

Bleomicina: un modelo de fibrosis pulmonar

SANDRA CABRERA BENÍTEZ*

* Departamento de Investigación en Fibrosis Pulmonar. Laboratorio de Biología Pulmonar. INER "Dr. Ismael Cosío Villegas".
Trabajo recibido: 31-I-2006; aceptado: 03-III-2006

RESUMEN

La bleomicina es un glicopéptido utilizado para el tratamiento del cáncer cuyo potencial terapéutico está limitado por su toxicidad pulmonar. El efecto citotóxico depende de la dosis e involucra el desarrollo de neumonitis que progres a fibrosis; las células epiteliales alveolares son el blanco principal del daño inducido por la bleomicina. Se considera que la muerte de células epiteliales alveolares por apoptosis es un evento clave en el inicio y la progresión de la fibrosis pulmonar (FP) que se caracteriza por el depósito excesivo de moléculas de la matriz extracelular, principalmente de colágenas fibrilares en el parénquima pulmonar. En la investigación básica de la FP, la bleomicina se ha utilizado como el principal agente fibrogénico en modelos animales.

Palabras clave: Apoptosis, bleomicina, célula epitelial alveolar, estrés oxidante, fibroblasto, fibrosis pulmonar, matriz extracelular.

Key words: Apoptosis, alveolar epithelial cell, bleomycin, extracellular matrix, fibroblast, oxydative stress, lung fibrosis.

Durante los últimos años, el modelo de bleomicina desarrollado en ratones trasgénicos se ha empleado para elucidar in vivo el papel de un gran número de biomoléculas involucradas en la FP.

INTRODUCCIÓN

Las bleomicinas son una familia de glicopéptidos aislados del hongo *Streptomyces verticillus*, identificados inicialmente por Umezawa, en 1966. La bleomicina es un agente antineoplásico atractivo debido a que tiene un efecto mínimo como mielosupresor e inmunosupresor; sin embargo, su eficacia terapéutica se ve limitada por su toxicidad pulmonar pues induce neumonitis y fibrosis pulmonar (FP) en forma dosis-dependiente¹⁻³.

El potencial de la bleomicina para inducir FP experimental fue observado inicialmente en pe-

ABSTRACT

Bleomycin is a glycopeptide used for cancer treatment, but the therapeutic potential of this drug is limited by its lung toxicity. The cytotoxic effect of bleomycin is dose-dependent and involves pneumonitis that proceeds to lung fibrosis (LF). Alveolar epithelial cells are the main target of bleomycin induced injury. Alveolar epithelial cell death by apoptosis is considered as a key event in the initiation and progression of LF, that is characterized by excessive deposition of extracellular matrix, mainly fibrillar collagens in the lung parenchyma. Bleomycin has been used as the main fibrogenic agent in animal models in LF basic research; in recent years, a bleomycin model developed in transgenic mice has been used to elucidate the in vivo role of a great number of biomolecules involved in LF.

53

rros, por Fleischmann, en 1971. Posteriormente se utilizaron mamíferos pequeños como hamsters y cobayos. En 1978, Snider reportó y popularizó la administración de bleomicina en forma intratraqueal. Desde entonces, el modelo de bleomicina ha sido ampliamente utilizado en la investigación básica de la FP¹.

ESTRUCTURA DE LA BLEOMICINA

Las bleomicinas comparten la misma estructura central, pero pueden diferir en el tipo de carbohidratos y cadenas cargadas positivamente que

contienen². Presentan diferentes dominios funcionales:

- a) *Dominio de unión a metales*: este dominio contiene átomos de nitrógeno que coordinan al metal, formando un complejo octaédrico con éste. La unión de la bleomicina con metales de transición como Fe (II) y Cu (I) y en presencia de oxígeno puede catalizar el corte del DNA de cadena sencilla y de cadena doble, además de generar especies de oxígeno reactivas^{2,4-10}.
- b) *Dominio de unión al DNA*: la pirimidina de la bleomicina, en colaboración con el grupo bitiazol, son responsables de la unión con el DNA. Las cargas positivas del grupo bitiazol favorecen la unión electrostática de la bleomicina con el DNA; esta unión puede ocurrir por intercalación o a través de interacciones con el surco menor^{2,8-11}.
- c) *Carbohidratos*: la bleomicina puede estar glicosilada con α -D-manosa y α -L-gulosa. No se conoce con precisión el papel de los carbohidratos, pero existen evidencias de que pueden modular la afinidad de la bleomicina por el DNA^{2,8}.

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA BLEOMICINA

Para activarse la bleomicina requiere de la unión con un metal de transición reducido [Fe (II) o Cu (I)], la presencia de una molécula de oxígeno y un agente reductante. La bleomicina activa ejerce su efecto citotóxico a través de la generación de especies de oxígeno reactivas y por daño directo al DNA y RNA^{9,10-13}.

Daño al DNA: estudios *in vitro* han mostrado que la bleomicina puede cortar directamente el DNA de cadena sencilla y cadena doble, causando cambios globales en la morfología de los cromosomas. El daño de la bleomicina sobre el DNA es dosis-dependiente. Además, se ha determinado que el efecto de la bleomicina es dependiente del ciclo celular (el cual es mayor en las células que se encuentran en la fase G1 y G2/M del ciclo celular) y del estado de activación transcripcional, siendo más susceptible la eucromatina que la heterocromatina. La bleomicina no interfiere directamente con la replicación del DNA, ni con la síntesis del RNA y de las proteínas^{5,11}.

Daño al RNA: recientemente se ha propuesto que el RNA es un blanco potencial de la bleomicina. Se ha demostrado *in vitro* que el RNA puede ser degradado por hidrólisis directa o en forma indirecta por la generación de radicales libres¹².

Generación de especies de oxígeno reactivas: la bleomicina activa puede generar radicales hidroxilo, superóxido y peróxido de hidrógeno, que reaccionan rápidamente con cualquier molécula en forma inespecífica, oxidando lípidos, proteínas y ácidos nucleicos¹³.

HIDROLASA DE BLEOMICINA

Las proteasas de cisteína son un grupo importante de enzimas que incluye a la familia de las caspasas, calpaína y papaína. La hidrolasa de bleomicina (enzima inactivadora de la bleomicina) es una proteasa de cisteína incluida en la familia de la papaína con base en la secuencia de aminoácidos conservada en el dominio catalítico. Es expresada en bacterias, levaduras, aves, reptiles y mamíferos; en estos últimos, se ha demostrado un patrón de expresión tejido-específico. La hidrolasa de bleomicina desamina y, consecuentemente, inactiva la bleomicina; el metabolito deamido-bleomicina carece de citotoxicidad y es incapaz de cortar al DNA. En líneas celulares derivadas de tumores resistentes al daño inducido por bleomicina, se ha demostrado que éstas expresan altos niveles de hidrolasa de bleomicina, las cuales, al ser tratadas con el inhibidor E-64 (tras-epoxisuccinil-L-leucilamido-4-guanidino-butano), un inhibidor específico de proteasas de cisterna, son sensibilizadas al daño. Estas evidencias sugieren que la hidrolasa de bleomicina participa de forma importante en el metabolismo celular de la bleomicina y en el desarrollo de resistencia a esta droga^{4,14-16}.

FIBROSIS PULMONAR INDUCIDA POR BLEOMICINA

Como terapia anticancerígena, la bleomicina puede ser administrada en forma intravenosa, intramuscular o subcutánea; su eliminación ocurre principalmente por vía renal durante las primeras 24 horas después de administrada. Por otro lado, la bleomicina puede ser desactivada por la enzi-

ma hidrolasa de bleomicina, la cual se expresa predominantemente en hígado, bazo, intestino, riñón y médula ósea³.

Se ha propuesto que la toxicidad de la bleomicina, que ocurre principalmente en pulmón y piel, se debe a la ausencia de hidrolasa de bleomicina en esos órganos. En la piel, la bleomicina produce hiperpigmentación dérmica, dermatitis y escleroderma (esclerosis dérmica), proceso fibrótico caracterizado por la acumulación de proteínas de la matriz extracelular en la piel; en pulmón, produce neumonitis intersticial, la cual puede progresar hacia FP^{3,6,7}.

La neumonitis inducida por bleomicina ocurre en un 46% de los pacientes bajo quimioterapia, de los cuales muere el 3%. La neumonitis puede empezar gradualmente durante el tratamiento o desarrollarse meses después de su término. El efecto de la bleomicina es dosis-dependiente; se estima que, en enfermos que han recibido una dosis mayor a 300 mg, la incidencia de neumonitis intersticial es del 3 al 5%, mientras que en los tratados con más de 500 mg es del 20%. Además de la dosis, la edad es otro factor de riesgo para el desarrollo de neumonitis y FP pues

la susceptibilidad aumenta en pacientes mayores de 70 años; sin embargo, también se ha reportado en pacientes jóvenes³.

La neumonitis inducida por bleomicina está caracterizada por daño al epitelio alveolar, metaplasia del epitelio bronquial, daño a la membrana basal, infiltrado de células inflamatorias en los alvéolos y septos alveolares y daño endotelial (Figura 1). Estudios en enfermos han revelado que el daño pulmonar inducido por bleomicina puede progresar a fibrosis cuando la alveolitis no se resuelve adecuadamente y no ocurren la regeneración epitelial y endotelial. El desarrollo de fibrosis involucra un desequilibrio en el metabolismo de la matriz extracelular caracterizado por la acumulación excesiva de colágenas fibrilares en el parénquima pulmonar^{1,3,6,17-20}.

MODELOS EXPERIMENTALES DE FIBROSIS PULMONAR

Mucho de lo que actualmente conocemos sobre la patogénesis de la FP proviene de estudios realizados en animales. Los métodos convencionales

55

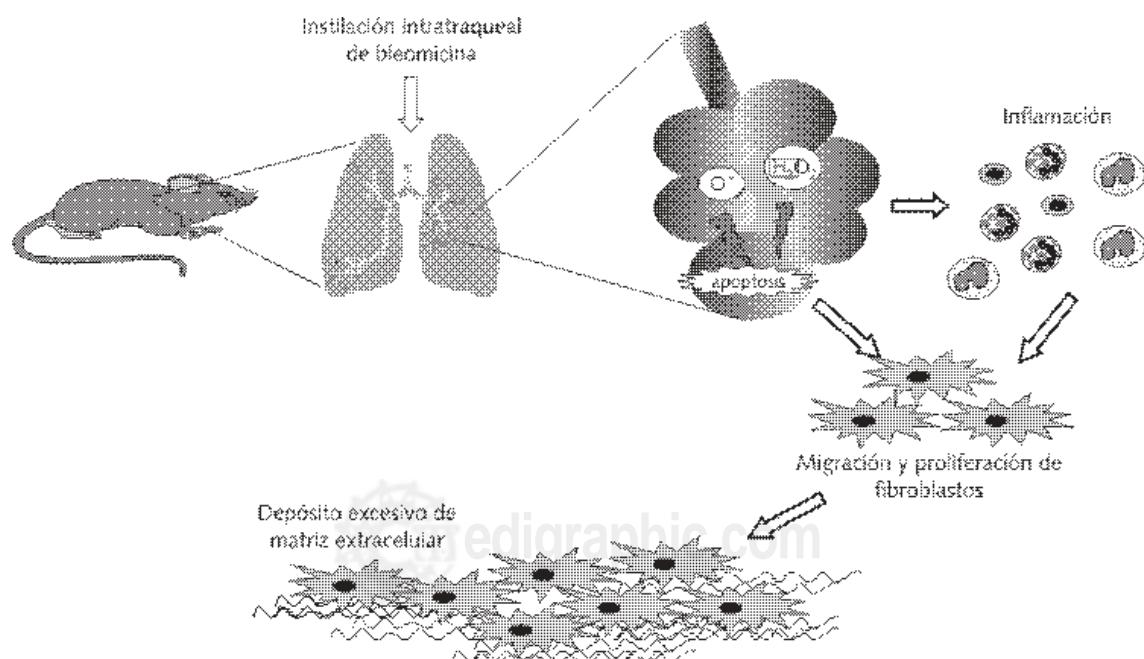


Figura 1. Esquema del modelo animal de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

para inducir FP experimental incluyen la instilación directa de un agente fibrogénico (asbesto, sílice, bleomicina, etcétera) a través de la tráquea o la exposición a radiación torácica de un animal susceptible¹.

La instilación intratraqueal de bleomicina es actualmente el modelo más popular para el estudio *in vivo* de la FP. El ratón (*Mus musculus*) es la especie más utilizada, debido a que presenta varias ventajas sobre otras especies; entre las más importantes: genoma bien caracterizado, ciclo reproductivo corto, camadas grandes, tamaño pequeño, y bajo costo de manutención en bioterios.

Los efectos de la toxicidad pulmonar por bleomicina en humanos son similares en el ratón. La administración intratraqueal de bleomicina produce daño directo al epitelio alveolar, que puede liberar citocinas y factores de crecimiento que participan como quimioatrayentes de células inflamatorias y fibroblastos (Figura 1). Tres días posinstilación hay aumento en la celularidad de los

septos alveolares debido a la infiltración de células inflamatorias, principalmente macrófagos y neutrófilos. Desde el día seis hasta un mes, hay un aumento sostenido de linfocitos que pueden influenciar la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena, liberando factores de crecimiento profibrogénicos. A los 14 días posinstilación se pueden observar cambios difusos y multifocales que consisten en hiperplasia epitelial y fibrosis intersticial e intraalveolar. Después de 21 días se pueden observar focos grandes de fibrosis en forma difusa, caracterizados por la presencia de fibroblastos y miofibroblastos y por el depósito de colágenas fibrilares (Figura 2)⁶.

Tecnología de la transgénesis en el estudio de la fibrosis pulmonar

Los grandes avances en el entendimiento de la FP coinciden, entre otros, con la tecnología de la transgénesis. El Consorcio de Secuenciación del Geno-

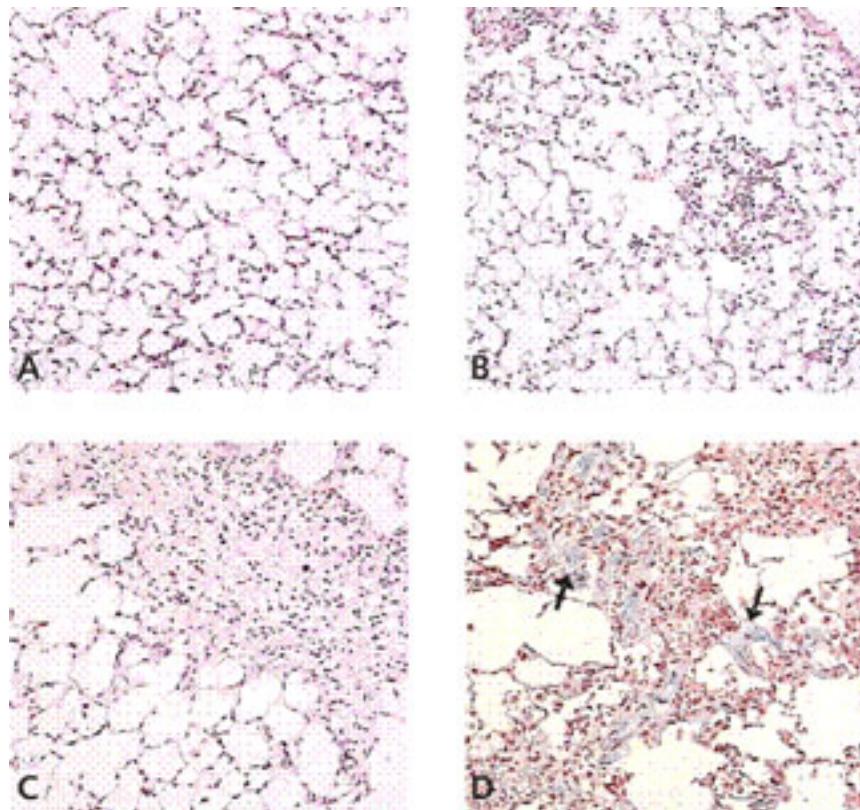


Figura 2. Cambios histológicos observados en el pulmón de un ratón tratado con bleomicina. A) Pulmón de un animal control, B) Infiltrado de células inflamatorias en los espacios alveolares después del tratamiento con bleomicina, C) Foco de fibrosis, D) Depósito de colágenas fibrilares (flechas). Tinción HE (ABC) y tricrómica de Masson (D) 10X.

ma de Ratón publicó la culminación del análisis del genoma de la cepa C57BL/6J en diciembre de 2002. Este suceso contribuyó al desarrollo de la tecnología de la transgénesis, ofreciéndonos la oportunidad de manipular genes específicos para determinar su función en el contexto del organismo completo. El modelo de FP inducida por bleomicina desarrollado, tanto en animales trasgénicos como *knockouts*, ha sido muy útil para comprender los mecanismos moleculares que llevan a la enfermedad, así como para probar tratamientos con diversas drogas y descubrir genes blanco para el desarrollo de terapia. Los ratones *knockout* o nulos son

aquellos que carecen de la expresión de un gen específico, es decir, un gen blanco se elimina de su genoma o se produce una mutación en el gen blanco, generando pérdida de la función¹⁷⁻¹⁹.

En la Tabla I se citan algunos de los animales *knockout* o nulos que han sido utilizados en el estudio de la FP.

DAÑO EPITELIAL PULMONAR INDUCIDO POR LA BLEOMICINA

La apoptosis de las células del epitelio alveolar ha sido implicada como un mecanismo que condu-

Tabla I. Ratones modificados genéticamente utilizados en el estudio de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

Moléculas		Referencias
Citocinas y receptores		
Interleucina-4	IL-4 (-/-)	26
Interleucina-5	IL-5 (-/-)	27, 28
Interleucina-9	IL-9 (-/-)	29
Interleucina-10	IL-10 (-/-)	30
Interleucina-12	IL-12 (-/-)	31
Interleucina-18	IL-18 (-/-)	32
Factor de crecimiento tipo insulina -IA	IGF-IA(-/-)	33
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGF-B (-/-)	34
Factor de crecimiento transformante-alpha	TGF- α (-/-)	35
Factor de necrosis tumoral-alpha	TNF- α (-/-)	36
Fas ligando	FasL(-/-)	22, 23
Factor estimulador de granulocitos	GMC-SF(-/-)	37, 38
Interferón gamma	IFN- γ (-/-)	39
Proteína tipo-10 inducida por IFN- γ	IP-10(-/-)	40
Fas (CD95)	Fas(-/-)	22, 23
CXCR3	CXCR3(-/-)	41
CC-R2	CC-R2(-/-)	42
CD28	CD28(-/-)	43
Sistema fibrinolítico		
Fibrinógeno	FG(-/-)	44
Activador del plasminógeno tipo urokinasa	u-PA(-/-)	45
Inhibidor del activador del plasminógeno	PAI-1(-/-)	46
Moléculas de adhesión		
Molécula intercelular de adhesión tipo 1	ICAM-1(-/-)	47
Selectina L	L-selectin(-/-)	47
Selectina E	E-selectin(-/-)	48
Metaloproteinasas de matriz e inhibidores específicos		
Matrilisina	MMP-7(-/-)	49
Gelatinasa B	MMP-9(-/-)	50
Inhibidor tisular de metaloproteinasas	TIMP-1(-/-)	51
Estrés oxidativo		
Superóxido dismutasa	Ec-SOD (-/-)	52, 53
Gamma-glutamil-transpeptidasa	GGT (-/-)	54
p47phox	p47phox (-/-)	55

57

ce al desarrollo de FP. La apoptosis es un tipo de muerte celular controlado genéticamente y conservado a nivel evolutivo. Existen dos vías de apoptosis: la *extrínseca*, mediada por receptores de muerte transmembranales (por ejemplo, Fas/FasL) y la caspasa-8, y la *intrínseca* mediada por la mitocondria (por ejemplo estrés oxidante) y las caspasas 8 y 9.

Evidencias derivadas, tanto del modelo *in vivo* como de experimentos *in vitro*, sugieren que las células del epitelio alveolar son el principal blanco de la bleomicina; sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales la bleomicina induce apoptosis al epitelio alveolar no se conocen con precisión.

Utilizando el modelo de bleomicina, Hagimoto (1997) demostró por RT-PCR, que el mRNA de Fas y FasL está sobreexpresado en el pulmón de los animales tratados y, por hibridación *in situ*, observaron que las células del epitelio alveolar y bronquial expresan Fas, lo cual estuvo asociado con zonas en donde se detectaron células apoptóticas. En otro modelo en ratón, la inhalación del anticuerpo antiFas produjo apoptosis de células epitelio-alveolares, inflamación y el desarrollo de fibrosis. Por otro lado, se ha demostrado que la neutralización de FasL utilizando anticuerpos reduce el infiltrado de células inflamatorias, previene la apoptosis de células epiteliales y el desarrollo de fibrosis en el modelo de bleomicina²¹.

Posteriormente, para investigar el papel del sistema Fas/FasL en el desarrollo de FP inducida por bleomicina, Kuwano (1999) utilizó ratones portadores de la mutación *lpr*, deficientes de Fas y ratones portadores de la mutación *gld*, que son deficientes de FasL y los trataron con bleomicina. Observaron que el contenido de hidroxiprolina, el número de células epiteliales-alveolares apoptóticas y la tasa de mortandad fue menor en los animales mutantes, comparados con los silvestres²².

Aoshiba, (2000), utilizando los mismos ratones que Kuwano, demostró que el desarrollo de la respuesta inflamatoria y fibrosante fue similar entre los mutantes *lpr*, *gld* y silvestres, y observó la presencia de células apoptóticas en el epitelio bronquial y alveolar, aun en ausencia del sistema Fas/FasL. La conclusión más importante de este trabajo fue que el sistema Fas/FasL no es un pre-

requisito para el daño pulmonar inducido por bleomicina y el desarrollo de fibrosis, y que existen mecanismos apoptóticos que no están basados en las interacciones Fas/FasL. Tales mecanismos pueden incluir la producción de especies reactivas de oxígeno, la síntesis de citocinas proinflamatorias como el TNF- α y TGF- β , o la expresión de genes proapoptóticos como p53, Bax y angiotensina II²³.

La bleomicina es un agente capaz de producir sustancias deficientes en electrones, tales como radicales hidroxilo, superóxido y peróxido de hidrógeno; estas especies reactivas de oxígeno dañan biomoléculas, alteran el estado redox de las células y han sido implicadas en la inducción de muerte celular por apoptosis (Figura 1).

Recientemente, Wallach-Dayan (2005) trataron células epiteliales alveolares (MLE) con bleomicina, y reportó que, después del tratamiento, hay producción de especies reactivas de oxígeno, activación de la caspasa 8 y 9, y apoptosis. También demostraron que el sistema Fas/FasL no está involucrado directamente en la inducción de apoptosis, ya que ésta fue bloqueada al utilizar inhibidores de las caspasas 8 y 9, y por el glutatión (un antioxidante); sin embargo, no tuvieron efecto anticuerpos que bloquearan el sistema Fas/FasL. Estos datos confirman que la bleomicina induce apoptosis a través de la vía mitocondrial o intrínseca y que es dependiente de la generación de especies reactivas de oxígeno; no obstante, es importante señalar que el sistema Fas/FasL representa un mecanismo de amplificación de la apoptosis inducida por bleomicina²⁴.

CONCLUSIONES

El modelo de bleomicina es un buen modelo experimental de enfermedades fibrosantes con etiologías conocidas, como la fibrosis secundaria a neumonitis por hipersensibilidad, o a tuberculosis que, en general, responden al tratamiento con antiinflamatorios; sin embargo, *no representa un modelo análogo a la fibrosis pulmonar idiopática*, enfermedad crónica, progresiva y letal, de etiología desconocida²⁵ que representa la entidad más común y agresiva de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas.

La principal limitante del modelo de bleomicina es que la duración del proceso fibrosante es corto y depende de la dosis de la droga. La mayoría de los investigadores se han concentrado en las etapas tempranas del modelo y han utilizado tiempos cortos, por ejemplo, 21 y 28 días. Existen muy pocos trabajos en donde se haya caracterizado la etapa tardía del modelo; además, la bleomicina generalmente se administra en dosis única, y hay reversión después del proceso fibrosante, lo cual es poco común en humanos y no representa el proceso crónico y progresivo de la FP. Las características histológicas observadas a largo plazo están asociadas con cambios enfisematosos, también es importante considerar la vía de administración de la bleomicina, ya que determina diferencias importantes en la distribución de las lesiones. La instilación intratraqueal produce una distribución bronquiolocéntrica de la fibrosis. El daño pulmonar observado cuando se administra la bleomicina en forma intravenosa o intraperitoneal no tiene un patrón bronquiolocéntrico; el sitio inicial de daño es el endotelio y estructuras perivasculares del parénquima subpleural.

Aunque la mayoría de los modelos animales pueden replicar las características bioquímicas y estructurales de la enfermedad, la historia natural de la respuesta inflamatoria y fibrosante puede diferir significativamente entre humanos y ratones, por lo que es crucial tener cuidado con la extrapolación de datos de modelos animales a humanos.

REFERENCIAS

- Chua F, Gauldie J, Laurent GJ. *Pulmonary fibrosis: searching for model answers*. Am J Respir Cell Mol Biol 2005;33:9-13.
- Chen J, Stubbe J. *Bleomycins: towards better therapeutics*. Nat Rev Cancer 2005;5:102-112.
- Sleijfer S. *Bleomycin-induced pneumonitis*. Chest 2001;120:617-624.
- Ramotar D, Wang H. *Protective mechanisms against the antitumor agent bleomycin: lessons from *Saccharomyces cerevisiae**. Curr Genet 2003;43:213-224.
- Joshi N, Grant SG. *DNA double-strand break damage and repair assessed by pulsed-field gel electrophoresis*. Methods Mol Biol 2005;291:121-129.
- Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, Conner MW, Breuer R. *Time course of bleomycin-induced lung fibrosis*. Int J Exp Pathol 2002;83:111-119.
- Kaminski N, Zuo F, Cojocaro G, et al. *Use of oligonucleotide microarrays to analyze gene expression patterns in pulmonary fibrosis reveals distinct patterns of gene expression in mice and humans*. Chest 2002;121(3 Suppl):31-32.
- Chen J, Stubbe J. *Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues*. Curr Opin Chem Biol 2004;8:175-181.
- Galm U, Hager MH, van Lanen SG, Ju J, Thorson JS, Shen B. *Antitumor antibiotics: bleomycin, enediyynes, and mitomycin*. Chem Rev 2005;105:739-758.
- Bukowski MR, Zhu S, Koehntop KD, Brennessel WW, Que L Jr. *Characterization of an Fe III-O₂H species and its decomposition product in a bleomycin model system*. J Biol Inorg Chem 2004;9:39-48.
- Vorobjev PE, Smith JB, Pyshnaya IA, Levina AS, Zarytova VF, Wickstrom E. *Site-specific cleavage of RNA and DNA by complementary DNA-bleomycin A5 conjugates*. Bioconjug Chem 2003;14:1307-1313.
- Abraham AT, Lin JJ, Newton DL, Rybak S, Hecht SM. *RNA cleavage and inhibition of protein synthesis by bleomycin*. Chem Biol 2003;10:45-52.
- Bukowski MR, Zhu S, Koehntop KD, Brennessel WW, Que L Jr. *Characterization of an Fe III-O₂H species and its decomposition product in a bleomycin model system*. J Biol Inorg Chem 2004;9:39-48.
- Nuver J, Lutke Holzik MF, van Zweeden M, et al. *Genetic variation in the bleomycin hydrolase gene and bleomycin-induced pulmonary toxicity in germ cell cancer patients*. Pharmacogenet Genomics 2005;15:399-405.
- O'Farrell PA, Gonzalez F, Zheng W, Johnston SA, Joshua-Tor L. *Crystal structure of human bleomycin hydrolase, a self-compartmentalizing cysteine protease*. Structure 1999;7:619-627.
- Schwartz DR, Homanics GE, Hoyt DG, Klein E, Abernethy J, Lazo JS. *The neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for epidermal integrity and bleomycin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:4680-4685.
- Mouse Genome Sequencing Consortium. *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome*. Nature 2002;420:520-562.
- Misra RP, Duncan SA. *Gene targeting in the mouse: advances in introduction of transgenes into the genome by homologous recombination*. Endocrine 2002;19:229-238.
- Galli-Taliadoros LA, Sedgwick JD, Wood SA, Kornner H. *Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice*. J Immunol Methods 1995;181:1-15.
- Grande NR, Peao MN, de Sa CM, Aguas AP. *Lung fibrosis induced by bleomycin: structural changes and overview of recent advances*. Scanning Microscopy 1998;12:487-494.
- Hagimoto N, Kuwano K, Miyazaki H, et al. *Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen*. Am J Respir Cell Mol Biol 1997;17:272-278.
- Kuwano K, Hagimoto N, Kawasaki M, et al. *Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis*. J Clin Invest 1999;104:13-19.

23. Aoshiba K, Yasui S, Tamaoki J, Nagai A. *The Fas/Fas-ligand system is not required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice*. Am J Respir Crit Care Med 2000;162(2 Pt 1):695-700.
24. Wallach-Dayan SB, Izicki G, Cohen PY, Gerstl-Golan R, Fine A, Breuer R. *Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005;293:[E. publ. ahead of print].
25. Borzone G, Moreno R, Urrea R, Meneses M, Oyarzun M, Lisboa C. *Bleomycin-induced chronic lung damage does not resemble human idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med 2001;163: 1648-1653.
26. Izicki G, Breuer R. *IL-4 is not a key profibrotic cytokine in bleomycin-induced lung fibrosis model*. J Immunol 2003;171:2767-2768.
27. Gharaee-Kermani M, McGarry B, Lukacs N, Hunningale G, Egan RW, Phan SH. *The role of IL-5 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis*. J Leukoc Biol 1998;64:657-666.
28. Hao H, Cohen DA, Jennings CD, Bryson JS, Kaplan AM. *Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is independent of eosinophils*. J Leukoc Biol 2000;68:515-521.
29. Arras M, Louahed J, Heilier JF, et al. *IL-9 protects against bleomycin-induced lung injury: involvement of prostaglandins*. Am J Pathol 2005;166:107-115.
30. Kradin RL, Sakamoto H, Jain F, Zhao LH, Hymowitz G, Preffer F. *IL-10 inhibits inflammation but does not affect fibrosis in the pulmonary response to bleomycin*. Exp Mol Pathol 2004;76:205-211.
31. Sakamoto H, Zhao LH, Jain F, Kradin R. *IL-12p40 (-/-) mice treated with intratracheal bleomycin exhibit decreased pulmonary inflammation and increased fibrosis*. Exp Mol Pathol 2002;72:1-9.
32. Nakatani-Okuda A, Ueda H, Kashiwamura S, et al. *Protection against bleomycin-induced lung injury by IL-18 in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005;289:L280-L287.
33. Frankel SK, Moats-Staats BM, Cool CD, Wynes MW, Stiles AD, Riches DW. *Human insulin-like growth factor-IA expression in transgenic mice promotes adenomatous hyperplasia but not pulmonary fibrosis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005;288:L805-L812.
34. Li J, Ortiz LA, Hoyle GW. *Lung pathology in platelet-derived growth factor transgenic mice: effects of genetic background and fibrogenic agents*. Exp Lung Res 2002;28:507-522.
35. Madtes DK, Elston AL, Hackman RC, Dunn AR, Clark JG. *Transforming growth factor-alpha deficiency reduces pulmonary fibrosis in transgenic mice*. Am J Respir Cell Mol Biol 1999;20:924-934.
36. Ortiz LA, Lasky J, Hamilton RF Jr, et al. *Expression of TNF and the necessity of TNF receptors in bleomycin-induced lung injury in mice*. Exp Lung Res 1998;24:721-743.
37. Moore BB, Coffey MJ, Christensen P, et al. *GM-CSF regulates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via a prostaglandin-dependent mechanism*. J Immunol 2000;165:4032-4039.
38. Charbeneau RP, Christensen PJ, Chrisman CJ, et al. *Impaired synthesis of prostaglandin E2 by lung fibroblasts and alveolar epithelial cells from GM-CSF-/- mice: implications for fibroproliferation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003;284:L1103-L1111.
39. Segel MJ, Izicki G, Cohen PY, et al. *Role of interferon-gamma in the evolution of murine bleomycin lung fibrosis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003;285:L1255-L1262.
40. Tager AM, Kradin RL, LaCamera P, et al. *Inhibition of pulmonary fibrosis by the chemokine IP-10/CXCL10*. Am J Respir Cell Mol Biol 2004;31:395-404.
41. Jiang D, Liang J, Hodge J, et al. *Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3*. J Clin Invest 2004;114:291-299.
42. Okuma T, Terasaki Y, Kaikita K, et al. *C-C chemokine receptor 2 (CCR2) deficiency improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenuation of both macrophage infiltration and production of macrophage-derived matrix metalloproteinases*. J Pathol 2004;204:594-604.
43. Okazaki T, Nakao A, Nakano H, et al. *Impairment of bleomycin-induced lung fibrosis in CD28-deficient mice*. J Immunol 2001;167:1977-1981.
44. Hattori N, Degen JL, Sisson TH, et al. *Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in fibrinogen-null mice*. J Clin Invest 2000;106:1341-1350.
45. Sisson TH, Hattori N, Xu Y, Simon RH. *Treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by transfer of urokinase-type plasminogen activator genes*. Hum Gene Ther 1999;10:2315-2323.
46. Eitzman DT, McCoy RD, Zheng X, et al. *Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene*. J Clin Invest 1996;97:232-237.
47. Hamaguchi Y, Nishizawa Y, Yasui M, et al. *Intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin regulate bleomycin-induced lung fibrosis*. Am J Pathol 2002;161:1607-1618.
48. Azuma A, Takahashi S, Nose M, et al. *Role of E-selectin in bleomycin induced lung fibrosis in mice*. Thorax 2000;55:147-152.
49. Zuo F, Kaminski N, Eugui E, et al. *Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans*. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:6292-6297.
50. Betsuyaku T, Fukuda Y, Parks WC, Shipley JM, Senior RM. *Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin*. Am J Pathol 2000;157:525-535.
51. Kim KH, Burkhardt K, Chen P, et al. *Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 deficiency amplifies acute lung injury in bleomycin-exposed mice*. Am J Respir Cell Mol Biol 2005;33:271-279.
52. Fattman CL, Chang LY, Termin TA, Petersen L, Enghild JJ, Oury TD. *Enhanced bleomycin-induced pulmonary damage in mice lacking extracellular superoxide dismutase*. Free Radic Biol Med 2003;35:763-771.

53. Bowler RP, Nicks M, Warnick K, Crapo JD. *Role of extracellular superoxide dismutase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002;282:L719-L726.
54. Pardo A, Ruiz V, Arreola JL, et al. *Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice*. Am J Respir Crit Care Med 2003;167:925-932.
55. Manoury B, Nenan S, Leclerc O, et al. *The absence of reactive oxygen species production protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis*. Respir Res 2005;6:11.

Correspondencia:

Sandra Cabrera Benítez.
Departamento de Investigación en
Fibrosis Pulmonar. Laboratorio de
Biología Molecular. Instituto Nacional de
Enfermedades Respiratorias "Dr. Ismael
Cosío Villegas". Calzada de Tlalpan 4502,
colonia Sección XVI. México, DF.,
14080. Teléfono directo 56 66 26 85;
comutador 56 66 45 39,
extensión 229. Correo electrónico:
sandris_cabrera@yahoo.com