

- Hong, K.U., Reynolds, S.D., Watkins, S., Fuchs, E., and Stripp, B.R. (2004). In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 286, L643-649.
- Huang, Y.H., Chin, C.C., Ho, H.N., Chou, C.K., Shen, C.N., Kuo, H.C., Wu, T.J., Wu, Y.C., Hung, Y.C., Chang, C.C., *et al.* (2009). Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1-dependent pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 2076-2087.
- Hung, C.F., Rohani, M.G., Lee, S.S., Chen, P., and Schnapp, L.M. (2013). Role of IGF-1 pathway in lung fibroblast activation. *Respiratory research* 14, 102.
- Husari, A.W., Dbaibo, G.S., Bitar, H., Khayat, A., Panjarian, S., Nasser, M., Bitar, F.F., El-Sabban, M., Zaatari, G., and Mroueh, S.M. (2006). Apoptosis and the activity of ceramide, Bax and Bcl-2 in the lungs of neonatal rats exposed to limited and prolonged hyperoxia. *Respiratory research* 7, 100.
- Huynh, H., Zheng, J., Umikawa, M., Silvany, R., Xie, X.J., Wu, C.J., Holzenberger, M., Wang, Q., and Zhang, C.C. (2011). Components of the hematopoietic compartments in tumor stroma and tumor-bearing mice. *PloS one* 6, e18054.
- Ikeda, K., Clark, J.C., Shaw-White, J.R., Stahlman, M.T., Boutell, C.J., and Whitsett, J.A. (1995). Gene structure and expression of human thyroid transcription factor-1 in respiratory epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 270, 8108-8114.
- Inagaki, K., Tiulpakov, A., Rubtsov, P., Sverdlova, P., Peterkova, V., Yakar, S., Terekhov, S., and LeRoith, D. (2007). A familial insulin-like growth factor-I receptor mutant leads to short stature: clinical and biochemical characterization. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92, 1542-1548.
- Inanlou, M.R., Baguma-Nibasheka, M., and Kablar, B. (2005). The role of fetal breathing-like movements in lung organogenesis. *Histology and histopathology* 20, 1261-1266.
- Inanlou, M.R., and Kablar, B. (2005). Contractile activity of skeletal musculature involved in breathing is essential for normal lung cell differentiation, as revealed in *Myf5<sup>-/-</sup>:MyoD<sup>-/-</sup>* embryos. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 233, 772-782.
- Italiano, A., Ebran, N., Attias, R., Chevallier, A., Monticelli, I., Mainguene, C., Benchimol, D., and Pedeutour, F. (2008). NFIB rearrangement in superficial, retroperitoneal, and colonic lipomas with aberrations involving chromosome band 9p22. *Genes, chromosomes & cancer* 47, 971-977.
- Jerome, L., Shiry, L., and Leyland-Jones, B. (2003). Deregulation of the IGF axis in cancer: epidemiological evidence and potential therapeutic interventions. *Endocrine-related cancer* 10, 561-578.
- Jhun, B.H., Haruta, T., Meinkoth, J.L., Leitner, W., Draznin, B., Saltiel, A.R., Pang, L., Sasaoka, T., and Olefsky, J.M. (1995). Signal transduction pathways leading to insulin-induced early gene induction. *Biochemistry* 34, 7996-8004.
- Johnson, R.S., van Lingen, B., Papaioannou, V.E., and Spiegelman, B.M. (1993). A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes & development* 7, 1309-1317.
- Jones, J.I., and Clemmons, D.R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine reviews* 16, 3-34.

Jones, R., Zapol, W.M., and Reid, L. (1985). Oxygen toxicity and restructuring of pulmonary arteries—a morphometric study. The response to 4 weeks' exposure to hyperoxia and return to breathing air. *The American journal of pathology* 121, 212-223.

Joshi, S., and Kotecha, S. (2007). Lung growth and development. *Early human development* 83, 789-794.

Kadzik, R.S., and Morrisey, E.E. (2012). Directing lung endoderm differentiation in pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 10, 355-361.

Kajstura, J., Rota, M., Hall, S.R., Hosoda, T., D'Amario, D., Sanada, F., Zheng, H., Ogorek, B., Rondon-Clavo, C., Ferreira-Martins, J., *et al.* (2011). Evidence for human lung stem cells. *The New England journal of medicine* 364, 1795-1806.

Kalin, T.V., Wang, I.C., Meliton, L., Zhang, Y., Wert, S.E., Ren, X., Snyder, J., Bell, S.M., Graf, L., Jr., Whitsett, J.A., *et al.* (2008). Forkhead Box m1 transcription factor is required for perinatal lung function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 19330-19335.

Kalinichenko, V.V., Gusarova, G.A., Tan, Y., Wang, I.C., Major, M.L., Wang, X., Yoder, H.M., and Costa, R.H. (2003). Ubiquitous expression of the forkhead box M1B transgene accelerates proliferation of distinct pulmonary cell types following lung injury. *The Journal of biological chemistry* 278, 37888-37894.

Kalinichenko, V.V., Lim, L., Stolz, D.B., Shin, B., Rausa, F.M., Clark, J., Whitsett, J.A., Watkins, S.C., and Costa, R.H. (2001). Defects in pulmonary vasculature and perinatal lung hemorrhage in mice heterozygous null for the Forkhead Box f1 transcription factor. *Developmental biology* 235, 489-506.

Kalinichenko, V.V., Major, M.L., Wang, X., Petrovic, V., Kuechle, J., Yoder, H.M., Dennewitz, M.B., Shin, B., Datta, A., Raychaudhuri, P., *et al.* (2004). Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. *Genes & development* 18, 830-850.

Kallet, R.H., and Matthay, M.A. (2013). Hyperoxic acute lung injury. *Respiratory care* 58, 123-141.

Kalluri, R., and Neilson, E.G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 112, 1776-1784.

Kappeler, L., De Magalhaes Filho, C., Dupont, J., Leneuve, P., Cervera, P., Perin, L., Loudes, C., Blaise, A., Klein, R., Epelbaum, J., *et al.* (2008). Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism. *PLoS biology* 6, e254.

Kaufman, M.H. (1999). *The Anatomical Basis of Mouse Development*: Academic Press

Kermani, H., Goffinet, L., Mottet, M., Bodart, G., Morrhaye, G., Dardenne, O., Renard, C., Overbergh, L., Baron, F., Beguin, Y., *et al.* (2012). Expression of the growth hormone/insulin-like growth factor axis during Balb/c thymus ontogeny and effects of growth hormone upon ex vivo T cell differentiation. *Neuroimmunomodulation* 19, 137-147.

Khandwala, H.M., McCutcheon, I.E., Flyvbjerg, A., and Friend, K.E. (2000). The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocrine reviews* 21, 215-244.

Kho, A.T., Bhattacharya, S., Mecham, B.H., Hong, J., Kohane, I.S., and Mariani, T.J. (2009). Expression profiles of the mouse lung identify a molecular signature of time-to-birth. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 40, 47-57.

Kim, H.S., Nagalla, S.R., Oh, Y., Wilson, E., Roberts, C.T., Jr., and Rosenfeld, R.G. (1997). Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 12981-12986.

Kim, I.M., Ackerson, T., Ramakrishna, S., Tretiakova, M., Wang, I.C., Kalin, T.V., Major, M.L., Gusarova, G.A., Yoder, H.M., Costa, R.H., *et al.* (2006). The Forkhead Box m1 transcription factor stimulates the proliferation of tumor cells during development of lung cancer. *Cancer research* 66, 2153-2161.

Kim, I.M., Ramakrishna, S., Gusarova, G.A., Yoder, H.M., Costa, R.H., and Kalinichenko, V.V. (2005). The forkhead box m1 transcription factor is essential for embryonic development of pulmonary vasculature. *The Journal of biological chemistry* 280, 22278-22286.

Kim, J., Wende, A.R., Sena, S., Theobald, H.A., Soto, J., Sloan, C., Wayment, B.E., Litwin, S.E., Holzenberger, M., LeRoith, D., *et al.* (2008). Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. *Mol Endocrinol* 22, 2531-2543.

Kim, J.G., Kang, M.J., Yoon, Y.K., Kim, H.P., Park, J., Song, S.H., Han, S.W., Park, J.W., Kang, G.H., Kang, K.W., *et al.* (2012a). Heterodimerization of glycosylated insulin-like growth factor-1 receptors and insulin receptors in cancer cells sensitive to anti-IGF1R antibody. *PLoS one* 7, e33322.

Kim, T.H., Chow, Y.H., Gill, S.E., and Schnapp, L.M. (2012b). Effect of insulin-like growth factor blockade on hyperoxia-induced lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 47, 372-378.

Kim, T.R., Cho, E.W., Paik, S.G., and Kim, I.G. (2012c). Hypoxia-induced SM22alpha in A549 cells activates the IGF1R/PI3K/Akt pathway, conferring cellular resistance against chemo- and radiation therapy. *FEBS letters* 586, 303-309.

Kim, W.Y., Jin, Q., Oh, S.H., Kim, E.S., Yang, Y.J., Lee, D.H., Feng, L., Behrens, C., Prudkin, L., Miller, Y.E., *et al.* (2009). Elevated epithelial insulin-like growth factor expression is a risk factor for lung cancer development. *Cancer research* 69, 7439-7448.

Kimber, S.J., Sneddon, S.F., Bloor, D.J., El-Bareg, A.M., Hawkhead, J.A., Metcalfe, A.D., Houghton, F.D., Leese, H.J., Rutherford, A., Lieberman, B.A., *et al.* (2008). Expression of genes involved in early cell fate decisions in human embryos and their regulation by growth factors. *Reproduction* 135, 635-647.

Kimura, S., Hara, Y., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., Fox, C.H., Ward, J.M., and Gonzalez, F.J. (1996). The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes & development* 10, 60-69.

Kistler, G.S., Caldwell, P.R., and Weibel, E.R. (1967). Development of fine structural damage to alveolar and capillary lining cells in oxygen-poisoned rat lungs. *The Journal of cell biology* 32, 605-628.

Klammt, J., Garten, A., Barnikol-Oettler, A., Beck-Sickinger, A.G., and Kiess, W. (2005). Comparative analysis of the signaling capabilities of the insulin receptor-related receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 327, 557-564.

Klempt, M., Hutchins, A.M., Gluckman, P.D., and Skinner, S.J. (1992). IGF binding protein-2 gene expression and the location of IGF-I and IGF-II in fetal rat lung. *Development* 115, 765-772.

Kling, D.E., Lorenzo, H.K., Trbovich, A.M., Kinane, T.B., Donahoe, P.K., and Schnitzer, J.J. (2002). MEK-1/2 inhibition reduces branching morphogenesis and causes mesenchymal cell apoptosis in fetal rat lungs. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 282, L370-378.

Kloting, N., Koch, L., Wunderlich, T., Kern, M., Ruschke, K., Krone, W., Bruning, J.C., and Bluher, M. (2008). Autocrine IGF-1 action in adipocytes controls systemic IGF-1 concentrations and growth. *Diabetes* 57, 2074-2082.

Knight, D.A., and Holgate, S.T. (2003). The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology* 8, 432-446.

Kondo, T., Hafezi-Moghadam, A., Thomas, K., Wagner, D.D., and Kahn, C.R. (2004). Mice lacking insulin or insulin-like growth factor 1 receptors in vascular endothelial cells maintain normal blood-brain barrier. *Biochemical and biophysical research communications* 317, 315-320.

Kondo, T., Vicent, D., Suzuma, K., Yanagisawa, M., King, G.L., Holzenberger, M., and Kahn, C.R. (2003). Knockout of insulin and IGF-1 receptors on vascular endothelial cells protects against retinal neovascularization. *The Journal of clinical investigation* 111, 1835-1842.

Korfhagen, T.R., Swantz, R.J., Wert, S.E., McCarty, J.M., Kerlakian, C.B., Glasser, S.W., and Whitsett, J.A. (1994). Respiratory epithelial cell expression of human transforming growth factor-alpha induces lung fibrosis in transgenic mice. *The Journal of clinical investigation* 93, 1691-1699.

Kotecha, S. (2000). Lung growth for beginners. *Paediatric respiratory reviews* 1, 308-313.

Krein, P.M., Sabatini, P.J., Timmouth, W., Green, F.H., and Winston, B.W. (2003). Localization of insulin-like growth factor-I in lung tissues of patients with fibroproliferative acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 167, 83-90.

Krein, P.M., and Winston, B.W. (2002). Roles for insulin-like growth factor I and transforming growth factor-beta in fibrotic lung disease. *Chest* 122, 289S-293S.

Kruis, T., Klammt, J., Galli-Tsinopoulou, A., Wallborn, T., Schlicke, M., Muller, E., Kratzsch, J., Korner, A., Odeh, R., Kiess, W., *et al.* (2010). Heterozygous mutation within a kinase-conserved motif of the insulin-like growth factor I receptor causes intrauterine and postnatal growth retardation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95, 1137-1142.

Krupczak-Hollis, K., Wang, X., Kalinichenko, V.V., Gusarova, G.A., Wang, I.C., Dennewitz, M.B., Yoder, H.M., Kiyokawa, H., Kaestner, K.H., and Costa, R.H. (2004). The mouse Forkhead Box m1 transcription factor is essential for hepatoblast mitosis and development of intrahepatic bile ducts and vessels during liver morphogenesis. *Developmental biology* 276, 74-88.

Kulkarni, R.N., Holzenberger, M., Shih, D.Q., Ozcan, U., Stoffel, M., Magnuson, M.A., and Kahn, C.R. (2002). beta-cell-specific deletion of the Igf1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter beta-cell mass. *Nature genetics* 31, 111-115.

Kuo, C.T., Veselits, M.L., and Leiden, J.M. (1997). LKLF: A transcriptional regulator of single-positive T cell quiescence and survival. *Science* 277, 1986-1990.

Lagarrigue, S., Heberden, C., Martel, P., and Gaillard-Sanchez, I. (1995). The transformation of c-jun-overexpressing cells is correlated with IGFS-induced c-jun phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications* 217, 501-508.

Lau, L.F., and Nathans, D. (1985). Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. *The EMBO journal* 4, 3145-3151.

Laustsen, P.G., Russell, S.J., Cui, L., Entingh-Pearsall, A., Holzenberger, M., Liao, R., and Kahn, C.R. (2007). Essential role of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor signaling in cardiac development and function. *Molecular and cellular biology* 27, 1649-1664.

Laviola, L., Natalicchio, A., and Giorgino, F. (2007). The IGF-I signaling pathway. *Current pharmaceutical design* 13, 663-669.

Le Roith, D. (2003). The insulin-like growth factor system. *Experimental diabetes research* 4, 205-212.

Lebeche, D., Malpel, S., and Cardoso, W.V. (1999). Fibroblast growth factor interactions in the developing lung. *Mechanisms of development* 86, 125-136.

Lee, H.K., Lee, J.H., Kim, M., Kariya, Y., Miyazaki, K., and Kim, E.K. (2006a). Insulin-like growth factor-1 induces migration and expression of laminin-5 in cultured human corneal epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 47, 873-882.

Lee, J.H., Johnson, P.R., Roth, M., Hunt, N.H., and Black, J.L. (2001). ERK activation and mitogenesis in human airway smooth muscle cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 280, L1019-1029.

Lee, J.S., Chu, I.S., Heo, J., Calvisi, D.F., Sun, Z., Roskams, T., Durnez, A., Demetris, A.J., and Thorgeirsson, S.S. (2004). Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 40, 667-676.

Lee, K.Y., Russell, S.J., Ussar, S., Boucher, J., Vernochet, C., Mori, M.A., Smyth, G., Rourk, M., Cederquist, C., Rosen, E.D., *et al.* (2013). Lessons on conditional gene targeting in mouse adipose tissue. *Diabetes* 62, 864-874.

Lee, Y.C., Zhang, Z., and Mukherjee, A.B. (2006b). Mice lacking uteroglobin are highly susceptible to developing pulmonary fibrosis. *FEBS letters* 580, 4515-4520.

Leof, E.B., Wharton, W., van Wyk, J.J., and Pledger, W.J. (1982). Epidermal growth factor (EGF) and somatomedin C regulate G1 progression in competent BALB/c-3T3 cells. *Experimental cell research* 141, 107-115.

LeRoith, D., McGuinness, M., Shemer, J., Stannard, B., Lanau, F., Faria, T.N., Kato, H., Werner, H., Adamo, M., and Roberts, C.T., Jr. (1992). Insulin-like growth factors. *Biological signals* 1, 173-181.

LeRoith, D., and Roberts, C.T., Jr. (2003). The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer letters* 195, 127-137.

LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., and Roberts, C.T., Jr. (1995). Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrine reviews* 16, 143-163.

LeRoith, D., and Yakar, S. (2007). Mechanisms of disease: metabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism* 3, 302-310.

- Li, L., Wei, Y., Van Winkle, L., Zhang, Q.Y., Zhou, X., Hu, J., Xie, F., Kluetzman, K., and Ding, X. (2011). Generation and characterization of a Cyp2f2-null mouse and studies on the role of CYP2F2 in naphthalene-induced toxicity in the lung and nasal olfactory mucosa. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 339, 62-71.
- Li, Q., Zhang, N., Jia, Z., Le, X., Dai, B., Wei, D., Huang, S., Tan, D., and Xie, K. (2009). Critical role and regulation of transcription factor FoxM1 in human gastric cancer angiogenesis and progression. *Cancer research* 69, 3501-3509.
- Li, S., Li, Y., Yu, S., Du, W., Zhang, L., Dai, Y., Liu, Y., and Li, N. (2007). Expression of insulin-like growth factors systems in cloned cattle dead within hours after birth. *Molecular reproduction and development* 74, 397-402.
- Li, Y., and Geng, Y.J. (2010). A potential role for insulin-like growth factor signaling in induction of pluripotent stem cell formation. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 20, 391-398.
- Lim, M.A., Riedel, H., and Liu, F. (2004). Grb10: more than a simple adaptor protein. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9, 387-403.
- Linnerth, N.M., Siwicki, M.D., Campbell, C.I., Watson, K.L., Petrik, J.J., Whitsett, J.A., and Moorehead, R.A. (2009). Type I insulin-like growth factor receptor induces pulmonary tumorigenesis. *Neoplasia* 11, 672-682.
- Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59-72.
- Liu, W., Hendren, J., Qin, X.J., Shen, J., and Liu, K.J. (2009). Normobaric hyperoxia attenuates early blood-brain barrier disruption by inhibiting MMP-9-mediated occludin degradation in focal cerebral ischemia. *Journal of neurochemistry* 108, 811-820.
- Lobe, C.G., and Nagy, A. (1998). Conditional genome alteration in mice. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 20, 200-208.
- Long, L., Rubin, R., and Brodt, P. (1998). Enhanced invasion and liver colonization by lung carcinoma cells overexpressing the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Experimental cell research* 238, 116-121.
- Longmire, T.A., Ikonomidou, L., Hawkins, F., Christodoulou, C., Cao, Y., Jean, J.C., Kwok, L.W., Mou, H., Rajagopal, J., Shen, S.S., *et al.* (2012). Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells. *Cell stem cell* 10, 398-411.
- Lopez, A.D., Mathers, C.D., Ezzati, M., Jamison, D.T., and Murray, C.J.L. (2006). Measuring the Global Burden of Disease and Risk Factors, 1990-2001. In *Global Burden of Disease and Risk Factors*, A.D. Lopez, C.D. Mathers, M. Ezzati, D.T. Jamison, and C.J.L. Murray, eds. (Washington (DC)).
- Louvi, A., Accili, D., and Efstratiadis, A. (1997). Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Developmental biology* 189, 33-48.
- Luo, F.M., Wang, Z.L., Liu, X.J., Liu, C.T., Zhang, X.H., and Wang, W.Z. (2003). [Expression of Clara cell secretory protein in airways of rat asthma remodel]. *Zhonghua nei ke za zhi [Chinese journal of internal medicine]* 42, 466-469.

- Maeda, Y., Dave, V., and Whitsett, J.A. (2007). Transcriptional control of lung morphogenesis. *Physiological reviews* **87**, 219-244.
- Maina, J.N., and West, J.B. (2005). Thin and strong! The bioengineering dilemma in the structural and functional design of the blood-gas barrier. *Physiological reviews* **85**, 811-844.
- Maitre, B., Clement, A., Williams, M.C., and Brody, J.S. (1995). Expression of insulin-like growth factor receptors 1 and 2 in the developing lung and their relation to epithelial cell differentiation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **13**, 262-270.
- Mason, J.L., Xuan, S., Dragatsis, I., Efstratiadis, A., and Goldman, J.E. (2003). Insulin-like growth factor (IGF) signaling through type 1 IGF receptor plays an important role in remyelination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 7710-7718.
- Massoner, P., Ladurner-Rennau, M., Eder, I.E., and Klocker, H. (2010). Insulin-like growth factors and insulin control a multifunctional signalling network of significant importance in cancer. *British journal of cancer* **103**, 1479-1484.
- Mauro, L., and Surmacz, E. (2004). IGF-I receptor, cell-cell adhesion, tumour development and progression. *Journal of molecular histology* **35**, 247-253.
- Mendelson, C.R. (2000). Role of transcription factors in fetal lung development and surfactant protein gene expression. *Annual review of physiology* **62**, 875-915.
- Mendez, M.G., Kojima, S., and Goldman, R.D. (2010). Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**, 1838-1851.
- Mercer, R.R., Russell, M.L., Roggli, V.L., and Crapo, J.D. (1994). Cell number and distribution in human and rat airways. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **10**, 613-624.
- Mesas-Burgos, C., Nord, M., Didon, L., Eklof, A.C., and Frenckner, B. (2009). Gene expression analysis after prenatal tracheal ligation in fetal rat as a model of stimulated lung growth. *Journal of pediatric surgery* **44**, 720-728.
- Metzger, R.J., Klein, O.D., Martin, G.R., and Krasnow, M.A. (2008). The branching programme of mouse lung development. *Nature* **453**, 745-750.
- Miettinen, P.J., Berger, J.E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R.A., Werb, Z., and Derynck, R. (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* **376**, 337-341.
- Millien, G., Spira, A., Hinds, A., Wang, J., Williams, M.C., and Ramirez, M.I. (2006). Alterations in gene expression in T1 alpha null lung: a model of deficient alveolar sac development. *BMC developmental biology* **6**, 35.
- Minoo, P., Hamdan, H., Bu, D., Warburton, D., Stepanik, P., and deLemos, R. (1995). TTF-1 regulates lung epithelial morphogenesis. *Developmental biology* **172**, 694-698.
- Mitani, Y., Li, J., Rao, P.H., Zhao, Y.J., Bell, D., Lippman, S.M., Weber, R.S., Caulin, C., and El-Naggar, A.K. (2010). Comprehensive analysis of the MYB-NFIB gene fusion in salivary adenoid cystic carcinoma: Incidence, variability, and clinicopathologic significance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**, 4722-4731.

Miyazaki, E., Ohshiro, K., Taira, Y., and Puri, P. (1998). Altered insulin-like growth factor I mRNA expression in human hypoplastic lung in congenital diaphragmatic hernia. *Journal of pediatric surgery* 33, 1476-1479.

Mo, F.E., Muntean, A.G., Chen, C.C., Stolz, D.B., Watkins, S.C., and Lau, L.F. (2002). CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity. *Molecular and cellular biology* 22, 8709-8720.

Monnier, D., Boutillier, A.L., Giraud, P., Chiu, R., Aunis, D., Feltz, P., Zwiller, J., and Loeffler, J.P. (1994). Insulin-like growth factor-I stimulates c-fos and c-jun transcription in PC12 cells. *Molecular and cellular endocrinology* 104, 139-145.

Monno, S., Newman, M.V., Cook, M., and Lowe, W.L., Jr. (2000). Insulin-like growth factor I activates c-Jun N-terminal kinase in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 141, 544-550.

Moorehead, R.A., Sanchez, O.H., Baldwin, R.M., and Khokha, R. (2003). Transgenic overexpression of IGF-II induces spontaneous lung tumors: a model for human lung adenocarcinoma. *Oncogene* 22, 853-857.

Moreno-Barriuso, N., Lopez-Malpartida, A.V., de Pablo, F., and Pichel, J.G. (2006). Alterations in alveolar epithelium differentiation and vasculogenesis in lungs of LIF/IGF-I double deficient embryos. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235, 2040-2050.

Morrione, A., Valentinis, B., Li, S., Ooi, J.Y., Margolis, B., and Baserga, R. (1996). Grb10: A new substrate of the insulin-like growth factor I receptor. *Cancer research* 56, 3165-3167.

Morrisey, E.E., and Hogan, B.L. (2010). Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Developmental cell* 18, 8-23.

Moskwa, P., Lorentzen, D., Excoffon, K.J., Zabner, J., McCray, P.B., Jr., Nauseef, W.M., Dupuy, C., and Banfi, B. (2007). A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 175, 174-183.

Mou, H., Zhao, R., Sherwood, R., Ahfeldt, T., Lapey, A., Wain, J., Sicilian, L., Izvolsky, K., Musunuru, K., Cowan, C., *et al.* (2012). Generation of multipotent lung and airway progenitors from mouse ESCs and patient-specific cystic fibrosis iPSCs. *Cell stem cell* 10, 385-397.

Moverare-Skrtic, S., Svensson, J., Karlsson, M.K., Orwoll, E., Ljunggren, O., Mellstrom, D., and Ohlsson, C. (2009). Serum insulin-like growth factor-I concentration is associated with leukocyte telomere length in a population-based cohort of elderly men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94, 5078-5084.

Mucenski, M.L., Nation, J.M., Thitoff, A.R., Besnard, V., Xu, Y., Wert, S.E., Harada, N., Taketo, M.M., Stahlman, M.T., and Whitsett, J.A. (2005).  $\beta$ -Catenin regulates differentiation of respiratory epithelial cells in vivo. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 289, L971-L979.

Myatt, S.S., and Lam, E.W. (2007). The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nature reviews Cancer* 7, 847-859.

Nagata, K., Masumoto, K., Uesugi, T., Yamamoto, S., Yoshizaki, K., Fukumoto, S., Nonaka, K., and Taguchi, T. (2007). Effect of insulin-like-growth factor and its receptors regarding lung development in fetal mice. *Pediatric surgery international* 23, 953-959.

- Nakae, J., Kido, Y., and Accili, D. (2001). Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocrine reviews* 22, 818-835.
- Nakamura, S., Hirano, I., Okinaka, K., Takemura, T., Yokota, D., Ono, T., Shigeno, K., Shibata, K., Fujisawa, S., and Ohnishi, K. (2010). The FOXM1 transcriptional factor promotes the proliferation of leukemia cells through modulation of cell cycle progression in acute myeloid leukemia. *Carcinogenesis* 31, 2012-2021.
- Nakanishi, Y., Mulshine, J.L., Kasprzyk, P.G., Natale, R.B., Maneckjee, R., Avis, I., Treston, A.M., Gazdar, A.F., Minna, J.D., and Cuttitta, F. (1988). Insulin-like growth factor-I can mediate autocrine proliferation of human small cell lung cancer cell lines in vitro. *The Journal of clinical investigation* 82, 354-359.
- Narasaraju, T.A., Chen, H., Weng, T., Bhaskaran, M., Jin, N., Chen, J., Chen, Z., Chinoy, M.R., and Liu, L. (2006). Expression profile of IGF system during lung injury and recovery in rats exposed to hyperoxia: a possible role of IGF-1 in alveolar epithelial cell proliferation and differentiation. *Journal of cellular biochemistry* 97, 984-998.
- Narasimhan, S.D., Yen, K., and Tissenbaum, H.A. (2009). Converging pathways in lifespan regulation. *Current biology : CB* 19, R657-666.
- Nash, G., Blennerhassett, J.B., and Pontoppidan, H. (1967). Pulmonary lesions associated with oxygen therapy and artificial ventilation. *The New England journal of medicine* 276, 368-374.
- Nayak, L., Lin, Z., and Jain, M.K. (2011). "Go with the flow": how Kruppel-like factor 2 regulates the vasoprotective effects of shear stress. *Antioxidants & redox signaling* 15, 1449-1461.
- Nguyen, N.M., and Senior, R.M. (2006). Laminin isoforms and lung development: all isoforms are not equal. *Developmental biology* 294, 271-279.
- Nguyen, T.T., Sheppard, A.M., Kaye, P.L., and Noakes, P.G. (2007). IGF-I and insulin activate mitogen-activated protein kinase via the type 1 IGF receptor in mouse embryonic stem cells. *Reproduction* 134, 41-49.
- Nilsson, M., Panagopoulos, I., Mertens, F., and Mandahl, N. (2005). Fusion of the HMGA2 and NFIB genes in lipoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 447, 855-858.
- Ning, W., Li, C.J., Kaminski, N., Feghali-Bostwick, C.A., Alber, S.M., Di, Y.P., Otterbein, S.L., Song, R., Hayashi, S., Zhou, Z., *et al.* (2004). Comprehensive gene expression profiles reveal pathways related to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14895-14900.
- Niu, T., and Rosen, C.J. (2005). The insulin-like growth factor-I gene and osteoporosis: a critical appraisal. *Gene* 361, 38-56.
- Nord, M., Cassel, T.N., Braun, H., and Suske, G. (2000). Regulation of the Clara cell secretory protein/uteroglobin promoter in lung. *Annals of the New York Academy of Sciences* 923, 154-165.
- O'Kusky, J., and Ye, P. (2012). Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling. *Frontiers in neuroendocrinology* 33, 230-251.
- Oeztuerk-Winder, F., Guinot, A., Ochalek, A., and Ventura, J.J. (2012). Regulation of human lung alveolar multipotent cells by a novel p38alpha MAPK/miR-17-92 axis. *The EMBO journal* 31, 3431-3441.

Oh, J.S., Kucab, J.E., Bushel, P.R., Martin, K., Bennett, L., Collins, J., DiAugustine, R.P., Barrett, J.C., Afshari, C.A., and Dunn, S.E. (2002). Insulin-like growth factor-1 inscribes a gene expression profile for angiogenic factors and cancer progression in breast epithelial cells. *Neoplasia* 4, 204-217.

Okada, T., Liew, C.W., Hu, J., Hinault, C., Michael, M.D., Krtzfeldt, J., Yin, C., Holzenberger, M., Stoffel, M., and Kulkarni, R.N. (2007). Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 8977-8982.

Okano, T., Xuan, S., and Kelley, M.W. (2011). Insulin-like growth factor signaling regulates the timing of sensory cell differentiation in the mouse cochlea. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 18104-18118.

Oue, T., Taira, Y., Shima, H., Miyazaki, E., and Puri, P. (1999). Effect of antenatal glucocorticoid administration on insulin-like growth factor I and II levels in hypoplastic lung in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Pediatric surgery international* 15, 175-179.

Pack, R.J., Al-Ugaily, L.H., and Morris, G. (1981). The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study. *Journal of anatomy* 132, 71-84.

Padin-Iruegas, M.E., Misao, Y., Davis, M.E., Segers, V.F., Esposito, G., Tokunou, T., Urbanek, K., Hosoda, T., Rota, M., Anversa, P., *et al.* (2009). Cardiac progenitor cells and biotinylated insulin-like growth factor-1 nanofibers improve endogenous and exogenous myocardial regeneration after infarction. *Circulation* 120, 876-887.

Pagano, A., and Barazzone-Argiroffo, C. (2003). Alveolar cell death in hyperoxia-induced lung injury. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1010, 405-416.

Pais, R.S.L., Icíar P.; Pichel, José G. (2012). El sistema de IGFs en la homeostasis y patología del pulmón: Implicación en su desarrollo, regeneración tras daño y cáncer no microcítico. *Zubía* 24, 81-112.

Pais, R.S.M.-B., Nuria; Hernández-Porras, Isabel; López, Icíar P.; Pichel, José G. (2013). Transcriptome analysis in prenatal IGF1-deficient mice identifies molecular pathways

and target genes involved in distal lung differentiation (*PLoS One*).

Palmade, F., Sechoy-Chambon, O., Coquelet, C., and Bonne, C. (1994). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) specifically binds to bovine lens epithelial cells and increases the number of fibronectin receptor sites. *Current eye research* 13, 531-537.

Parera, M.C., van Dooren, M., van Kempen, M., de Krijger, R., Grosveld, F., Tibboel, D., and Rottier, R. (2005). Distal angiogenesis: a new concept for lung vascular morphogenesis. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 288, L141-149.

Pauling, M.H., and Vu, T.H. (2004). Mechanisms and regulation of lung vascular development. *Current topics in developmental biology* 64, 73-99.

Pavelic, J., Krizanac, S., Kapitanovic, S., Pavelic, L., Samarzija, M., Pavicic, F., Spaventi, S., Jakopovic, M., Herceg-Ivanovi, Z., and Pavelic, K. (2005). The consequences of insulin-like growth factors/receptors dysfunction in lung cancer. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 32, 65-71.

Pavelic, J., Matijevic, T., and Knezevic, J. (2007). Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family. *The Indian journal of medical research* 125, 511-522.

- Pavelic, J., Pavelic, L., Karadza, J., Krizanac, S., Unesic, J., Spaventi, S., and Pavelic, K. (2002). Insulin-like growth factor family and combined antisense approach in therapy of lung carcinoma. *Mol Med* 8, 149-157.
- Pedreira, P.R., Garcia-Prieto, E., Albaiceta, G.M., and Taboada, F. (2006). [Inflammatory response and apoptosis in acute pulmonary injury]. *Medicina intensiva / Sociedad Espanola de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias* 30, 268-275.
- Perbal, B. (2004). CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 363, 62-64.
- Peri, A., Cordella-Miele, E., Miele, L., and Mukherjee, A.B. (1993). Tissue-specific expression of the gene coding for human Clara cell 10-kD protein, a phospholipase A2-inhibitory protein. *The Journal of clinical investigation* 92, 2099-2109.
- Perl, A.K., Wert, S.E., Loudy, D.E., Shan, Z., Blair, P.A., and Whitsett, J.A. (2005). Conditional recombination reveals distinct subsets of epithelial cells in trachea, bronchi, and alveoli. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 33, 455-462.
- Persson, M., Andren, Y., Mark, J., Horlings, H.M., Persson, F., and Stenman, G. (2009). Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 18740-18744.
- Peters, K., Werner, S., Liao, X., Wert, S., Whitsett, J., and Williams, L. (1994). Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung. *The EMBO journal* 13, 3296-3301.
- Pichel, J.G., Fernandez-Moreno, C., Vicario-Abejon, C., Testillano, P.S., Patterson, P.H., and de Pablo, F. (2003). Developmental cooperation of leukemia inhibitory factor and insulin-like growth factor I in mice is tissue-specific and essential for lung maturation involving the transcription factors Sp3 and TTF-1. *Mechanisms of development* 120, 349-361.
- Pichel, J.G., Shen, L., Sheng, H.Z., Granholm, A.C., Drago, J., Grinberg, A., Lee, E.J., Huang, S.P., Saarma, M., Hoffer, B.J., *et al.* (1996). Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 73-76.
- Pierce, R.A., Griffin, G.L., Miner, J.H., and Senior, R.M. (2000). Expression patterns of laminin alpha1 and alpha5 in human lung during development. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 23, 742-747.
- Pierron, A., Fernandez, C., Saada, E., Keslair, F., Hery, G., Zattara, H., and Pedeutour, F. (2009). HMGA2-NFIB fusion in a pediatric intramuscular lipoma: a novel case of NFIB alteration in a large deep-seated adipocytic tumor. *Cancer genetics and cytogenetics* 195, 66-70.
- Pitetti, J.L., Calvel, P., Romero, Y., Conne, B., Truong, V., Papaioannou, M.D., Schaad, O., Docquier, M., Herrera, P.L., Wilhelm, D., *et al.* (2013). Insulin and IGF1 receptors are essential for XX and XY gonadal differentiation and adrenal development in mice. *PLoS genetics* 9, e1003160.
- Plopper, C.G. (1983). Comparative morphologic features of bronchiolar epithelial cells. The Clara cell. *The American review of respiratory disease* 128, S37-41.
- Pollak, M. (2008). Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature reviews Cancer* 8, 915-928.

Pollak, M. (2012). The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nature reviews Cancer* 12, 159-169.

Pollak, M.N., Schernhammer, E.S., and Hankinson, S.E. (2004). Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nature reviews Cancer* 4, 505-518.

Ponte, A.L., Marais, E., Gally, N., Langonne, A., Delorme, B., Herault, O., Charbord, P., and Domenech, J. (2007). The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25, 1737-1745.

Possmayer, F. (1988). A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *The American review of respiratory disease* 138, 990-998.

Powell-Braxton, L., Hollingshead, P., Giltinan, D., Pitts-Meek, S., and Stewart, T. (1993a). Inactivation of the IGF-I gene in mice results in perinatal lethality. *Annals of the New York Academy of Sciences* 692, 300-301.

Powell-Braxton, L., Hollingshead, P., Warburton, C., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Dalton, D., Gillett, N., and Stewart, T.A. (1993b). IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes & development* 7, 2609-2617.

Prince, L.S., Okoh, V.O., Moninger, T.O., and Matalon, S. (2004). Lipopolysaccharide increases alveolar type II cell number in fetal mouse lungs through Toll-like receptor 4 and NF-kappaB. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 287, L999-1006.

Quinn, K.A., Treston, A.M., Unsworth, E.J., Miller, M.J., Vos, M., Grimley, C., Battey, J., Mulshine, J.L., and Cuttitta, F. (1996). Insulin-like growth factor expression in human cancer cell lines. *The Journal of biological chemistry* 271, 11477-11483.

Qureshi, F.G., Tchorzewski, M.T., Duncan, M.D., and Harmon, J.W. (1997). EGF and IGF-I synergistically stimulate proliferation of human esophageal epithelial cells. *The Journal of surgical research* 69, 354-358.

Rada, B., and Leto, T.L. (2008). Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contributions to microbiology* 15, 164-187.

Raile, K., Klammt, J., Schneider, A., Keller, A., Laue, S., Smith, R., Pfaffle, R., Kratzsch, J., Keller, E., and Kiess, W. (2006). Clinical and functional characteristics of the human Arg59Ter insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) mutation: implications for a gene dosage effect of the human IGF1R. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91, 2264-2271.

Raiser, D.M., Zacharek, S.J., Roach, R.R., Curtis, S.J., Sinkevicius, K.W., Gludish, D.W., and Kim, C.F. (2008). Stem cell biology in the lung and lung cancers: using pulmonary context and classic approaches. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 73, 479-490.

Rajski, M., Zanetti-Dallenbach, R., Vogel, B., Herrmann, R., Rochlitz, C., and Buess, M. (2010). IGF-I induced genes in stromal fibroblasts predict the clinical outcome of breast and lung cancer patients. *BMC medicine* 8, 1.

Rajwani, A., Ezzat, V., Smith, J., Yuldasheva, N.Y., Duncan, E.R., Gage, M., Cubbon, R.M., Kahn, M.B., Imrie, H., Abbas, A., *et al.* (2012). Increasing circulating IGFBP1 levels improves insulin sensitivity, promotes nitric oxide production, lowers blood pressure, and protects against atherosclerosis. *Diabetes* 61, 915-924.

- Ramakrishna, S., Kim, I.M., Petrovic, V., Malin, D., Wang, I.C., Kalin, T.V., Meliton, L., Zhao, Y.Y., Ackerson, T., Qin, Y., *et al.* (2007). Myocardium defects and ventricular hypoplasia in mice homozygous null for the Forkhead Box M1 transcription factor. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236, 1000-1013.
- Ramsay, P.L., Luo, Z., Major, A., Park, M.S., Finegold, M., Welty, S.E., Kwak, I., Darlington, G., and Demayo, F.J. (2003). Multiple mechanisms for oxygen-induced regulation of the Clara cell secretory protein gene. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, 2142-2144.
- Ratajczak, M.Z., Shin, D.M., Ratajczak, J., Kucia, M., and Bartke, A. (2010). A novel insight into aging: are there pluripotent very small embryonic-like stem cells (VSELs) in adult tissues overtime depleted in an Igf-1-dependent manner? *Aging* 2, 875-883.
- Rawlins, E.L., Clark, C.P., Xue, Y., and Hogan, B.L. (2009a). The Id2+ distal tip lung epithelium contains individual multipotent embryonic progenitor cells. *Development* 136, 3741-3745.
- Rawlins, E.L., and Hogan, B.L. (2006). Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development* 133, 2455-2465.
- Rawlins, E.L., Okubo, T., Que, J., Xue, Y., Clark, C., Luo, X., and Hogan, B.L. (2008). Epithelial stem/progenitor cells in lung postnatal growth, maintenance, and repair. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 73, 291-295.
- Rawlins, E.L., Okubo, T., Xue, Y., Brass, D.M., Auten, R.L., Hasegawa, H., Wang, F., and Hogan, B.L. (2009b). The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. *Cell stem cell* 4, 525-534.
- Ray, R., Choi, M., Zhang, Z., Silverman, G.A., Askew, D., and Mukherjee, A.B. (2005). Uteroglobin suppresses SCCA gene expression associated with allergic asthma. *The Journal of biological chemistry* 280, 9761-9764.
- Reeve, A.E., Eccles, M.R., Wilkins, R.J., Bell, G.I., and Millow, L.J. (1985). Expression of insulin-like growth factor-II transcripts in Wilms' tumour. *Nature* 317, 258-260.
- Reeve, J.G., Brinkman, A., Hughes, S., Mitchell, J., Schwander, J., and Bleehen, N.M. (1992). Expression of insulinlike growth factor (IGF) and IGF-binding protein genes in human lung tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 84, 628-634.
- Reiss, K., Porcu, P., Sell, C., Pietrkowski, Z., and Baserga, R. (1992). The insulin-like growth factor 1 receptor is required for the proliferation of hemopoietic cells. *Oncogene* 7, 2243-2248.
- Relan, N.K., and Schuger, L. (1999). Basement membranes in development. *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 2, 103-118.
- Ren, H., Yin, P., and Duan, C. (2008). IGFBP-5 regulates muscle cell differentiation by binding to IGF-II and switching on the IGF-II auto-regulation loop. *The Journal of cell biology* 182, 979-991.
- Retsch-Bogart, G.Z., Moats-Staats, B.M., Howard, K., D'Ercole, A.J., and Stiles, A.D. (1996). Cellular localization of messenger RNAs for insulin-like growth factors (IGFs), their receptors and binding proteins during fetal rat lung development. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 14, 61-69.

Reynolds, S.D., Giangreco, A., Power, J.H., and Stripp, B.R. (2000). Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *The American journal of pathology* *156*, 269-278.

Reynolds, S.D., and Malkinson, A.M. (2010). Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. *The international journal of biochemistry & cell biology* *42*, 1-4.

Reynolds, S.D., Zemke, A.C., Giangreco, A., Brockway, B.L., Teisanu, R.M., Drake, J.A., Mariani, T., Di, P.Y., Taketo, M.M., and Stripp, B.R. (2008). Conditional stabilization of beta-catenin expands the pool of lung stem cells. *Stem Cells* *26*, 1337-1346.

Rishi, A.K., Joyce-Brady, M., Fisher, J., Dobbs, L.G., Floros, J., VanderSpek, J., Brody, J.S., and Williams, M.C. (1995). Cloning, characterization, and development expression of a rat lung alveolar type I cell gene in embryonic endodermal and neural derivatives. *Developmental biology* *167*, 294-306.

Roback, E.W., Barakat, A.J., Dev, V.G., Mbikay, M., Chretien, M., and Butler, M.G. (1991). An infant with deletion of the distal long arm of chromosome 15 (q26.1----qter) and loss of insulin-like growth factor 1 receptor gene. *American journal of medical genetics* *38*, 74-79.

Rock, J.R., Barkauskas, C.E., Counce, M.J., Xue, Y., Harris, J.R., Liang, J., Noble, P.W., and Hogan, B.L. (2011). Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, E1475-1483.

Rock, J.R., and Hogan, B.L. (2011). Epithelial progenitor cells in lung development, maintenance, repair, and disease. *Annual review of cell and developmental biology* *27*, 493-512.

Rock, J.R., Randell, S.H., and Hogan, B.L. (2010). Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Disease models & mechanisms* *3*, 545-556.

Rodgers, B.D., Roalson, E.H., and Thompson, C. (2008). Phylogenetic analysis of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) and IGFBP-related protein gene families. *General and comparative endocrinology* *155*, 201-207.

Romero, C.J., Ng, Y., Luque, R.M., Kineman, R.D., Koch, L., Bruning, J.C., and Radovick, S. (2010). Targeted deletion of somatotroph insulin-like growth factor-I signaling in a cell-specific knockout mouse model. *Mol Endocrinol* *24*, 1077-1089.

Sachdev, D., and Yee, D. (2007). Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy. *Molecular cancer therapeutics* *6*, 1-12.

Sadagurski, M., Yakar, S., Weingarten, G., Holzenberger, M., Rhodes, C.J., Breitkreutz, D., Leroith, D., and Wertheimer, E. (2006). Insulin-like growth factor 1 receptor signaling regulates skin development and inhibits skin keratinocyte differentiation. *Molecular and cellular biology* *26*, 2675-2687.

Sadowski, P.D. (1995). The Flp recombinase of the 2-microns plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* *51*, 53-91.

Sanchez-Calderon, H., Rodriguez-de la Rosa, L., Milo, M., Pichel, J.G., Holley, M., and Varela-Nieto, I. (2010). RNA microarray analysis in prenatal mouse cochlea reveals novel IGF-I target genes: implication of MEF2 and FOXM1 transcription factors. *PLoS one* *5*, e8699.

- Santos, A., Yusta, B., Fernandez-Moreno, M.D., and Blazquez, E. (1994). Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor gene in rat brain and liver during development and in regenerating adult rat liver. *Molecular and cellular endocrinology* 101, 85-93.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A.H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature medicine* 10, 55-63.
- Schuller, A.G., van Neck, J.W., Beukenholdt, R.W., Zwarthoff, E.C., and Drop, S.L. (1995). IGF, type I IGF receptor and IGF-binding protein mRNA expression in the developing mouse lung. *Journal of molecular endocrinology* 14, 349-355.
- Serra, R., Pelton, R.W., and Moses, H.L. (1994). TGF beta 1 inhibits branching morphogenesis and N-myc expression in lung bud organ cultures. *Development* 120, 2153-2161.
- Shapiro, P., Absher, P.M., Posada, J.P., and Evans, J.N. (1997). Activation of ERK and JNK1 MAP kinases in cultured lung tissue. *The American journal of physiology* 273, L459-467.
- Shapiro, S.D. (2006). Animal models of asthma: Pro: Allergic avoidance of animal (model[s]) is not an option. *American journal of respiratory and critical care medicine* 174, 1171-1173.
- Shen, H., Fang, Y., Dong, W., Mu, X., Liu, Q., and Du, J. (2012). IGF-1 receptor is down-regulated by sunitinib induces MDM2-dependent ubiquitination. *FEBS open bio* 2, 1-5.
- Shersher, D.D., Vercillo, M.S., Fhied, C., Basu, S., Rouhi, O., Mahon, B., Coon, J.S., Warren, W.H., Faber, L.P., Hong, E., *et al.* (2011). Biomarkers of the insulin-like growth factor pathway predict progression and outcome in lung cancer. *The Annals of thoracic surgery* 92, 1805-1811; discussion 1811.
- Shier, P., and Watt, V.M. (1989). Primary structure of a putative receptor for a ligand of the insulin family. *The Journal of biological chemistry* 264, 14605-14608.
- Shijubo, N., Itoh, Y., Yamaguchi, T., Imada, A., Hirasawa, M., Yamada, T., Kawai, T., and Abe, S. (1999). Clara cell protein-positive epithelial cells are reduced in small airways of asthmatics. *American journal of respiratory and critical care medicine* 160, 930-933.
- Sibilia, M., and Wagner, E.F. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269, 234-238.
- Silva, D., Venihaki, M., Guo, W.H., and Lopez, M.F. (2006). IGF2 deficiency results in delayed lung development at the end of gestation. *Endocrinology* 147, 5584-5591.
- Silverman, E.S., and Collins, T. (1999). Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. *The American journal of pathology* 154, 665-670.
- Simonet, W.S., DeRose, M.L., Bucay, N., Nguyen, H.Q., Wert, S.E., Zhou, L., Ulich, T.R., Thomason, A., Danilenko, D.M., and Whitsett, J.A. (1995). Pulmonary malformation in transgenic mice expressing human keratinocyte growth factor in the lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 12461-12465.
- Skarnes, W.C., Rosen, B., West, A.P., Koutsourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., Mujica, A.O., Thomas, M., Harrow, J., Cox, T., *et al.* (2011). A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 474, 337-342.

Snyder, J.C., Teisanu, R.M., and Stripp, B.R. (2009). Endogenous lung stem cells and contribution to disease. *The Journal of pathology* 217, 254-264.

Spooner, B.S., and Wessells, N.K. (1970). Mammalian lung development: interactions in primordium formation and bronchial morphogenesis. *The Journal of experimental zoology* 175, 445-454.

Srinivasan, S., Strange, J., Awonusonu, F., and Bruce, M.C. (2002). Insulin-like growth factor I receptor is downregulated after alveolarization in an apoptotic fibroblast subset. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 282, L457-467.

Steele-Perkins, G., Plachez, C., Butz, K.G., Yang, G., Bachurski, C.J., Kinsman, S.L., Litwack, E.D., Richards, L.J., and Gronostajski, R.M. (2005). The transcription factor gene *Nfib* is essential for both lung maturation and brain development. *Molecular and cellular biology* 25, 685-698.

Steffen, C.L., Ball-Mirth, D.K., Harding, P.A., Bhattacharyya, N., Pillai, S., and Brigstock, D.R. (1998). Characterization of cell-associated and soluble forms of connective tissue growth factor (CTGF) produced by fibroblast cells in vitro. *Growth Factors* 15, 199-213.

Stewart, C.E., and Rotwein, P. (1996). Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiological reviews* 76, 1005-1026.

Stiles, A.D., and Moats-Staats, B.M. (1989). Production and action of insulin-like growth factor I/somatomedin C in primary cultures of fetal lung fibroblasts. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1, 21-26.

Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z.R., Du, J., Davis, A., Mongare, M.M., Gould, J., Frederick, D.T., *et al.* (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 487, 500-504.

Stripp, B.R. (2008). Hierarchical organization of lung progenitor cells: is there an adult lung tissue stem cell? *Proceedings of the American Thoracic Society* 5, 695-698.

Stull, M.A., Richert, M.M., Loladze, A.V., and Wood, T.L. (2002). Requirement for IGF-I in epidermal growth factor-mediated cell cycle progression of mammary epithelial cells. *Endocrinology* 143, 1872-1879.

Suh, H.S., Zhao, M.L., Derico, L., Choi, N., and Lee, S.C. (2013). Insulin-like growth factor 1 and 2 (IGF1, IGF2) expression in human microglia: differential regulation by inflammatory mediators. *Journal of neuroinflammation* 10, 37.

Sullivan, J.P., Minna, J.D., and Shay, J.W. (2010). Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy. *Cancer metastasis reviews* 29, 61-72.

Sutherland, B.W., Knoblaugh, S.E., Kaplan-Lefko, P.J., Wang, F., Holzenberger, M., and Greenberg, N.M. (2008). Conditional deletion of insulin-like growth factor-I receptor in prostate epithelium. *Cancer research* 68, 3495-3504.

Takahashi, S., Conti, M., and Van Wyk, J.J. (1990). Thyrotropin potentiation of insulin-like growth factor-I dependent deoxyribonucleic acid synthesis in FRTL-5 cells: mediation by an autocrine amplification factor(s). *Endocrinology* 126, 736-745.

- Takanami, I., Imamuma, T., Hashizume, T., Kikuchi, K., Yamamoto, Y., Yamamoto, T., and Kodaira, S. (1996). Expression of PDGF, IGF-II, bFGF and TGF-beta 1 in pulmonary adenocarcinoma. *Pathology, research and practice* 192, 1113-1120.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., and Kahn, C.R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 85-96.
- Teh, M.T., Wong, S.T., Neill, G.W., Ghali, L.R., Philpott, M.P., and Quinn, A.G. (2002). FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas. *Cancer research* 62, 4773-4780.
- Ten Have-Opbroek, A.A. (1981). The development of the lung in mammals: an analysis of concepts and findings. *The American journal of anatomy* 162, 201-219.
- Thrane, E.V., Schwarze, P.E., Thoresen, G.H., Lag, M., and Refsnes, M. (2001). Persistent versus transient map kinase (ERK) activation in the proliferation of lung epithelial type 2 cells. *Experimental lung research* 27, 387-400.
- Thum, T., Hoerber, S., Froese, S., Klink, I., Stichtenoth, D.O., Galuppo, P., Jakob, M., Tsikas, D., Anker, S.D., Poole-Wilson, P.A., *et al.* (2007). Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1. *Circulation research* 100, 434-443.
- Tiozzo, C., De Langhe, S., Yu, M., Londhe, V.A., Carraro, G., Li, M., Li, C., Xing, Y., Anderson, S., Borok, Z., *et al.* (2009). Deletion of Pten expands lung epithelial progenitor pools and confers resistance to airway injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 180, 701-712.
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* 3, 349-363.
- Tominaga, T., Dela Cruz, J., Burrow, G.N., and Meinkoth, J.L. (1994). Divergent patterns of immediate early gene expression in response to thyroid-stimulating hormone and insulin-like growth factor I in Wistar rat thyrocytes. *Endocrinology* 135, 1212-1219.
- Tompkins, D.H., Besnard, V., Lange, A.W., Wert, S.E., Keiser, A.R., Smith, A.N., Lang, R., and Whitsett, J.A. (2009). Sox2 is required for maintenance and differentiation of bronchiolar Clara, ciliated, and goblet cells. *PLoS one* 4, e8248.
- Tong, X., O'Kelly, J., Xie, D., Mori, A., Lemp, N., McKenna, R., Miller, C.W., and Koeffler, H.P. (2004). Cyr61 suppresses the growth of non-small-cell lung cancer cells via the beta-catenin-c-myc-p53 pathway. *Oncogene* 23, 4847-4855.
- Torella, D., Rota, M., Nurzynska, D., Musso, E., Monsen, A., Shiraishi, I., Zias, E., Walsh, K., Rosenzweig, A., Sussman, M.A., *et al.* (2004). Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression. *Circulation research* 94, 514-524.
- Toskala, E., Smiley-Jewell, S.M., Wong, V.J., King, D., and Plopper, C.G. (2005). Temporal and spatial distribution of ciliogenesis in the tracheobronchial airways of mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 289, L454-459.
- Touvron, M., Escoubet, B., Mericskay, M., Angelini, A., Lamotte, L., Santini, M.P., Rosenthal, N., Daegelen, D., Tuil, D., and Decaux, J.F. (2012). Locally expressed IGF1 propeptide improves mouse heart function in induced dilated cardiomyopathy by blocking myocardial fibrosis and SRF-dependent CTGF induction. *Disease models & mechanisms* 5, 481-491.

Travis, S.M., Conway, B.A., Zabner, J., Smith, J.J., Anderson, N.N., Singh, P.K., Greenberg, E.P., and Welsh, M.J. (1999). Activity of abundant antimicrobials of the human airway. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 20, 872-879.

Ueki, K., Okada, T., Hu, J., Liew, C.W., Assmann, A., Dahlgren, G.M., Peters, J.L., Shackman, J.G., Zhang, M., Artner, I., *et al.* (2006). Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic beta cells causes overt diabetes. *Nature genetics* 38, 583-588.

Ullrich, A., Gray, A., Tam, A.W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S., Chen, E., *et al.* (1986). Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The EMBO journal* 5, 2503-2512.

Ustiyani, V., Wang, I.C., Ren, X., Zhang, Y., Snyder, J., Xu, Y., Wert, S.E., Lessard, J.L., Kalin, T.V., and Kalinichenko, V.V. (2009). Forkhead box M1 transcriptional factor is required for smooth muscle cells during embryonic development of blood vessels and esophagus. *Developmental biology* 336, 266-279.

Ustiyani, V., Wert, S.E., Ikegami, M., Wang, I.C., Kalin, T.V., Whitsett, J.A., and Kalinichenko, V.V. (2012). Foxm1 transcription factor is critical for proliferation and differentiation of Clara cells during development of conducting airways. *Developmental biology* 370, 198-212.

van Tuyl, M., Liu, J., Wang, J., Kuliszewski, M., Tibboel, D., and Post, M. (2005). Role of oxygen and vascular development in epithelial branching morphogenesis of the developing mouse lung. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 288, L167-178.

Van Vyve, T., Chanez, P., Bernard, A., Bousquet, J., Godard, P., Lauwerijs, R., and Sibille, Y. (1995). Protein content in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma and control subjects. *The Journal of allergy and clinical immunology* 95, 60-68.

Vaughan, A.E., and Chapman, H.A. (2013). Regenerative activity of the lung after epithelial injury. *Biochimica et biophysica acta* 1832, 922-930.

Velten, M., Heyob, K.M., Rogers, L.K., and Welty, S.E. (2010). Deficits in lung alveolarization and function after systemic maternal inflammation and neonatal hyperoxia exposure. *J Appl Physiol* 108, 1347-1356.

Ventura, J.J., Tenbaum, S., Perdiguero, E., Huth, M., Guerra, C., Barbacid, M., Pasparakis, M., and Nebreda, A.R. (2007). p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nature genetics* 39, 750-758.

Voisset, E., Oeztuerk-Winder, F., Ruiz, E.J., and Ventura, J.J. (2013). p38alpha Negatively Regulates Survival and Malignant Selection of Transformed Bronchioalveolar Stem Cells. *PloS one* 8, e78911.

Volckaert, T., Dill, E., Campbell, A., Tiozzo, C., Majka, S., Bellusci, S., and De Langhe, S.P. (2011). Parabronchial smooth muscle constitutes an airway epithelial stem cell niche in the mouse lung after injury. *The Journal of clinical investigation* 121, 4409-4419.

Vu, T.H., Alemayehu, Y., and Werb, Z. (2003). New insights into saccular development and vascular formation in lung allografts under the renal capsule. *Mechanisms of development* 120, 305-313.

Walenkamp, M.J., van der Kamp, H.J., Pereira, A.M., Kant, S.G., van Duyvenvoorde, H.A., Kruithof, M.F., Breuning, M.H., Romijn, J.A., Karperien, M., and Wit, J.M. (2006). A variable degree of intrauterine and postnatal growth retardation in a family with a missense mutation in the insulin-like growth factor I receptor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91, 3062-3070.

- Walenkamp, M.J., and Wit, J.M. (2007). Genetic disorders in the GH IGF-I axis in mouse and man. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 157 Suppl 1, S15-26.
- Wallace, M.J., Hooper, S.B., and Harding, R. (1995). Effects of elevated fetal cortisol concentrations on the volume, secretion, and reabsorption of lung liquid. *The American journal of physiology* 269, R881-887.
- Wallace, M.J., Hooper, S.B., and Harding, R. (1996). Role of the adrenal glands in the maturation of lung liquid secretory mechanisms in fetal sheep. *The American journal of physiology* 270, R33-40.
- Wallen, L.D., and Han, V.K. (1994). Spatial and temporal distribution of insulin-like growth factors I and II during development of rat lung. *The American journal of physiology* 267, L531-542.
- Wang, J., Ito, T., Udaka, N., Okudela, K., Yazawa, T., and Kitamura, H. (2005). PI3K-AKT pathway mediates growth and survival signals during development of fetal mouse lung. *Tissue & cell* 37, 25-35.
- Wang, J., Zhou, J., Powell-Braxton, L., and Bondy, C. (1999). Effects of Igf1 gene deletion on postnatal growth patterns. *Endocrinology* 140, 3391-3394.
- Wang, L., Schulz, T.C., Sherrer, E.S., Dauphin, D.S., Shin, S., Nelson, A.M., Ware, C.B., Zhan, M., Song, C.Z., Chen, X., *et al.* (2007a). Self-renewal of human embryonic stem cells requires insulin-like growth factor-1 receptor and ERBB2 receptor signaling. *Blood* 110, 4111-4119.
- Wang, S.Z., Rosenberger, C.L., Bao, Y.X., Stark, J.M., and Harrod, K.S. (2003a). Clara cell secretory protein modulates lung inflammatory and immune responses to respiratory syncytial virus infection. *J Immunol* 171, 1051-1060.
- Wang, X., Ryter, S.W., Dai, C., Tang, Z.L., Watkins, S.C., Yin, X.M., Song, R., and Choi, A.M. (2003b). Necrotic cell death in response to oxidant stress involves the activation of the apoptogenic caspase-8/bid pathway. *The Journal of biological chemistry* 278, 29184-29191.
- Wang, Y., Nishida, S., Boudignon, B.M., Burghardt, A., Elalieh, H.Z., Hamilton, M.M., Majumdar, S., Halloran, B.P., Clemens, T.L., and Bikle, D.D. (2007b). IGF-I receptor is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 22, 1329-1337.
- Wani, M.A., Wert, S.E., and Lingrel, J.B. (1999). Lung Kruppel-like factor, a zinc finger transcription factor, is essential for normal lung development. *The Journal of biological chemistry* 274, 21180-21185.
- Wansleben, C., Barkauskas, C.E., Rock, J.R., and Hogan, B.L. (2013). Stem cells of the adult lung: their development and role in homeostasis, regeneration, and disease. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology* 2, 131-148.
- Warburton, D., El-Hashash, A., Carraro, G., Tiozzo, C., Sala, F., Rogers, O., De Langhe, S., Kemp, P.J., Riccardi, D., Torday, J., *et al.* (2010). Lung organogenesis. *Current topics in developmental biology* 90, 73-158.
- Warburton, D., Schwarz, M., Tefft, D., Flores-Delgado, G., Anderson, K.D., and Cardoso, W.V. (2000). The molecular basis of lung morphogenesis. *Mechanisms of development* 92, 55-81.
- Ware, L.B. (2008). Modeling human lung disease in animals. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 294, L149-150.

Warner, B.B., Stuart, L.A., Papes, R.A., and Wispe, J.R. (1998). Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *The American journal of physiology* 275, L110-117.

Warnken, M., Reitzenstein, U., Sommer, A., Fuhrmann, M., Mayer, P., Enzmann, H., Juergens, U.R., and Racke, K. (2010). Characterization of proliferative effects of insulin, insulin analogues and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in human lung fibroblasts. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 382, 511-524.

Watson, T.M., Reynolds, S.D., Mango, G.W., Boe, I.M., Lund, J., and Stripp, B.R. (2001). Altered lung gene expression in CCSP-null mice suggests immunoregulatory roles for Clara cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 281, L1523-1530.

Weaver, T.E., and Whitsett, J.A. (1988). Structure and function of pulmonary surfactant proteins. *Seminars in perinatology* 12, 213-220.

Weibel, E.R. (1973). Morphological basis of alveolar-capillary gas exchange. *Physiological reviews* 53, 419-495.

Weinberger, B., Laskin, D.L., Heck, D.E., and Laskin, J.D. (2002). Oxygen toxicity in premature infants. *Toxicology and applied pharmacology* 181, 60-67.

Werner, H., and Bruchim, I. (2009). The insulin-like growth factor-I receptor as an oncogene. *Archives of physiology and biochemistry* 115, 58-71.

Werner, H., Woloschak, M., Adamo, M., Shen-Orr, Z., Roberts, C.T., Jr., and LeRoith, D. (1989). Developmental regulation of the rat insulin-like growth factor I receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 7451-7455.

Whitsett, J.A., Haitchi, H.M., and Maeda, Y. (2011). Intersections between pulmonary development and disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 184, 401-406.

Wilkie, T.M., Brinster, R.L., and Palmiter, R.D. (1986). Germline and somatic mosaicism in transgenic mice. *Developmental biology* 118, 9-18.

Wilkinson, D.G., Bhatt, S., Ryseck, R.P., and Bravo, R. (1989). Tissue-specific expression of c-jun and junB during organogenesis in the mouse. *Development* 106, 465-471.

Wilson, T.R., Fridlyand, J., Yan, Y., Penuel, E., Burton, L., Chan, E., Peng, J., Lin, E., Wang, Y., Sosman, J., et al. (2012). Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 487, 505-509.

Williams, M.C. (2003). Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. *Annual review of physiology* 65, 669-695.

Wu, J., Bohanan, C.S., Neumann, J.C., and Lingrel, J.B. (2008). KLF2 transcription factor modulates blood vessel maturation through smooth muscle cell migration. *The Journal of biological chemistry* 283, 3942-3950.

Wu, S., Kasisomayajula, K., Peng, J., and Bancalari, E. (2009). Inhibition of JNK enhances TGF-beta1-activated Smad2 signaling in mouse embryonic lung. *Pediatric research* 65, 381-386.

Wuenschell, C.W., Sunday, M.E., Singh, G., Minoo, P., Slavkin, H.C., and Warburton, D. (1996). Embryonic mouse lung epithelial progenitor cells co-express immunohistochemical markers of diverse mature cell lineages. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 44, 113-123.

- Wynn, T.A. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation* 117, 524-529.
- Wynn, T.A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology* 214, 199-210.
- Xian, L., Wu, X., Pang, L., Lou, M., Rosen, C.J., Qiu, T., Crane, J., Frassica, F., Zhang, L., Rodriguez, J.P., *et al.* (2012). Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells. *Nature medicine* 18, 1095-1101.
- Xiao, J., Li, C., Zhu, N.L., Borok, Z., and Minoo, P. (2003). Timeless in lung morphogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 228, 82-94.
- Xie, P., Tang, Y., Shen, S., Wang, Y., Xing, G., Yin, Y., He, F., and Zhang, L. (2011). Smurf1 ubiquitin ligase targets Kruppel-like factor KLF2 for ubiquitination and degradation in human lung cancer H1299 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 407, 254-259.
- Xu, C., Xie, D., Yu, S.-C., Yang, X.-J., He, L.-R., Yang, J., Ping, Y.-F., Wang, B., Yang, L., Xu, S.-L., *et al.* (2013).  $\beta$ -Catenin/POU5F1/SOX2 Transcription Factor Complex Mediates IGF-I Receptor Signaling and Predicts Poor Prognosis in Lung Adenocarcinoma. *Cancer research* 73, 3181-3189.
- Xu, Q., Tam, M., and Anderson, S.A. (2008). Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. *The Journal of comparative neurology* 506, 16-29.
- Xu, X., Weinstein, M., Li, C., Naski, M., Cohen, R.I., Ornitz, D.M., Leder, P., and Deng, C. (1998). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* 125, 753-765.
- Xu, Y., Wang, Y., Besnard, V., Ikegami, M., Wert, S.E., Heffner, C., Murray, S.A., Donahue, L.R., and Whitsett, J.A. (2012). Transcriptional programs controlling perinatal lung maturation. *PLoS one* 7, e37046.
- Xuan, S., Kitamura, T., Nakae, J., Politi, K., Kido, Y., Fisher, P.E., Morroni, M., Cinti, S., White, M.F., Herrera, P.L., *et al.* (2002). Defective insulin secretion in pancreatic beta cells lacking type 1 IGF receptor. *The Journal of clinical investigation* 110, 1011-1019.
- Xuan, S., Szabolcs, M., Cinti, F., Perincheri, S., Accili, D., and Efstratiadis, A. (2010). Genetic analysis of type-1 insulin-like growth factor receptor signaling through insulin receptor substrate-1 and -2 in pancreatic beta cells. *The Journal of biological chemistry* 285, 41044-41050.
- Yamashita, N., Tashimo, H., Ishida, H., Matsuo, Y., Arai, H., Nagase, H., Adachi, T., and Ohta, K. (2005). Role of insulin-like growth factor-I in allergen-induced airway inflammation and remodeling. *Cellular immunology* 235, 85-91.
- Yang, S.Y., and Winslet, M. (2011). The igf system in carcinogenesis and its implication for cancer therapy. *Curr Oncol* 18, 301-302.
- Yang, Y., Zhang, Z., Mukherjee, A.B., and Linnoila, R.I. (2004). Increased susceptibility of mice lacking Clara cell 10-kDa protein to lung tumorigenesis by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a potent carcinogen in cigarette smoke. *The Journal of biological chemistry* 279, 29336-29340.
- Ye, H., Kelly, T.F., Samadani, U., Lim, L., Rubio, S., Overdier, D.G., Roebuck, K.A., and Costa, R.H. (1997). Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial

and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues. *Molecular and cellular biology* 17, 1626-1641.

Yin, M., Guan, X., Liao, Z., and Wei, Q. (2009). Insulin-like growth factor-1 receptor-targeted therapy for non-small cell lung cancer: a mini review. *American journal of translational research* 1, 101-114.

Yoshida, Y., Wang, I.C., Yoder, H.M., Davidson, N.O., and Costa, R.H. (2007). The forkhead box M1 transcription factor contributes to the development and growth of mouse colorectal cancer. *Gastroenterology* 132, 1420-1431.

Yu, H., and Rohan, T. (2000). Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 1472-1489.

Zaher, T.E., Miller, E.J., Morrow, D.M., Javdan, M., and Mantell, L.L. (2007). Hyperoxia-induced signal transduction pathways in pulmonary epithelial cells. *Free radical biology & medicine* 42, 897-908.

Zeger, M., Popken, G., Zhang, J., Xuan, S., Lu, Q.R., Schwab, M.H., Nave, K.A., Rowitch, D., D'Ercole, A.J., and Ye, P. (2007). Insulin-like growth factor type 1 receptor signaling in the cells of oligodendrocyte lineage is required for normal in vivo oligodendrocyte development and myelination. *Glia* 55, 400-411.

Zhang, L., Wang, X.H., Wang, H., Du, J., and Mitch, W.E. (2010). Satellite cell dysfunction and impaired IGF-1 signaling cause CKD-induced muscle atrophy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21, 419-427.

Zhang, M., Xuan, S., Bouxsein, M.L., von Stechow, D., Akeno, N., Faugere, M.C., Malluche, H., Zhao, G., Rosen, C.J., Efstratiadis, A., *et al.* (2002). Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *The Journal of biological chemistry* 277, 44005-44012.

Zhao, J., Bu, D., Lee, M., Slavkin, H.C., Hall, F.L., and Warburton, D. (1996). Abrogation of transforming growth factor-beta type II receptor stimulates embryonic mouse lung branching morphogenesis in culture. *Developmental biology* 180, 242-257.

Zhao, Y.Y., Gao, X.P., Zhao, Y.D., Mirza, M.K., Frey, R.S., Kalinichenko, V.V., Wang, I.C., Costa, R.H., and Malik, A.B. (2006). Endothelial cell-restricted disruption of FoxM1 impairs endothelial repair following LPS-induced vascular injury. *The Journal of clinical investigation* 116, 2333-2343.

Zhou, L., Dey, C.R., Wert, S.E., and Whitsett, J.A. (1996a). Arrested lung morphogenesis in transgenic mice bearing an SP-C-TGF-beta 1 chimeric gene. *Developmental biology* 175, 227-238.

Zhou, L., Lim, L., Costa, R.H., and Whitsett, J.A. (1996b). Thyroid transcription factor-1, hepatocyte nuclear factor-3beta, surfactant protein B, C, and Clara cell secretory protein in developing mouse lung. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 44, 1183-1193.

Zong, C.S., Chan, J., Levy, D.E., Horvath, C., Sadowski, H.B., and Wang, L.H. (2000). Mechanism of STAT3 activation by insulin-like growth factor I receptor. *The Journal of biological chemistry* 275, 15099-15105.