

ZUBÍA

REVISTA DE CIENCIAS

MONOGRÁFICO

24

ier

Instituto de Estudios Riojanos

ZUBÍA. MONOGRÁFICO
REVISTA DE CIENCIAS.
Nº 24 (2012). Logroño (España).
P. 1-171, ISSN: 1131-5423

DIRECTORA

Purificación Ruiz Flaño

CONSEJO DE REDACCIÓN

Luis Español González

Rubén Esteban Pérez

Rafael Francia Verde

Juana Hernández Hernández

Luis Miguel Medrano Moreno

Patricia Pérez-Matute

Enrique Requeta Loza

Rafael Tomás Las Heras

CONSEJO CIENTÍFICO

José Antonio Arizaleta Urarte

(Instituto de Estudios Riojanos)

José Arnáez Vadillo

(Universidad de La Rioja)

Susana Caro Calatayud

(Instituto de Estudios Riojanos)

Eduardo Fernández Garbayo

(Universidad de La Rioja)

Rosario García Gómez

(Universidad de La Rioja)

José M^a García Ruiz

(Instituto Pirenaico de Ecología-CSIC)

Javier Guallar Otazua

(Universidad de La Rioja)

Teodoro Lasanta Martínez

(Instituto Pirenaico de Ecología-CSIC)

Joaquín Lasierra Cirujeda

(Hospital San Pedro, Logroño)

Luis Lopo Carramiñana

(Dirección General de Medio Natural del Gobierno de La Rioja)

Fernando Martínez de Toda

(Universidad de La Rioja)

Juan Pablo Martínez Rica

(Instituto Pirenaico de Ecología-CSIC)

José Luis Nieto Amado

(Universidad de Zaragoza)

José Luis Peña Monné

(Universidad de Zaragoza)

Félix Pérez-Lorente

(Universidad de La Rioja)

Eduardo Viladés Juan

(Hospital San Pedro, Logroño)

Carlos Zaldívar Ezquerro

(Dirección General de Medio Natural del Gobierno de La Rioja)

DIRECCIÓN Y ADMINISTRACIÓN

Instituto de Estudios Riojanos

C/ Portales, 2

26071 Logroño

publicaciones.ier@larioja.org

Suscripción anual España (1 número y monográfico): 15 €

Suscripción anual extranjero (1 número y monográfico): 20 €

Número suelto: 9 €

Número monográfico: 9 €

INSTITUTO DE ESTUDIOS RIOJANOS

ZUBÍA

REVISTA DE CIENCIAS

Monográfico Núm. 24

PANORAMA ACTUAL DE LA
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN LA RIOJA

Coordinadora
PATRICIA PÉREZ-MATUTE



Gobierno de La Rioja
Instituto de Estudios Riojanos
LOGROÑO
2012

Panorama actual de la investigación biomédica en La Rioja / coordinadora, Patricia Pérez-Matute. – Logroño : Instituto de Estudios Riojanos, 2012
171 p. : gráf. ; 24 cm – (Zubía. Monográfico, ISSN 1131-5423; 24). – D.L. LR 413-2012
1. Ciencias biomédicas - Investigación - La Rioja. I. Pérez-Matute, Patricia. II. Instituto de Estudios Riojanos. III. Serie
61:001.891(460.21)
57:001.891(460.21)

Reservados todos los derechos. Ni la totalidad ni parte de esta publicación pueden reproducirse, registrarse ni transmitirse, por un sistema de recuperación de información, en ninguna forma ni por ningún medio, sea electrónico, mecánico, fotoquímico, magnético o electroóptico, por fotocopia, grabación o cualquier otro, sin permiso previo por escrito de los titulares del copyright.

- © Logroño, 2012
Instituto de Estudios Riojanos
C/ Portales, 2
26001-Logroño, La Rioja (España)
- © Diseño de cubierta e interior: ICE Comunicación
- © Imagen de la cubierta y contracubierta: Detalle de los efectos del tratamiento de 24 horas de un fármaco antirretroviral sobre el adipocito humano (*Patricia Pérez-Matute*). Fotografías con luz ultravioleta del cerebro (a la izquierda) y del corazón (a la derecha) de un ratón transgénico (*Alfredo Martínez*)

Producción gráfica: Reproestudio, S.A. (Logroño)

ISSN 1131-5423
Depósito Legal: LR 413-2012

Impreso en España - Printed in Spain

ÍNDICE

PRESENTACIÓN

Patricia Pérez-Matute (*Coordinadora*) 7-8

PRIMEROS AÑOS DE ANDADURA DEL CIBIR

José Ignacio Nieto (*Consejero de Salud y Servicios Sociales del Gobierno de La Rioja*) 9-10

MARTA PÉREZ-FERNÁNDEZ, JAVIER PÉREZ, JULIO GÓMEZ

Análisis mediante CG-MS de volátiles en el aliento de personas con cáncer en el tracto respiratorio

Study of breath compounds in people that suffer lung cancer 11-21

SARA VELILLA OSÉS, RUTH ABARZUZA CORTAIRE, EVA RODO ARNEDO, ANA IBÁÑEZ MUÑOZ, SARA MARTA GUALLAR LEZA

Seguimiento de un año con Ranibizumab para el edema macular diabético refractario: estudio piloto

One year follow-up of Ranibizumab for refractory diabetic macular edema:

a pilot study 23-32

ELENA DOMÍNGUEZ-GARRIDO

Diagnóstico Molecular: Genética Humana y Salud en La Rioja

Molecular Diagnostic: Human Genetic and Health in La Rioja 33-40

SONIA MARTÍNEZ-HERRERO, IGNACIO M. LARRÁYOZ, LAURA OCHOA-CALLEJERO, JOSUNE GARCÍA-SANMARTÍN, ALFREDO MARTÍNEZ

Producción de ratones modificados genéticamente como modelos de enfermedades humanas

Production of genetically modified mice as models for human diseases 41-52

GERMÁN CUESTO, NURIA DOMÍNGUEZ-ITURZA, LILIAN ENRÍQUEZ-BARRETO, PATRICIA FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, GADEA MATA, EMILIO SYRIANI, MIGUEL MORALES

La activación de PI3K controla la formación de sinapsis en el sistema nervioso central

PI3K activation controls synaptic formation in the central nervous system 53-80

ROSETE S. PAIS, ICIAR P. LÓPEZ, JOSÉ G. PICHEL

El sistema de IGFs en la homeostasis y patología del pulmón: implicación en su desarrollo, regeneración tras daño y cáncer no microcítico

The IGF system in lung homeostasis and disease: involvement on pulmonary

development, injury recovery, and non-small cell cancer 81-112

**LAURA VINUÉ, ELENA RUIZ, INÉS OLARTE, SERGIO SOMALO,
BEATRIZ ROJO-BEZARES, FERNANDA RUIZ-LARREA, MYRIAM ZARAZAGA,
YOLANDA SÁENZ, CARMEN TORRES**

Frecuencia y caracterización de integrones en aislados clínicos y alimentarios de *Escherichia coli*. La relación entre los integrones y la multiresistencia a antibióticos
Occurrence and characterization of integrons in clinical and food Escherichia coli isolates. The relation between integrons and antimicrobial multiresistance 113-128

**PATRICIA PÉREZ-MATUTE, JOSÉ RAMÓN BLANCO, LAURA PÉREZ-MARTÍNEZ,
JAVIER AGUILERA-LIZARRAGA, EMMA RECIO, MERCEDES SANZ,
CONCEPCIÓN GARCÍA-GARCÍA, JOSÉ ANTONIO OTEO**

Investigación en VIH y Lipodistrofia en el Hospital San Pedro-Cibir: modelos *in vitro* de adipocitos para el estudio de los efectos tóxicos de fármacos antirretrovirales
Research on HIV and Lipodistrophy at San Pedro Hospital-Cibir: in vitro adipocyte models for the study of toxic effects of antiretroviral drugs..... 129-147

**ARÁNZAZU PORTILLO, SONIA SANTIBÁÑEZ, PAULA SANTIBÁÑEZ,
ANA M. PALOMAR, LARA GARCÍA-ÁLVAREZ, LOURDES ROMERO,
LUIS METOLA, VALVANERA IBARRA, JOSÉ R. BLANCO, JOSÉ A. OTEO**

1987: Un caso de enfermedad de lyme - 2012: Centro de Referencia en Rickettsiosis y Enfermedades Transmitidas por Artrópodos Vectores
1987: A case of Lyme disease - 2012: Reference Centre of Rickettsioses and Arthropod-Borne diseases..... 149-163

EL SISTEMA DE IGFS EN LA HOMEOSTASIS Y PATOLOGÍA DEL PULMÓN: IMPLICACIÓN EN SU DESARROLLO, REGENERACIÓN TRAS DAÑO Y CÁNCER NO MICROCÍTICO

ROSETE S. PAIS¹,
ICIAR P. LÓPEZ¹,
JOSÉ G. PICHEL^{1*}

RESUMEN

Las proteínas del sistema de IGFs (*Insulin-like Growth Factors*) están involucradas en la organogénesis del pulmón y en algunas de sus patologías con gran importancia clínica. Aquí se revisan los recientes avances científicos realizados sobre el estudio de la función de los IGFs durante el desarrollo normal del pulmón y en su implicación en patologías respiratorias como la fibrosis y el cáncer de pulmón no microcítico. Los IGFs expresados en el pulmón participan en la génesis y progresión de las neoplasias pulmonares y en su resistencia a la quimioterapia. En estos escenarios biológicos se ha demostrado que la señalización mediada por el receptor de IGFs (IGF1R) es muy relevante, desencadenando una intensa búsqueda de fármacos y protocolos de su administración dirigidos a bloquear la actividad de esta diana molecular. En estos contextos se comentarán algunas contribuciones científicas realizadas por nuestro grupo y las líneas de investigación de interés.

Palabras clave: IGFs, Pulmón, Desarrollo, Fibrosis, Cáncer.

Proteins of the IGF system (Insulin-like Growth Factors) are involved in lung organogenesis and some clinically relevant lung pathologies. Here we review the scientific advances on the study of the function of the IGFs, both during normal development and growth of the lung, as in their involvement in respiratory diseases such as fibrosis and non-small cell lung cancer. IGFs expressed in the lung are involved in the genesis and progression of lung tumors and their resistance to chemotherapy. In these biological scenarios cell signaling mediated by the receptor of IGFs (IGF1R) have been shown quite relevant, which

* E-mail: jgpichel@riojasalud.es.

1. Grupo de Cáncer de Pulmón. Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), C/ Piqueras, 98, 26006 Logroño, La Rioja, España.

has triggered intense research for drugs and their delivery protocols designed to block the activity of this molecular target. In these contexts we will discuss some scientific contributions made by our group, and the research lines of interest.

Key words: *IGFs, lung, development, fibrosis, cancer.*

1. INTRODUCCIÓN

El epitelio respiratorio de los mamíferos, en combinación con otros tipos celulares de las vías respiratorias y del pulmón, realiza la crítica función de conducir e intercambiar los gases respiratorios entre la sangre y la atmósfera, y sirve de barrera para posibles agresiones externas que usen esta vía. 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. Después de las patologías vasculares, las enfermedades respiratorias como el asma, EPOC, *bronquiolitis obliterans*, fibrosis y cáncer de pulmón, son las que generan la mayor mortalidad y morbilidad en pacientes en todo el mundo, manteniéndose en auge continuo, con mayor ritmo si cabe en los países desarrollados (http://www.lungusa.org/assets/documents/publications/lung-disease-data/LDD_2008.pdf) (Knight y Holgate, 2003; Lopez *et al.*, 2006; Crystal *et al.*, 2008). El progresivo avance en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que participan en la génesis y progresión de las patologías pulmonares, que a su vez son en parte compartidas con las que dirigen el desarrollo normal del pulmón, está contribuyendo a optimizar tanto los protocolos de su prevención como las técnicas de su diagnóstico, y sobre todo a mejorar y personalizar su tratamiento. Los avances de la investigación en este campo en los últimos quince años 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 las proteínas que constituyen el sistema de los IGFs (*Insulin-like Growth Factors*), o de los factores de crecimiento relacionados con la insulina. En este artículo se revisarán algunos de los avances científicos realizados en el campo del conocimiento de la función de los IGFs, tanto durante el desarrollo y crecimiento normal del pulmón, como también de su implicación en algunas patologías respiratorias relevantes, como la fibrosis y el cáncer de pulmón no microcítico. En este contexto, se comentarán algunas contribuciones científicas realizadas por nuestro grupo, y las líneas de investigación que se mantienen en progreso.

2. ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA Y DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PULMÓN

El sistema respiratorio de mamíferos lo componen las vías respiratorias altas (nariz, faringe, laringe, tráquea y bronquios) y el pulmón. A su vez el pul-

món se encuentra formado por los bronquiolos, que son las ramas terminales del árbol respiratorio, y por los alvéolos, cuyo entramado genera una gran superficie para realizar el intercambio gaseoso entre el aire y la circulación sanguínea. En la figura 1 se representa cómo el epitelio respiratorio y los constituyentes histológicos que lo acompañan se organizan según un patrón espacial próximo-distal de complejidad decreciente desde la tráquea a los alvéolos pulmonares. El lumen de las vías aéreas está formado por una población mixta de células epiteliales entre las que destacan por su abundancia células ciliadas, aunque también hay células secretoras de moco o *globet cells*, que no son abundantes pero su proporción aumenta tras una inflamación, y células de Clara, también secretoras, que aunque son escasas en humanos son muy abundantes en roedores. En los conductos pulmonares también se encuentran focos de células neuroendocrinas (NE), que se sitúan en pequeños grupos recubiertos de células epiteliales. Los sacos alveolares distales se encuentran recubiertos fundamentalmente por los neumocitos de tipo I, también denominados células alveolares de tipo 1 (AEC1) y los neumocitos de tipo II o células alveolares de tipo 2 (AEC2). El intersticio pulmonar contiene varios linajes celulares de origen mesenquimal donde se incluyen los fibroblastos, los miofibroblastos y las células de músculo liso. Los vasos sanguíneos están formados por poblaciones de células endoteliales arteriales, venosas y capilares, que junto con las células de músculo liso y otras células especializadas forman sus paredes. Asimismo existe un sistema linfático recubierto interiormente por células endoteliales linfáticas. En el pulmón también existen neuronas tanto del sistema simpático como del parasimpático, que inervan las vías aéreas y los vasos sanguíneos. También pueden identificarse, sobre todo en el intersticio pulmonar y en los alvéolos, macrófagos pulmonares especializados acompañados de otras células del sistema inmune. Aparte de la conducción y el intercambio gaseoso, el epitelio de las vías respiratorias constituye la primera línea de defensa para eliminar partículas y microorganismos, bien por el moco generado por las células secretoras y removido por las células ciliadas, o bien mediante la función inmunoreguladora y detoxificadora de las células de Clara y de defensa (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, etc.). 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 indiferenciadas son las responsables de mantener la autoregeneración normal del epitelio y de su reparación tras un daño, pero también parece que juegan un papel importante en la génesis y progresión de enfermedades pulmonares, incluyendo las neoplasias (fig. 1B) (Snyder *et al.*, 2009).

Las células del epitelio respiratorio poseen características diferenciales que las identifican a nivel morfológico, celular y molecular. En las vías aéreas el epitelio que es pseudo-estratificado en la tráquea y bronquios, cambia progresivamente a columnar en los bronquiolos proximales, y a cúbico en los bronquiolos respiratorios terminales, en donde se extiende hasta su zona más distal, que es la confluencia bronquio-alveolar (BADJ). En el epitelio de estos conductos abundan las células ciliadas, que expresan los mar-

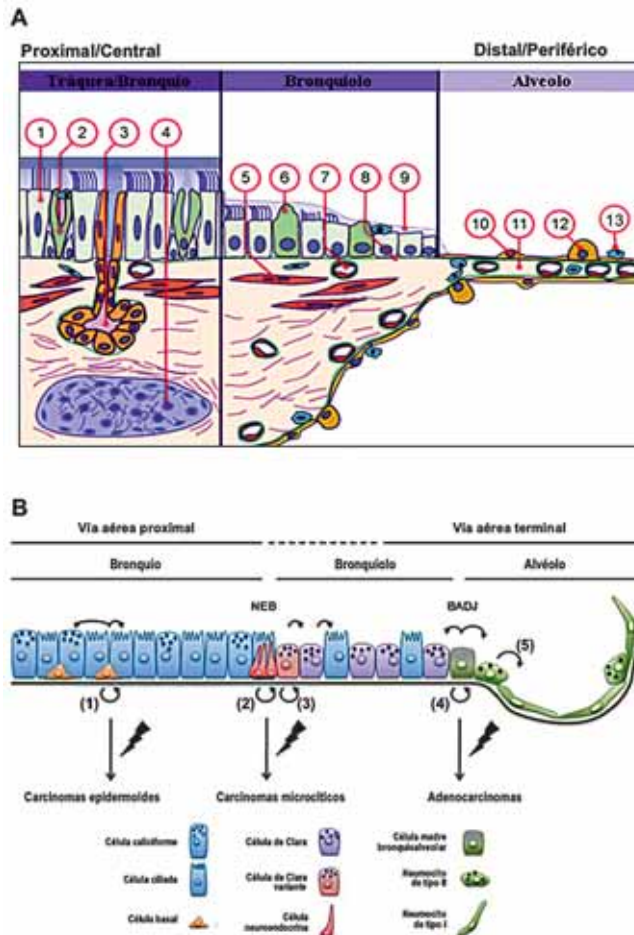


Figura 1. Histología del aparato respiratorio inferior y organización del epitelio pulmonar con sus hipotéticos nichos de auto-renovación y oncogénesis. **A.** Estructura histológica de los diferentes tipos celulares mayoritarios presentes en el árbol respiratorio de las vías humanas. Las estructuras y tipos celulares indicados son: células columnares ciliadas (1), células caliciformes secretoras de moco (2), glándulas (3), y cartilago (4), abundantes en tráquea y bronquios; músculo liso (5), células de Clara (6), capilares (7), membrana basal (8), y surfactante (9), en la zona bronquiolar; y pneumocitos de tipo I o AEC1 (10), septo alveolar (11), pneumocitos de tipo II o AEC2 (12), y macrófagos alveolares y otras células de defensa (13), en la zona alveolar. Nótese el cambio progresivo en la arquitectura tisular y en la composición celular a lo largo del eje próximo-distal. Hay estructuras y tipos celulares comunes en todas las zonas, aunque con diferentes proporciones (p.e. capilares y células de defensa), mientras que otras son más exclusivas. Así, en la zona de septo alveolar, que constituye más del 90% de la superficie epitelial pulmonar, no existe músculo liso y posee en exclusividad los pneumocitos. Las AEC1 fusionan sus membranas basales con los abundantes capilares para formar la barrera alveolo-capilar que permite el intercambio gaseoso aire/sangre. **B.** Tipos celulares del epitelio pulmonar, sus nichos hipotéticos de células madre de auto-renovación e iniciación tumoral, y sus linajes celulares. Arriba se representa la disposición espacial de los diferentes tipos celulares epiteliales que se indican en la parte inferior. Con flechas se representan los hipotéticos linajes de diferenciación de los diferentes tipos celulares. Las mutaciones en los distintos nichos de células madre originarían los diferentes tipos de carcinomas primarios pulmonares (ver texto). NEB, cuerpo neuroendocrino; BADJ, *Bronchio-Alveolar Duct Junction* o unión bronquiol-conducto alveolar (Eramo *et al.*, 2010; Morrissey y Hogan, 2010; Sullivan *et al.*, 2010).

cadore FOXJ1 y Tubulina IV. A los cilios que acompañan las células de Clara, que secretan la proteína de Clara (Scgb1a1, CCSP ó CC10), las células muco-secretoras, que expresan mucinas (como la Muc5a), y las células NE, que expresan Cgrp y Pgp9.5. En la zona del epitelio alveolar distal del pulmón co-existen dos tipos de células: las AEC1 y las AEC2. Las AEC1 son planas y recubren la mayor parte de superficie respiratoria pulmonar en íntimo contacto con el endotelio de los abundantes capilares, son post-mitóticas y expresan las proteínas T1 α y Aqp5, mientras que las AEC2 son cúbico-redondeadas, poseen capacidad de proliferar, secretan lípidos y proteínas surfactantes como la SftpC, y expresan TTF1 (fig. 1B) (Warburton *et al.*, 2000; Eramo *et al.*, 2010; Morrissey y Hogan, 2010; Sullivan *et al.*, 2010).

La compleja organización histológica y anatómica del pulmón se genera durante su organogénesis siguiendo un programa de desarrollo predeterminado genéticamente y guiado a nivel molecular. El desarrollo pulmonar se inicia en el período embrionario con los mecanismos morfogenéticos de ramificación de los conductos aéreos y se culmina postnatalmente con la alveolización o diferenciación y maduración de los alvéolos. A pesar de los avances realizados, aún no se conocen completamente las bases moleculares que guían estos procesos, aunque cómo veremos, los IGFS contribuyen significativamente al desarrollo fetal del pulmón, sobre todo afectando a algunos de los tipos celulares del epitelio respiratorio. La organogénesis pulmonar se divide en cinco etapas denominadas embrionaria, pseudoglandular, canalicular, sacular y alveolar, que se distinguen por sus características histológicas. Estas fases, aunque son similares entre humanos y roedores, poseen una extensión y correlación temporal con el desarrollo del resto del organismo diferentes. Las tres primeras etapas son fundamentalmente morfogenéticas y de proliferación, mientras que en las dos últimas predomina la diferenciación. En el ratón las tres primeras etapas son fetales, y se extienden desde que se inicia su especificación el día embrionario 9 (E9) hasta E17 (fig. 2). En ellas el primordio pulmonar prolifera activamente y se organiza en una estructura epitelial tubular con ramificaciones dicotómicas rodeadas de acúmulos de células mesenquimales. Durante este período el epitelio se mantiene relativamente indiferenciado con una forma cúbica o columnar y expresa de forma casi generalizada desde E10 en adelante el factor de transcripción Ttf1/Nkx2.1. A partir de E14 también se expresa la proteína de las células de Clara (también denominada CCSP, CC10 o Sgcb1a1), aunque en una proporción del epitelio más restringida. A estas tres fases iniciales les siguen las fases sacular y alveolar, en donde predomina la diferenciación celular. En la fase sacular, comprendida entre E17 y el día postnatal 5 (P5), en paralelo a la diferenciación celular ocurre una masiva remodelación tisular, afectando sobre todo a la parte del epitelio distal en donde se forman los sacos alveolares funcionales con septos estrechos, que favorecen el intercambio de gases en el momento del nacimiento en P0 (aproximadamente en el día embrionario E19) (fig. 2). En la fase alveolar y última, que se prolonga hasta P30, se completa la maduración pulmonar, que sobre todo afecta a la formación de los alvéolos definitivos, aunque también progresa la diferenciación de células de Clara y de las célu-

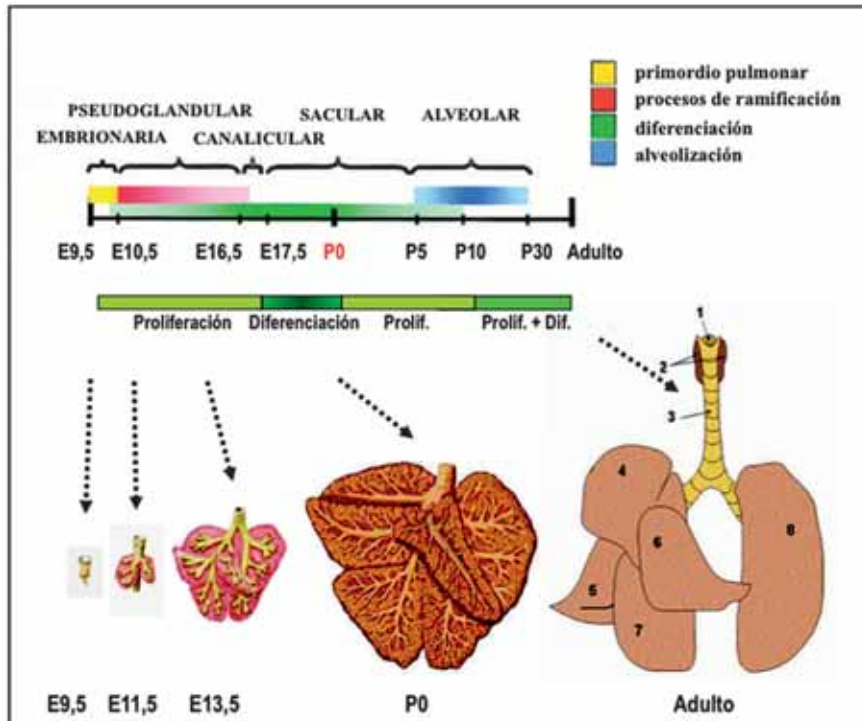


Figura 2. Fases cronológicas y eventos histológicos relevantes en la organogénesis del pulmón de ratón. Denominación de las cuatro fases del desarrollo pulmonar murino basadas en las características histológicas del órgano y su extensión en la escala temporal (corchetes). Las barras con gradiente de color reflejan la progresión temporal de los eventos histológicos y morfológicos más relevantes que se codifican en colores según se especifica. E, estadio embrionario; P, estadio postnatal. En la parte inferior se representa la morfología del pulmón en diferentes estadios: días embrionarios E9,5, E11,5 y E13,5, en el momento del nacimiento (P0) y adulto. En el estadio adulto se enumeran diferentes partes: 1, laringe; 2, tiroides; 3, tráquea; 4-7, lóbulos que componen el pulmón derecho (4, craneal; 5, medio; 6, accesorio; y 7, caudal) y 8, pulmón izquierdo.

las ciliadas en las vías proximales. Después de E17 los septos alveolares se estrechan y el epitelio alveolar inmaduro se diferencia en los dos tipos de pneumocitos o células epiteliales alveolares: las AEC2 y las AEC1, que se diferencian a partir de precursores comunes o a partir de las AEC2. 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 células AEC1 y las células del endotelio capilar (<http://www.ana.ed.ac.uk/database/lungbase/lunghome.html>). Durante la morfogénesis pulmonar las interacciones epitelio-mesénquima, y la proliferación, diferenciación y destino de las células están estrictamente regulados mediante mecanismos celulares y moleculares no del todo conocidos y todavía en estudio (Warburton *et al.*, 2000; Morrisey y Hogan, 2010).

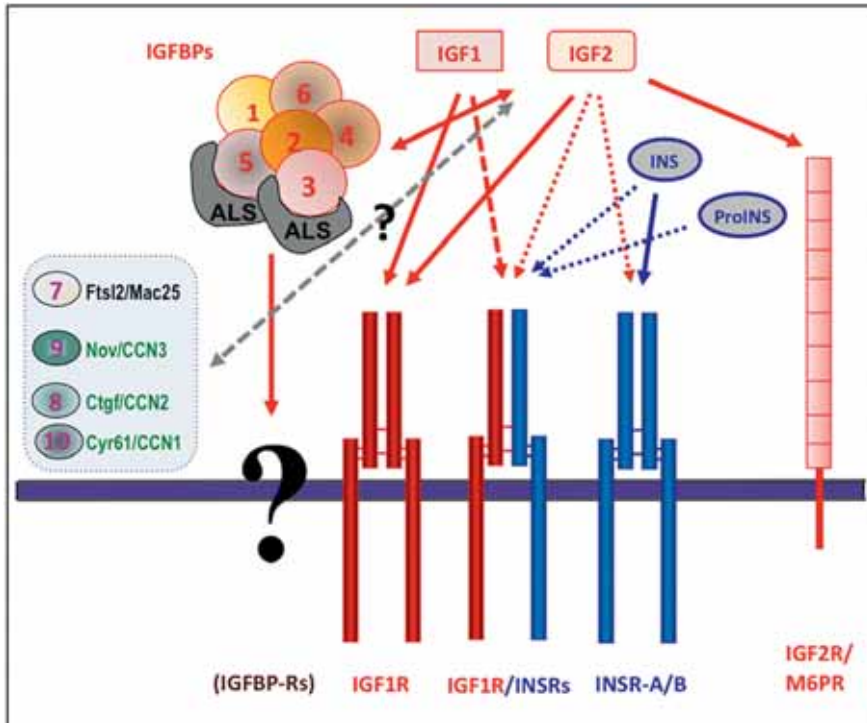


Figura 3. Interrelación funcional de los componentes señaladores del sistema de IGFS a nivel de la membrana celular, señalización cruzada con la vía de la insulina, e hipotética relación con las IGFBPs de baja afinidad. Los componentes del sistema de IGFS se representan en rojo e incluyen los dos ligandos extracelulares IGF1 e IGF2, los receptores de membrana IGF1R e IGF2R, y las seis IGFBPs de alta afinidad, que pueden unirse a la proteína Subunidad Ácido Lábil (ALS). 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 el IGF1R (IGF1R/INSRs). Encuadrados en punteado se representan las proteínas matricelulares también denominadas IGFFBPs de baja afinidad 7 a 10. La existencia de receptores de IGFFBPs (IGFBP-Rs) con actividad independiente de los IGFs es hipotética (Kim *et al.*, 1997; Annunziata *et al.*, 2011). Modificado de LeRoith y Roberts (2003).

3. EL SISTEMA DE LOS IGFS: COMPONENTES, SEÑALIZACIÓN Y FUNCIÓN

El sistema de señalización de los IGFS en sentido estricto está constituido por los dos factores de crecimiento IGF1 e IGF2, que actúan de ligandos extracelulares, el IGF1R o receptor de membrana de estos factores y responsable de transducir su señal intracelularmente, el IGF2R, un receptor que se une a IGF2 pero sin capacidad de señalización, y las seis proteínas que unen IGFs con alta afinidad o IGFFBPs (*IGF Binding Proteins*) (fig. 3) (LeRoith y Roberts, 2003; Pollak, 2008; Massoner *et al.*, 2010). Las características moleculares de estas proteínas en humanos se especifican en la tabla 1.

TABLA 1.
Características moleculares de los miembros del sistema IGF en humanos¹

	Peso molecular (kDa)	Nº de aminoácidos	Localización del gen	Tamaño (Kb)	Nº de exones
IGF1	7,7	70	12q22-12q24	100	6
IGF2	7,5	67	11p15	30	9
IGF1R²	225	Subunidad α : 706 Subunidad β : 626	15q25-15q26	100	21
IGF2R	270	2491	6q25-6q27	140	49
IGFBP-1	25,3	234	7p12-7p14	5,2	4
IGFBP-2	31,4	289	2q31-2q34	32	4
IGFBP-3	28,7	264	7p12-7p14	8,9	5
IGFBP-4	26,0	237	17q12-17q21	12	4
IGFBP-5	28,6	252	2q31-2q24	33	4
IGFBP-6	22,8	216	12q13	4,7	4

¹Según Yu y Rohan (2000).

²IGF1R es una proteína tetramérica constituida por dos subunidades α y dos subunidades β .

IGF1 e IGF2 ejercen su acción de forma autocrina, paracrina, y endocrina al unirse con el IGF1R. El IGF1R es un receptor formado por dos subunidades alfa extracelulares que reconocen específicamente los IGFs, unidas a dos subunidades beta ancladas a la membrana y con un dominio catalítico intracelular con actividad tirosina kinasa. El receptor típicamente señala por dos vías de transducción de señales, la de los IRSs/PI3K/AKT y la de Ras/Raf/MAP-kinasas, aunque entre otras también puede activar la vía de los STATs y la de SRC. El IGF2R, también denominado M6PR, aunque carece de capacidad de señalización intracelular, modula la disponibilidad del IGF2 extracelular posiblemente movilizándolo hacia vías proteolíticas intracelulares (LeRoith y Roberts, 2003; Pollak, 2008; Massoner *et al.*, 2010). La interacción de los ligandos con el receptor está modulada por seis proteínas que unen IGFs con alta afinidad, las IGFBPs 1 a 6 (Jones y Clemmons, 1995). A las proteínas matricelulares Ftsl2/mac5, Nov/CCN3, Ctgf/CCN2 y Cyr61/CCN1 se les ha considerado IGFBPs de baja afinidad, y denominado IGFBP-7 a IGFBP-10, respectivamente, por poseer dominios estructurales muy semejantes a los de las IGFBP-1 a 6. Sin embargo, aunque su afinidad por los IGFS se les ha estimado en 2-3 órdenes de magnitud inferior a la de las IGFBPs de alta afinidad, su capacidad de unir IGFs y modular su actividad no está clara (fig. 3) (Kim *et al.*, 1997; Brigstock, 2003; Chen y Lau, 2009). La homología que existe entre los IGFs y la insulina y también su precursor, la proinsulina, y entre el IGF1R y las dos isoformas del receptor de la insulina, posibilita la señalización cruzada entre ellos, y también con receptores híbridos IGF1R/InsR, aunque con menor afinidad y algunas restricciones. Es importante resaltar que estos receptores híbridos constituyen una fracción substancial de los recep-

tores IGF1R en muchos tejidos de mamíferos (Pandini *et al.*, 2002). Las interacciones ligando-receptor en el sistema de IGFs están sujetas a una compleja regulación como resultado de los niveles de IGFBPs, de los perfiles de expresión, del grado de asociación a la superficie celular y de su degradación por proteólisis. La interrelación funcional de los componentes del sistema de IGFs con los componentes señalizadores de la insulina y las IGFBPs de baja afinidad se esquematiza en la figura 3 (Sara y Hall, 1990; Dziadziuszko *et al.*, 2008; Annunziata *et al.*, 2011).

Los factores IGF1 e IGF2 son proteínas multifuncionales que aunque destacan por su potente actividad mitogénica y anti-apoptótica, también regulan funciones de diferenciación, migración, adhesión, metabolismo y senescencia celular, siempre dependiendo del tipo de célula y de su estado en un momento concreto. El IGF2 posee una actividad más restringida que el IGF1 porque la expresión del gen *Igf2* está regulada por la impronta genómica tanto en ratones como en humanos, aunque de forma diferente: mientras que en ratones casi no se expresa después del nacimiento, en humanos la actividad de su gen se mantiene en el cromosoma heredado de la madre en la mayoría los tejidos normales (DeChiara *et al.*, 1990; DeChiara *et al.*, 1991; Giannoukakis *et al.*, 1993). El sistema de IGFs se activa durante el desarrollo fetal, sobre todos con efectos estimulantes del crecimiento, especialmente en el hueso, glándula mamaria, próstata, músculo y pulmón, pero también regula diferentes aspectos de la remodelación y de la homeostasis tisular durante toda la vida del organismo (Baker *et al.*, 1993; Nakae *et al.*, 2001; Annunziata *et al.*, 2011). Consecuentemente, los IGFs también están implicados en el origen y progreso de muchas patologías incluyendo la fibrosis, la neurodegeneración, el envejecimiento, también de los tumores de diferentes tejidos y órganos (Pollak *et al.*, 2004; Annunziata *et al.*, 2011; Pollak, 2012), que como se verá está representado de forma significativa en el pulmón.

4. LOS IGFS EN EL DESARROLLO PULMONAR: LECCIONES DE LOS RATONES MUTANTES

En el pulmón de mamíferos los IGFs se expresan, tanto durante el desarrollo como en el adulto, en los diferentes tipos celulares mayoritarios (epitelio, endotelio y mesénquima) (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000140443/normal/bronchus>) (Klempt *et al.*, 1992; Schuller *et al.*, 1995; Retsch-Bogart *et al.*, 1996; Srinivasan *et al.*, 2002; Krein *et al.*, 2003; Delafontaine *et al.*, 2004; Warnken *et al.*, 2010). El IGF1 y el IGF2 se expresan a lo largo de todo el desarrollo pulmonar fetal sobre todo en las células mesenquimales, y en el epitelio, alcanzando sus mayores niveles en estadios perinatales. El IGF1 está también presente en altos niveles en los macrófagos alveolares, y el IGF1R se expresa sobre todo en el epitelio de las vías aéreas y en las células AEC2, pero también en el endotelio, tanto en humanos como en ratones (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000140443/normal/bronchus>, y datos propios) (Wallen y Han, 1994; Schuller *et al.*, 1995; Han *et al.*, 2003; Inanlou y Kablar, 2005a, b).

La relevancia de los IGFs durante el desarrollo y diferenciación de los diferentes tipos celulares pulmonares lo demuestran los fenotipos de ratones modificados en estos genes (ratones mutantes *knock out*), cuyas características fenotípicas en el pulmón se resumen en la tabla 2. Como se ha mencionado, los IGFs son imprescindibles para el crecimiento normal pre- y post-natal de casi todos los órganos en el ratón, y los ratones mutantes totales de sus genes presentan un retraso del crecimiento al nacer sustancial: 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). De todos los órganos analizados en los ratones mutantes en el gen *Igf1* (*Igf1*^{-/-}) los pulmones son los que presentan el mayor déficit de crecimiento, presentando un tamaño proporcionalmente más reducido (Wang *et al.*, 1999). Los ratones *Igf1*^{-/-} además de poseer pulmones hipoplásicos en el momento de nacer, presentan atelectasia con reducción del tamaño de los sacos y engrosamiento de los septos alveolares, alteraciones que posiblemente sean las causas de su alta mortalidad postnatal. Los ratones deficientes de IGF1R poseen un fenotipo pulmonar mucho más acusado, con pulmones más hipoplásicos y atelectáticos que los de los *Igf1*^{-/-}, y todos mueren al nacer también posiblemente por insuficiencia respiratoria (Liu *et al.*, 1993; Holzenberger *et al.*, 2000). Sin embargo, los ratones deficientes de IGF2 sobreviven, y aunque muestran un retraso del crecimiento fetal similar a los *Igf1*^{-/-}, su fenotipo pulmonar es casi inapreciable, aunque algunos de los mutantes también poseen una ligera reducción de los espacios alveolares, y septos los alveolares algo engrosados (fig. 4). Curiosamente, en los pulmones prenatales de los embriones *Igf2*^{-/-} la expresión de IGF1 es más elevada de lo normal, posiblemente para compensar la falta de IGF2 (Silva *et al.*, 2006). En su conjunto todos estos datos demuestran que el IGF1R, y principalmente su ligando el IGF1, son necesarios para el desarrollo pulmonar embrionario en el ratón, controlando su crecimiento y la maduración prenatal.

Aunque el fenotipo pulmonar de los ratones mutantes en *Igf1r* no ha sido estudiado en detalle, el de los mutantes *Igf1*^{-/-} ha sido objeto de estudio por nuestro grupo de investigación durante los últimos años. Hemos demostrado que la carencia de IGF1 en los ratones recién nacidos provoca insuficiencia respiratoria debida a una hipoplasia severa del pulmón y colapso de los espacios alveolares. Los pulmones prenatales deficientes de IGF1 son más inmaduros, proliferan más activamente, y presentan tanto alteraciones de la remodelación capilar como de la diferenciación del epitelio respiratorio en la parte alveolar distal, que se manifiesta por un aumento de las células AEC2 (TTF1⁺ y Pro-Sftpc⁺) y reducción de las AEC1 (TTF1⁻, T1α⁺ y Aqp5⁺) (Pichel *et al.*, 2003; Moreno-Barriuso *et al.*, 2006). También observamos que la adición de IGF1 a los cultivos de explantes de pulmones embrionarios, tanto de ratones normales como *Igf1*^{-/-}, favorece la diferenciación del epitelio alveolar, generando una mayor proporción de células AEC1 en detrimento de las AEC2 (Moreno-Barriuso *et al.*, manuscrito en preparación). Mediante el análisis molecular de la expresión transcripcional diferencial en estos pulmones *Igf1*^{-/-} usando *microarrays* de RNA hemos identificado genes diana de IGF1 du-

TABLA 2.
Fenotipo perinatal de los ratones mutantes nulos (knock out) en genes del sistema IGF analizados en un fondo genético híbrido

Genotipo	Mortalidad neonatal	Reducción en el peso del cuerpo	Reducción en el peso del pulmón	Fenotipo del pulmón	Referencias
Igf2 ^{-/-}	Normal	60%	60%	Atelectasia alveolar leve sólo en embriones nacidos de madres Igf-II ^{-/-} . Niveles de IGF1 pulmonar elevados	DeChiara et al. (1990) Liu et al. (1993) Baker et al. (1993) Louvi et al. (1997) Silva et al. (2006)
Igf1 ^{-/-}	60% (100% *)	60%*	30%*	Hipoplasia pulmonar diferencial respecto a la reducción de peso en el resto del cuerpo* Atelectasia severa Septos alveolares gruesos e inmaduros* Fallo en la diferenciación de las células alveolares de tipo I* Elevada proliferación* Alteraciones en la vasculogénesis* Reducción de matriz extracelular y músculo liso* Transcriptoma modificado*	Liu et al. (1993) Baker et al. (1993) Powell-Braxton et al. (1993) Louvi et al. (1997) Wang et al. (1999) Pichel et al. (2003) Moreno-Barruso et al. (2006) Moreno-Barruso et al. (en preparación)
Igf1r ^{-/-}	100 %	45%	ND	Muy hipoplásico Atelectasia muy severa, posible responsable del fallo respiratorio en neonatos	Liu et al. (1993) Louvi et al. (1997) Holzenberger et al. (2000)

* Datos de fenotipos analizados en ratones en un fondo genético cosanguíneo C57Bl/6. El fenotipo pulmonar se agrava y todos los neonatos mueren.
 ND: No determinado.

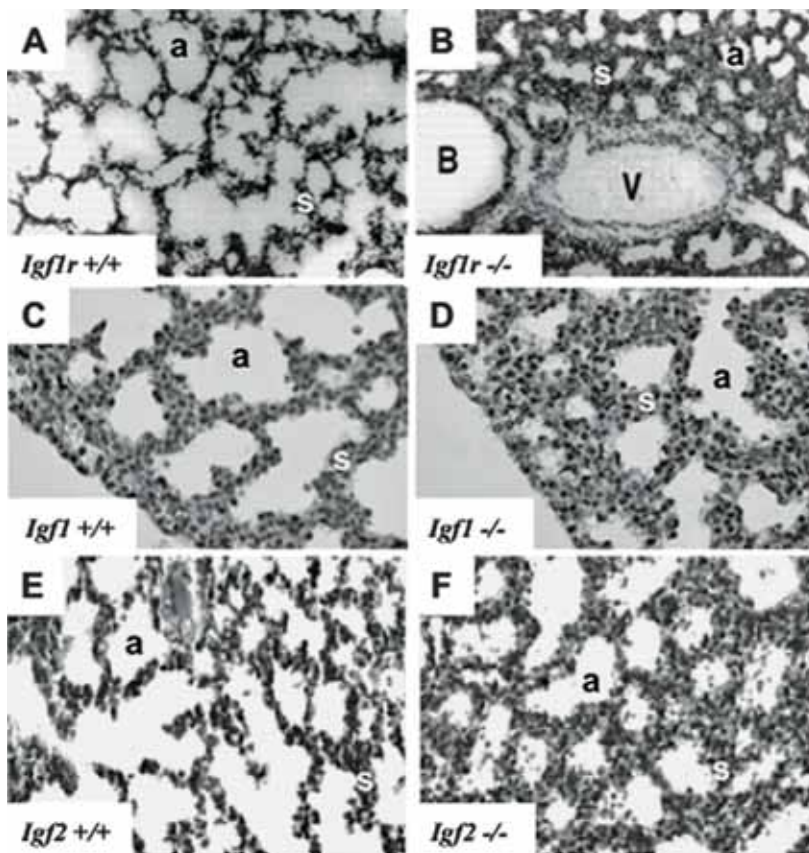


Figura 4. Fenotipo histológico en los pulmones perinatales de los ratones mutantes para los genes *Igf1r*, *Igf1* e *Igf2*. Tinciones de secciones de pulmones de ratones normales (**A**, **C** y **E**) y de hermanos de camada mutantes deficientes de IGF1R (**B**), de IGF1 (**D**) y de IGF2 (**F**). **A** y **B** corresponden a ratones neonatos de un día (P0). **C**, **D**, **E** y **F** corresponden a embriones prenatales en el último día de gestación (E18,5). Nótese cómo los pulmones de los tres ratones mutantes, aunque en diferente proporción, presentan una reducción de los espacios aéreos/alveolares (a) y engrosamiento de los septos alveolares (s). B, Bronquiolo; V, vaso sanguíneo. (**A** y **B** tomado de Holzenberger *et al.* (2000); y concuerda con Liu *et al.* (1993); **C** y **D** tomado de Moreno-Barriuso *et al.* (2006); y, **E** y **F** tomado de Silva *et al.* (2006). Nótese que la magnificación de las microfotografías difiere entre **A-B**, **C-D** y **E-F**).

rante 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 poseen capacidad reguladora ya que se corresponden con factores de transcripción, factores de crecimiento, o factores de matriz extracelular. Muchos ya habían sido implicados previamente en el control del desarrollo pulmonar (p.e. al ser mutados en el ratón generan algún tipo de fenotipo pulmonar) y/o han

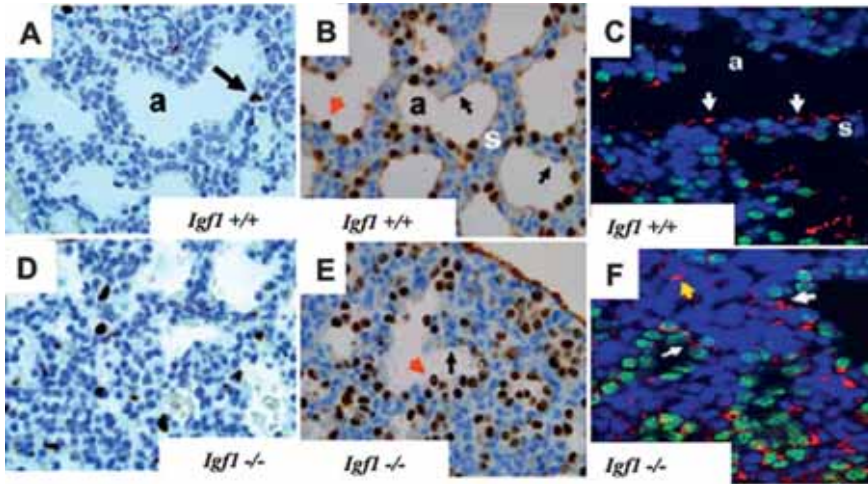


Figura 5. Alteraciones en la proliferación, diferenciación de las células epiteliales alveolares, y remodelado de la vascularización en los pulmones de embriones prenatales de ratones deficientes de IGF1. Secciones transversales de los pulmones de fetos de ratón en estadio embrionario terminal (E18,5), tanto normales (*Igf1*^{+/+}) (A-C) como mutantes para *Igf1* (*Igf1*^{-/-}) (D-F), fueron teñidas inmuno-histoquímicamente para la determinación de incorporación de BrdU en las células que se han dividido (células marcadas en oscuro, flecha) (A y D) para la expresión de TTF1/Nkx2.1, un marcador de células epiteliales alveolares AEC2 teñidas de marrón (flechas rojas en B y E) y para la expresión de CD31/PECAM, un marcador de células endoteliales (teñidas de rojo en C y F, en verde células TTF1⁺ y en azul los núcleos marcados con DAPI). Los pulmones de ratones sin IGF1 presentan mayor proliferación celular, demostrada por un mayor número de células BrdU⁺ (D vs. A), y alteraciones tanto en la diferenciación alveolar con una mayor proporción de células AEC2 (TTF1⁺, flechas rojas) en detrimento de las células AEC1 (TTF1⁺, flechas negras) (E vs. B), como en la remodelación capilar en los septos alveolares, con presencia de capilares sanguíneos alejados el epitelio alveolar (flechas blancas) o inmersos en el abundante mesénquima (flechas amarillas) (F vs. C). a, espacio alveolar; s, septo alveolar. (Tomado de Moreno-Barriuso *et al.* (2006)).

sido descritos como genes diana de los IGFs en el pulmón o en otros contextos biológicos. Entre estos genes se encuentran dos de las previamente mencionadas IGFBP de baja afinidad, la IGFBP10 o CYR61/CCN1 y la IGFBP8 o CTGF/CCN2 (Moreno-Barriuso *et al.*, manuscrito en preparación). Resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que el IGF1 regula la expresión de estos dos genes en líneas celulares derivadas de tumores del epitelio pulmonar humano, y también en células mesenquimales primarias de pulmones de embriones de ratón cultivadas *in vitro*. Sin embargo ni el IGF1 ni el IGF2 ejercen efectos sobre la expresión de estos dos genes en células endoteliales humanas immortalizadas en cultivo (Pais *et al.*, manuscrito en preparación). También hemos observado que los pulmones embrionarios de estos ratones *Igf1*^{-/-} poseen la matriz extracelular desorganizada y el músculo lisosubepitelial más delgado. En este sentido es importante resaltar que recientemente se ha descrito la gran relevancia que posee esta capa muscular para permitir la diferenciación del epitelio y el mantenimiento de los nichos de cé-

lulas madre (Volckaert *et al.*, 2011). La relevancia del receptor IGF1R en el desarrollo de la vasculogénesis y angiogénesis del pulmón fetal lo certifican los experimentos de Han *et al.*, que al tratar explantes de pulmón humano en cultivo con anticuerpos que bloqueen la acción del IGF1R observaron la pérdida de células endoteliales, acompañada de una reducción de la expresión de VEGF y del crecimiento del tejido (Han *et al.*, 2003). En su conjunto, todos estos datos ponen de manifiesto la relevancia que posee el factor de crecimiento IGF1, actuando a través de su receptor el IGF1R, en la organogénesis pulmonar prenatal, y de forma más significativa controlando la diferenciación de las células alveolares.

Al igual que en ratones, la deficiencia de IGF1 en humanos causa fallo del crecimiento corporal intrauterino y postnatal, aunque a ninguno de los pacientes estudiados se le han descrito deficiencias respiratorias en exploraciones rutinarias (Camacho-Hubner *et al.*, 2002; Walenkamp y Wit, 2007). A pesar de ello, la implicación de IGF1 e IGF1R en la patología pulmonar humana está claramente avalada en pacientes con síndrome de deficiencia respiratoria, fibrosis pulmonar o displasia broncopulmonar (Krein *et al.*, 2003; Chetty *et al.*, 2004).

5. LOS IGFS EN EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS PULMONAR: PARTICIPACIÓN EN LA REPARACIÓN DEL DAÑO Y EN LA FIBROSIS

Aunque el epitelio pulmonar adulto pertenece al grupo de los que se autorregenera lentamente, en el pulmón de ratones y de pacientes se han identificado células madre progenitoras dispuestas en localizaciones concretas o nichos y con capacidad de proliferar y diferenciarse siguiendo una jerarquía de linajes celulares (Kajstura *et al.*, 2011; Kadzik y Morrissey, 2012; Longmire *et al.*, 2012; Mou *et al.*, 2012). Estos hipotéticos nichos de células madre pulmonares se representan esquemáticamente en la figura 1B, y 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 bronquios y bronquiolos y que son resistentes al naftaleno, las células de la zona de confluencia del conducto bronquio-alveolar (BADJ) o células ClaraV del BADJ y también resistentes al naftaleno 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 muco-secretoras, células de Clara y células ciliadas, que las células ClaraV sirven de progenitoras de las células de Clara y de las células ciliadas bronquiolares, y las ClaraV del BADJ (CCSP⁺/Pro-Sftp⁺) 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 (fig.1B) (Snyder *et al.*, 2009; Eramo *et al.*, 2010; Morrissey y Hogan, 2010; Rock *et al.*, 2010; Sullivan *et al.*, 2010).

El proceso de regeneración celular del epitelio pulmonar adquiere 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 resultar en una enfermedad respiratoria relevante. Por ejemplo, cuando los bebés y pacientes con síndrome de distrés respiratorio se tratan con hiperoxia (respiración en concentraciones altas de oxígeno) para mantener su oxigenación adecuada, si la hiperoxia es corta causa daños epiteliales y endoteliales agudos que afectan sobre todo al epitelio alveolar y que son reparables. Sin embargo, una exposición prolongada al oxígeno conduce a edema pulmonar intersticial, con proliferación de células epiteliales y mesenquimales y deposición de fibrina en focos del intersticio, que puede terminar en una displasia bronco-pulmonar. En el caso de las enfermedades respiratorias crónicas como el asma, EPOC, la *bronquiolitis obliterans* y fibrosis su origen está en diferentes tipos de daño prolongado del epitelio respiratorio. Este daño crónico genera un remodelado epitelio-mesenquimal atípico con consecuencias devastadoras. Se inicia con un descenso en el número de células de Clara y de células madre progenitoras, hiperplasias y metaplasias de células mucossecretoras, y 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 crónicos inhiben 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. 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; Snyder *et al.*, 2009).

Poco se conoce de los mecanismos moleculares de señalización que ocurren durante la autoregeneración 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. Las lesiones pulmonares provocan sobre todo muerte de las células alveolares AEC1, pero también conllevan a lesiones en el mesénquima 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. Durante la respuesta de curación del paciente, los macrófagos secretan factores de crecimiento como TGFs, PDGFs, FGFs y también IGF1, que inducen proliferación masiva de fibroblastos y células AEC2, vasculogénesis aberrante e inflamación crónica. Los fibroblastos se diferencian en mio-fibroblastos, 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. En su conjunto este proceso se asemeja a una des-diferenciación o una inversión de la maduración del pulmón, que al menos en parte utiliza vías moleculares iguales o similares a las ocurridas durante el desarrollo pulmonar perinatal (Krein *et al.*, 2003; Yamashita *et al.*, 2005; Wynn, 2008).

Diversos trabajos realizados tanto en modelos animales como en pacientes, demuestran fehacientemente que los IGFs participan en la reparación de lesiones y en procesos fibróticos del pulmón. De nuevo los modelos animales de daño pulmonar nos ofrecen una vía para abordar este estudio. Efectivamente, los modelos de daño alveolar por exposición a la hiperoxia o de inducción de fibrosis generados en rata y ratón recapitulan la patología humana (Warner *et al.*, 1998). Se ha demostrado que IGF1, IGF2 e IGF1R aumentan su expresión en diferentes tipos celulares del pulmón, jugando un papel crucial en la proliferación y trans-diferenciación de las células AEC2 a las AEC1 durante el remodelado alveolar tras el daño generado por hiperoxia, tanto en ratas como en ratones (Han *et al.*, 1996a; Han *et al.*, 1996b; Chetty y Nielsen, 2002; Narasaraju *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2012a). Estas observaciones están avaladas por los estudios realizados en humanos, en donde se describe un incremento de la expresión de IGF1 en pacientes con enfermedades relacionadas con lesiones por hiperoxia, como el síndrome del distrés respiratorio o la displasia broncopulmonar, y también en la fibrosis pulmonar idiopática (Krein y Winston, 2002; Krein *et al.*, 2003; Chetty *et al.*, 2004). Si la sobre-expresión de IGF1 e IGF1R, ocurridas en el pulmón tras lesiones de hiperoxia o que causan fibrosis, contribuyen a generar alteraciones patológicas pulmonares y al progreso de muchas enfermedades respiratorias, 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. Esta hipótesis la demuestran al menos dos trabajos realizados en animales modelo. Un primer estudio realizado en ratones mutantes con niveles de expresión de IGF1R en el pulmón muy reducidos (25% del normal, obtenido en animales heterocigotos con un alelo KO y otro hipomorfo del gen *Igf1r*), demuestra que estos ratones poseen una mayor supervivencia y protección contra el daño pulmonar alveolar al ser sometidos a hiperoxia (figs. 6A y 6B) (Ahamed *et al.*, 2005). El segundo estudio ha sido también realizado en ratones, pero en este caso en un modelo animal de fibrosis pulmonar inducida por instilación de bleomicina. Cuando a estos ratones se les trata con un anticuerpo que bloquea la actividad de IGF1R se obtiene una mejoría sustancial de la fibrosis pulmonar, aparentemente mediada por un aumento de la apoptosis de los fibroblastos y una reducción de la migración de las células fibrogénicas (figs. 6C y 6D). Estos modelos animales demuestran que la reducción de la expresión de IGFs o el bloqueo farmacológico del IGF1R pueden ser objetivos a perseguir para el tratamiento del daño alveolar y de la fibrosis pulmonar (Choi *et al.*, 2009).

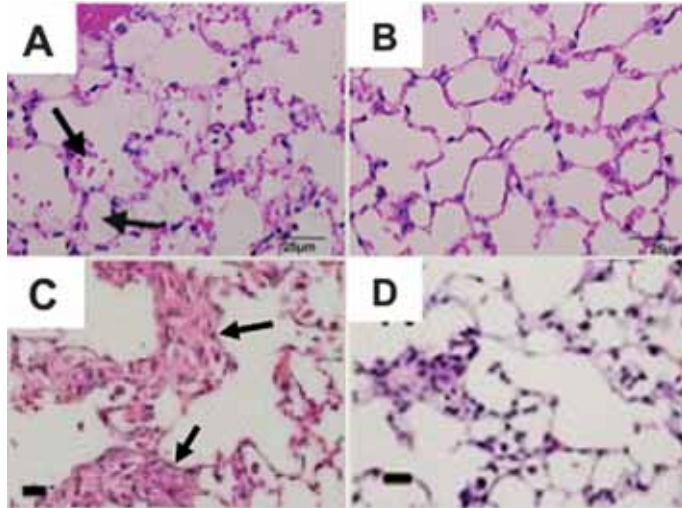


Figura 6. La reducción de IGF1R o el bloqueo de su actividad señalizadora en ratones modelo de hiperoxia o fibrosis pulmonar reduce la severidad de las lesiones. **A** y **B**. El daño alveolar generado en ratones sometidos a hiperoxia durante 72 horas y analizados tras 48 horas de recuperación es más acusado en ratones normales (**A**), que en ratones mutantes que expresan niveles de IGF1R reducido en el pulmón (**B**). Nótese en **A** la presencia de membranas hialinas y edema alveolar (flechas), ausentes en **B** (Tomado de Ahamed *et al.* (2005)). **C** y **D**. La fibrosis generada después de 28 días de la instilación de bleomicina en ratones normales (**C**), es mucho más grave que la observada en ratones en los que se ha bloqueado el IGF1R con el anticuerpo específico A12 (**D**). En **C** hay un significativo engrosamiento de los septos alveolares, mientras que en **D** éste es casi inexistente (flechas) (Tomado de Choi *et al.* (2009)). (Nótese que la magnificación de las microfotografías difiere entre las imágenes de los paneles superiores e inferiores).

6. IMPLICACIÓN DE LOS IGFS EN LA GÉNESIS Y PROMOCIÓN DE LAS NEOPLASIAS PULMONARES

Anteriormente se mencionaba la relevancia de las células madre epiteliales del pulmón en el mantenimiento de la homeostasis de este órgano. Sin embargo, otro aspecto muy relevante de la biología de estas células es su implicación en el origen del cáncer de pulmón. La acumulación de mutaciones en el ADN de estas células 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 V (fig. 1B) (Snyder *et al.*, 2009; Eramo *et al.*, 2010).

La vía de señalización de los IGFS se halla particularmente implicada en la tumorigénesis pulmonar. Esta implicación la corroboran una vez más al-

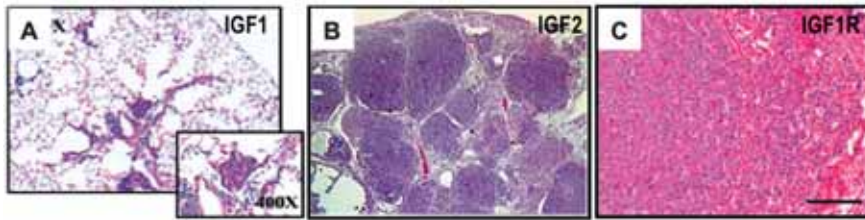


Figura 7. La sobre-expresión de IGFs en los pulmones de ratones transgénicos genera proliferación anómala del epitelio respiratorio o adenocarcinomas típicos. **A**, La sobre-expresión de IGF1 en las células epiteliales AEC2 del compartimento alveolar induce hiperplasias adenomatosas (Tomado de Frankel *et al.* (2005)). **B**, La sobreexpresión generalizada de IGF2 en el pulmón de ratones transgénicos causa adenocarcinomas típicos con características semejantes a las de los adenocarcinomas de pacientes humanos (Tomado de Moorehead *et al.* (2003)). **C**, La sobre-expresión de IGF1R en las células AEC2 también genera adenocarcinomas típicos (Tomado de Linnerth *et al.* (2009)). (Nótese que la magnificación de las microfotografías difiere entre las imágenes).

gunos 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 IGF-1R en el epitelio pulmonar también induce tumorigénesis pulmonar mediada por la activación de AKT, p38 α MAPK, CREB y ATF1, que también terminan en adenocarcinomas (Linnerth *et al.*, 2009) (fig. 7). Algunos datos epidemiológicos también sugieren que altos niveles de IGF1 en la circulación contribuirían de forma endocrina a aumentar el riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer, entre ellos el de pulmón (Baserga *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1999; LeRoith y Roberts, 2003). Sin embargo son los datos experimentales más recientes los que apuntan a que la implicación de los IGFs en la oncogénesis y progresión de las neoplasias pulmonares se realizaría principalmente según un modo de acción autocrino o paracrino dentro del propio tejido pulmonar. Esto lo confirma el hecho de que el IGF1 y el IGF1R se encuentran habitualmente expresados en altos niveles en muchas líneas celulares tumorales de pulmón. La sobre-expresión del receptor IGF1R en estas líneas aumenta considerablemente su potencial metastático cuando se trasplantan en ratones (Nakanishi *et al.*, 1988; Long *et al.*, 1998; Khandwala *et al.*, 2000), y por el contrario las líneas celulares derivadas de carcinomas pulmonares con el gen *Igf1r* defectuoso, tratadas con anticuerpos anti-IGF1R, o que expresan mRNA anti-sentido o formas dominantes negativas de IGF1R poseen menor capacidad de proliferación y muestran más tasa de apoptosis, tanto cultivadas *in vitro* como después de transplantadas en ratones desnudos (Nakanishi *et al.*, 1988; Baserga *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1996; Furstenberger y Senn, 2002; Baserga *et al.*, 2003; Pavelic *et al.*, 2005). En los pacientes, 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.*,

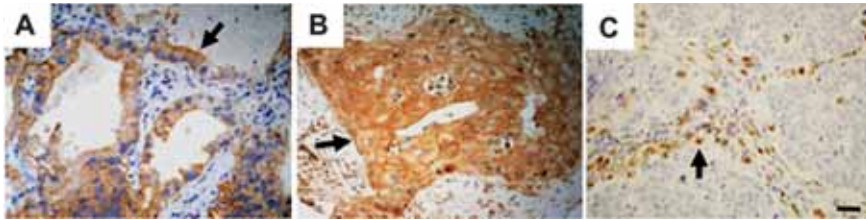


Figura 8. Expresión de IGF1R en tumores no microcíticos de pulmones humanos. Inmunodetección de IGF1R en muestras de tumores de pacientes diagnosticados como adenocarcinomas (A) y carcinomas epidermoides (B y C). Estudios en tumores de una población de pacientes del Hospital de Salamanca demuestra que la sobre-expresión de IGF1R es muy común y más alta en los carcinomas epidermoides. 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 no tumoral del tejido, como vasos sanguíneos y macrófagos (López-Malpartida *et al.*, datos no publicados). Barra de escala: 50 μ m.

2002). También se ha demostrado que entre los diferentes carcinomas pulmonares la expresión del mRNA y la proteína de IGF1R es más elevada en los de tipo epidermoide (figuras 8A y 8B). Otro dato curioso es que además esta expresión se correlaciona con la del EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), otro receptor de tipo tirosina kinasa de gran relevancia la evolución de estos tumores (Borczuk *et al.*, 2003; Dziadziuszko *et al.*, 2010). Estos datos en pacientes también han sido corroborados en nuestro laboratorio (López-Malpartida *et al.*, datos no publicados).

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 (Dziadziuszko *et al.*, 2010). Sin embargo, otros trabajos como el de Kim *et al.* (2009), demuestran fehacientemente que las células epiteliales de las vías respiratorias producen IGFs y que éstos actuarían de una manera autocrina o paracrina, sobre todo en conjunción con los carcinógenos del tabaco, no sólo favoreciendo progresión tumoral sino que incluso induciendo la carcinogénesis. De su trabajo también se concluye que el uso selectivo de fármacos inhibidores de IGF1R es un enfoque racional para el control de cáncer de pulmón (Kim *et al.*, 2009). El concepto de que los IGFs pueden favorecer la progresión de las neoplasias de forma paracrina desde la parte no tumoral del tejido (estroma, vasos sanguíneos, células inflamatorias, etc.) lo apoya un estudio reciente realizado en tumores hematopoyéticos de ratones (Huynh *et al.*, 2011). Resultados de estudios ya realizados o en desarrollo de nuestro grupo también se enmarcarían en este contexto (fig. 8C). Todos estos datos demuestran que los IGFs están muy implicados en la biología de los carcinomas pulmonares primarios por su acción desde la zona tumoral, y posiblemente también de forma paracrina desde el estroma adyacente, tanto en su génesis como en su progresión.

Por último, y no menos importante, cabe mencionar que el IGF1R también está implicado en la resistencia al tratamiento con quimioterapia de los tumores pulmonares, tanto a los tratamientos clásicos, como a los nuevos tratamientos con fármacos dirigidos a dianas moleculares concretas, como es el caso del EGFR activado por mutación (Kim *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2010; Gualberto *et al.*, 2011; Belani *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012b; Pollak, 2012). Esta resistencia a la quimioterapia posee tal repercusión clínica que los IGFs, y sobre todo el IGF1R, están siendo evaluados o recomendados en ensayos clínicos como dianas terapéuticas relevantes en el cáncer de pulmón. En estos ensayos clínicos se valora si la co-administración de inhibidores de IGF1R reducen 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). Según un estudio reciente, el estado de la mutación *EGFR* y adicionalmente de *K-RAS* podría ser un marcador predictivo de la respuesta a los TKIs de IGF1R (Kim *et al.*, 2012a). Por otra parte, el hecho de que la señalización mediada por IGF1R sea compartida por el receptor de la insulina, incluyendo la formación de receptores híbridos funcionales promiscuos (IGF1R/InsRs) con ligandos comunes (fig. 3), también genera un mecanismo de resistencia a los tratamientos anti-IGF1R a través del InsR que se debe tener en cuenta en su diseño (Massoner *et al.*, 2010; Ulanet *et al.*, 2010; Pollak, 2012).

Hace tiempo que se observa que el bloqueo funcional de IGF1R con TKI específicos sensibiliza a las células tumorales de distinto origen al tratamiento con otros fármacos anticancerígenos (Mitsiades *et al.*, 2004). Pero fue en estudios realizados en cultivos *in vitro* de líneas celulares de tumores no microcíticos humanos cuando se describieron algunos de los posibles mecanismos moleculares implicados en esta resistencia. En estos estudios se analiza cómo se genera la resistencia al tratamiento con anticuerpos monoclonales o TKIs específicos del EGFR activado por mutación, demostrando la mediación del IGF1R. En este proceso juega un papel importante la dimerización entre los receptores IGF1R/EGFR. Esta dimerización favorecería la activación de vías de señalización comunes que finalmente resultarían principalmente en señales antiapoptóticas, pero también en sobre-expresión de ambos receptores que resultaría en un incremento de resistencia al tratamiento anti-EGFR (Morgillo *et al.*, 2006; Jin y Esteva, 2008). En un pequeño estudio piloto en tumores no microcíticos de pulmón obtenidos de pacientes también se ha observado que la sobre-expresión de EGFR se asocia con la de IGF1R (Morgillo *et al.*, 2007). Aunque la función de IGF1R en la resistencia a los tratamientos de los 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 reve-

lan la importancia de la señalización a través de IGF1R en el establecimiento y mantenimiento del fenotipo transformante de las neoplasias pulmonares, pero también de la participación de IGF1R en los mecanismos de resistencia a la quimioterapia tanto a la tradicional, como a los novedosos tratamientos dirigidos a dianas moleculares concretas, como es el caso de la inhibición de la actividad del EGFR mutado.

7. PERSPECTIVAS DE FUTURO Y OBSERVACIONES FINALES

En este artículo se han revisado hasta la actualidad tanto los datos publicados por otros autores como los resultados obtenidos por nuestro grupo sobre la investigación de la función de los IGFS durante el desarrollo y maduración del pulmón, así como de su implicación en la patología pulmonar. Los resultados indican que los IGFS expresados en el pulmón, y en concreto la señalización por IGF1R en las células del epitelio respiratorio, desempeñan un papel importante durante el desarrollo y maduración del pulmón, en su autoregeneración, reparación y resistencia al daño pulmonar en el período adulto, y sobre todo, en la génesis y progresión de las neoplasias pulmonares y a su resistencia a la quimioterapia. La relevancia clínica y sanitaria que demuestra este tema, y las dudas y lagunas que quedan por resolver, hace que en la actualidad múltiples grupos de investigación del mundo se interesen en su estudio. Nuestro grupo también participa en este esfuerzo desarrollando dos objetivos o líneas de trabajo que nos interesan. Por una parte tratamos de determinar la función del IGF1R en la diferenciación de las células del epitelio pulmonar durante el desarrollo, y en su regeneración tras un daño, y en una segunda línea de investigación intentamos evaluar la implicación de IGF1R en la resistencia al tratamiento del cáncer de pulmón con fármacos dirigidos contra la actividad del EGFR.

Respecto al primer objetivo, para abordar el estudio de la función de IGF1R en el epitelio respiratorio nos planteamos generar y analizar ratones mutantes condicionales para el gen *Igf1r* en estas células, como modelo de investigación. Como ya se ha mencionado, los ratones *knock out* totales para el gen *Igf1r* se mueren todos al nacer y poseen un fenotipo pulmonar no bien caracterizado (Liu *et al.*, 1993). Esto por una parte imposibilita el estudio de la función del receptor post-natalmente, y además al carecer de la función génica en todas las células, no es un buen modelo para estudiar la función génica en un tipo celular específico. Para evitar esto hemos generado dos tipos de ratones mutantes condicionales deficientes de IGF1R en las células del epitelio respiratorio (fig. 9). Para conseguir estos mutantes, los ratones mutantes homocigotos para el gen *Igf1r*, con secuencias *loxP* flanqueando el exon 3 y fenotipo normal (*Igf1r^{fllox/lox}*) (Kloting *et al.*, 2008), se han cruzado con dos líneas de ratones transgénicos hemicigotos diferentes, que también presentan un fenotipo normal, y que expresan la recombinasa *Cre* de forma específica en determinados tipos celulares del epitelio respiratorio (*Cre^{Tg/+}*) de forma dependiente del promotor que dirige el control de su expresión. La primera línea de transgénicos usada fue la denominada *CCSP-Cre*, que supuestamente

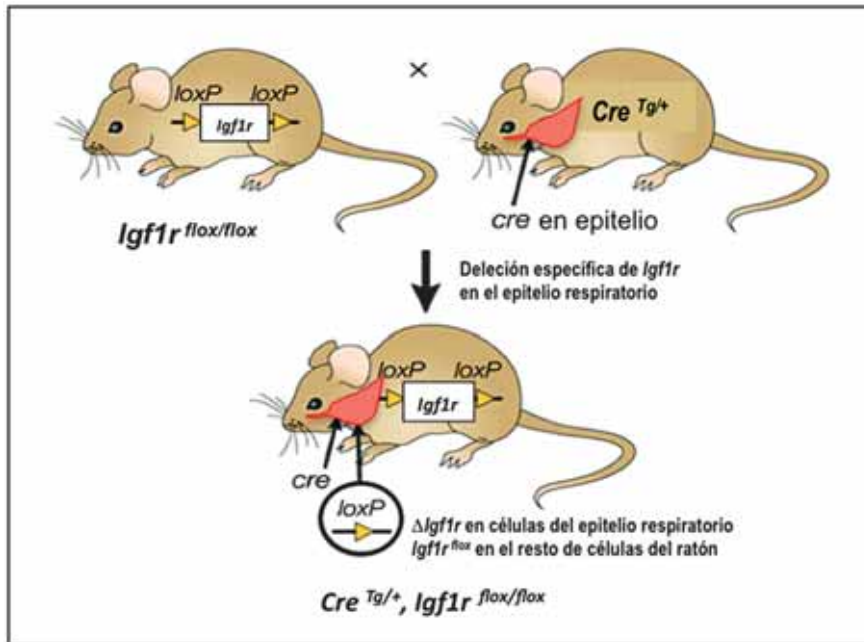


Figura 9. Generación de ratones mutantes condicionales deficientes de IGF1R en el epitelio respiratorio. Los ratones mutantes homocigotos para el gen *Igf1r*, con secuencias *loxP* flanqueando el exón 3 y fenotipo normal (*Igf1r^{flox/flox}*), se cruzan con líneas de ratones transgénicos que también presentan un fenotipo normal, y que expresan la recombinasa *Cre* de forma específica en determinados tipos celulares del epitelio respiratorio (*Cre^{Tg+}*), dependiendo del promotor que dirige el control de su expresión (ver texto). En la segunda generación se generarán entre otros los mutantes condicionales con el genotipo *Cre^{Tg+}, Igf1r^{flox/flox}*. En estos ratones la expresión de *Cre* está condicionada por el promotor a ciertas células del epitelio las que provocará la eliminación selectiva de las secuencias del DNA genómico entre las secuencias *loxP* del exón 3 en el gen *Igf1r* (Δ *Igf1r*), y consecuentemente la carencia del receptor, mientras las demás células del ratón mantienen una expresión y función normal de IGF1R (*Igf1rflox/flox*).

dirige *Cre* a todas las células de Clara del epitelio usando el promotor del gen de la proteína CCSP/CC10/Scgb1a1 (Bertin *et al.*, 2005). La segunda línea es la *Nkx2.1-Cre*, que al usar el promotor del gen del factor de transcripción *Nkx2.1/TTF1/TITF1*, dirige *Cre* a la mayoría de las células del epitelio, incluyendo las células AEC2 del compartimento alveolar, y desde los estadios iniciales de la organogénesis pulmonar (Tiozzo *et al.*, 2009). Al cruzar los ratones con genotipo *Cre^{Tg+}; Igf1rflox/+* obtenidos en la primera generación de nuevo con ratones *Igf1rflox/flox*, en la F2 se generarán un 25% de ratones mutantes condicionales con el genotipo de interés *Cre^{Tg+}, Igf1rflox/flox*, además de otros tres genotipos que sirven de controles experimentales. En estos ratones la expresión de *Cre* dirigida de forma específica por el promotor del transgen a ciertas células del epitelio, provocará la recombinación y eliminación de las secuencias del DNA genómico entre las secuencias *loxP* del exón 3 en el gen

Igf1r (Δ *Igf1r*), y consecuentemente la carencia funcional de IGF1R en las células en las que se exprese Cre, mientras las demás células del animal mantienen una expresión y función normal de IGF1R (*Igf1rf^{lox/lox}*). Los ratones mutantes condicionales con el genotipo *CCSP-Cre^{Tg/+}; Igf1r^{lox/lox}* son viables, normales y fértiles, y sin fenotipo histológico aparente en el pulmón, y después de haber sido sometidos a un protocolo de daño epitelial inducido con naftaleno, que causa la muerte específica de las células de Clara (Tiozzo *et al.*, 2009), parece que el epitelio en estos ratones se regenera de forma muy normal. Esta falta de un fenotipo claro y evidente podría ser debida a que la delección de *Igf1r* no se realizara de forma generalizada en todas las células de Clara, ya que parece que ocurre sólo en pequeños grupos aislados de células en forma de mosaico. Este efecto puede ser consecuencia de la mala efectividad del transgen *CCSP-Cre*, o la dificultad de acceso de Cre a las secuencias loxP del locus *Igf1r^{lox/lox}*. Este hecho está limitando el seguimiento del posible fenotipo de estos ratones y dificulta enormemente su análisis. Los estudios detallados a nivel celular y molecular que están en progreso podrán dirimir la extensión de la carencia de IGF1R en las células de Clara, y si ésta supone algún tipo de fenotipo y/o limitación funcional del epitelio pulmonar.

Por su parte los ratones *Nkx2.1-Cre^{Tg/+}; Igf1r^{lox/lox}* del segundo modelo de mutantes condicionales están todavía en proceso de generación. En este caso la eliminación funcional de IGF1R debería afectar a una gran proporción de células del epitelio, incluyendo las células AEC2 alveolares, e iniciándose en etapas tempranas del desarrollo pulmonar. Esta delección epitelial generalizada de IGF1R podría provocar una inmadurez del epitelio en el momento del nacimiento resultando en mortalidad postnatal. Esta situación requeriría un estudio del fenotipo pulmonar durante la embriogénesis. Por el contrario, si los ratones son viables, se estudiaría su fenotipo después de ser sometidos a diferentes situaciones de compromiso, como el tratamiento con naftaleno para analizar la regeneración de las células de Clara (Tiozzo *et al.*, 2009), la exposición a hiperoxia para estudiar el daño alveolar (Ahamed *et al.*, 2005), la instilación con bleomicina para evaluar su resistencia a generar fibrosis pulmonar (Choi *et al.*, 2009), o a tratamientos con mutágenos como las nitrosaminas para explorar su susceptibilidad de desarrollar tumores pulmonares (Siwicky *et al.*, 2011). El uso combinado de los diferentes modelos de inducción de diferentes tipos de daño pulmonar con los modelos de animales mutantes condicionales permitirá evaluar la relevancia funcional del IGF1R en diferentes tipos celulares del epitelio y en diferentes estadios de desarrollo del animal.

El estudio de la implicación de IGF1R en la resistencia al tratamiento del cáncer de pulmón con fármacos dirigidos contra la actividad del EGFR, objeto de nuestra segunda línea de trabajo, se realizará en muestras de pacientes con cáncer de pulmón. Está demostrado que los inhibidores tirosín kinasa del EGFR son eficaces para tratar carcinomas de pulmón, y más eficazmente cuando este receptor está mutado, que en España supone alrededor un 15% de los pacientes (Rosell *et al.*, 2009). Desde hace un par años se ha aprobado el uso clínico del inhibidor tirosín kinasa del EGFR gefitinib (Tarceba®) como segunda línea de tratamiento de pacientes con adenocarcinomas y car-

cinomas epidermoides de pulmón avanzados cuando estos tumores poseen mutaciones activadoras del EGFR (Mok *et al.*, 2009). Inicialmente nuestro trabajo pretende determinar los niveles de expresión y activación del IGF1R mediante tinciones inmunohistoquímicas en las muestras de biopsias o de resecciones quirúrgicas de los tumores antes de iniciado el tratamiento anti-IGF1R del paciente. Posteriormente estos datos se correlacionarán con la respuesta del tumor al tratamiento evaluando diferentes parámetros de la evolución del tumor y de la enfermedad del paciente. El estudio permitirá determinar la validez de la expresión y la activación de IGF1R como posibles marcadores de la resistencia los carcinomas del pulmón a los tratamientos anti-EGFR, y podría apoyar el uso de terapias farmacológicas combinadas, incluyendo de forma personalizada la administración de fármacos anti-IGF1R en el tratamiento de los pacientes con estos tumores.

En este artículo hemos visto cómo los experimentos *in vitro* que usan células en cultivo o los realizados con animales de experimentación como modelos de enfermedades generan información sobre los mecanismos moleculares de la acción de los IGFs sobre diferentes tipos celulares y circunstancias del pulmón. En ocasiones esta información se ha visto ratificada, completada y ampliada con el estudio de la patología molecular de muestras de pacientes con enfermedades pulmonares. Los datos generados por la comunidad científica de los que trabajamos en este campo hacen posible generar conocimiento con la esperanza de que finalmente permita diseñar nuevos marcadores de diagnóstico, o ensayos clínicos que evalúan el uso de nuevos fármacos (p.e. anti-IGF1R) y los protocolos de su administración a los pacientes afectados con estas patologías.

AGRADECIMIENTOS

A Raquel Torrens, Técnico de Laboratorio en nuestro grupo por su inestimable apoyo a la rutina de trabajo diaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahamed, K., Epaud, R., Holzenberger, M., Bonora, M., Flejou, J. F., Puard, J., Clement, A., Henrion-Caude, A. (2005). Deficiency in type 1 insulin-like growth factor receptor in mice protects against oxygen-induced lung injury. *Respir Res* 6, 31.
- Annunziata, M., Granata, R., Ghigo, E. (2011). The IGF system. *Acta Diabetol* 48, 1-9.
- Baker, J., Liu, J. P., Robertson, E. J., Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75, 73-82.
- Baserga, R., Sell, C., Porcu, P., Rubini, M. (1994). The role of the IGF-I receptor in the growth and transformation of mammalian cells. *Cell Prolif* 27, 63-71.

- Baserga, R., Peruzzi, F., Reiss, K. (2003). The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer* 107, 873-877.
- Belani, C. P., Goss, G., Blumenschein, G., Jr. (2012). Recent clinical developments and rationale for combining targeted agents in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cancer Treat Rev* 38, 173-184.
- Bertin, G., Poujeol, C., Rubera, I., Poujeol, P., Tauc, M. (2005). In vivo Cre/loxP mediated recombination in mouse Clara cells. *Transgenic Res* 14, 645-654.
- Borczuk, A. C., Gorenstein, L., Walter, K. L., Assaad, A. A., Wang, L., Powell, C. A. (2003). Non-small-cell lung cancer molecular signatures recapitulate lung developmental pathways. *Am J Pathol* 163, 1949-1960.
- Brigstock, D. R. (2003). The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol* 178, 169-175.
- Camacho-Hubner, C., Woods, K. A., Clark, A. J., Savage, M. O. (2002). Insulin-like growth factor (IGF)-I gene deletion. *Rev Endocr Metab Disord* 3, 357-361.
- Chen, C. C., Lau, L. F. (2009). Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 771-783.
- Chetty, A., 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.
- Chetty, A., Andersson, S., Lassus, P., 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. *Pediatr Pulmonol* 37, 128-136.
- Choi, J.-E., Lee, S.-S., Sunde, D. A., Huizar, I., Haugk, K. L., Thannickal, V. J., Vittal, R., Plymate, S. R., Schnapp, L. M. (2009). Insulin-like Growth Factor-I Receptor Blockade Improves Outcome in Mouse Model of Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 212-219.
- Crystal, R. G., Randell, S. H., Engelhardt, J. F., Voynow, J., Sunday, M. E. (2008). Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc* 5, 772-777.
- Dechiara, T. M., Efstratiadis, A., 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., Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 64, 849-859.
- Delafontaine, P., Song, Y. H., Li, Y. (2004). Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 435-444.
- Dzadzadzuszko, R., Camidge, D. R., Hirsch, F. R. (2008). The insulin-like growth factor pathway in lung cancer. *J Thorac Oncol* 3, 815-818.

- Dziadziuszko, R., Merrick, D. T., Witta, S. E., Mendoza, A. D., Szostakiewicz, B., Szymanowska, A., Rzyman, W., Dziadziuszko, 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. *J Clin Oncol* 28, 2174-2180.
- Eramo, A., Haas, T. L., De Maria, R. (2010). Lung cancer stem cells: tools and targets to fight lung cancer. *Oncogene* 29, 4625-4635.
- Frankel, S. K., Moats-Staats, B. M., Cool, C. D., Wynes, M. W., Stiles, A. D., Riches, D. W. (2005). Human insulin-like growth factor-IA expression in transgenic mice promotes adenomatous hyperplasia but not pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288, L805-812.
- Furstenberger, G., Senn, H.J. (2002). Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol* 3, 298-302.
- Giannoukakis, N., Deal, C., Paquette, J., Goodyer, C. G., and Polychronakos, C. (1993). Parental genomic imprinting of the human IGF2 gene. *Nat Genet* 4, 98-101.
- Gualberto, A., Hixon, M. L., Karp, D. D., Li, D., Grenn, 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. *Br J Cancer* 104, 68-74.
- Han, R. N., Buch, S., Tseu, I., Young, J., Christie, N. A., Frndova, H., Lye, S. J., Post, M., 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. *Pediatr Res* 39, 921-929.
- Han, R. N., Han, V. K., Buch, S., Freeman, B. A., Post, M., Tanswell, A. K. (1996b). Insulin-like growth factor-I and type I insulin-like growth factor receptor in 85% O₂-exposed rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 271, L139-149.
- Han, R. N., Post, M., Tanswell, A. K., Lye, S. J. (2003). Insulin-like growth factor-I receptor-mediated vasculogenesis/angiogenesis in human lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28, 159-169.
- Holzenberger, M., Leneuve, P., Hamard, G., Ducos, B., Perin, L., Binoux, M., 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.
- Huynh, H., Zheng, J., Umikawa, M., Silvany, R., Xie, X. J., Wu, C. J., Holzenberger, M., Wang, Q., Zhang, C. C. (2011). Components of the hematopoietic compartments in tumor stroma and tumor-bearing mice. *PLoS One* 6, e18054.

- Inanlou, M. R., Kablar, B. (2005a). Contractile activity of skeletal musculature involved in breathing is essential for normal lung cell differentiation, as revealed in *Myf5*^{-/-}:*MyoD*^{-/-} embryos. *Dev Dyn* 233, 772-782.
- Inanlou, M. R., and Kablar, B. (2005b). Abnormal development of the intercostal muscles and the rib cage in *Myf5*^{-/-} embryos leads to pulmonary hypoplasia. *Dev Dyn* 232, 43-54.
- Jin, Q., Esteva, F. J. (2008). Cross-talk between the ErbB/HER family and the type I insulin-like growth factor receptor signaling pathway in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13, 485-498.
- Jones, J. I., Clemmons, D. R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16, 3-34.
- Kadzik, R. S., 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. *N Eng J Med* 364, 1795-1806.
- Khandwala, H. M., Mccutcheon, I. E., Flyvbjerg, A., Friend, K. E. (2000). The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 21, 215-244.
- Kim, H. S., Nagalla, S. R., Oh, Y., Wilson, E., Roberts, C. T., Jr., 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12981-12986.
- Kim, T. H., Chow, Y. H., Gill, S. E., Schnapp, L. M. (2012a). Effect of IGF Blockade on Hyperoxia-Induced Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47(3): 372-378.
- 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) 47, 372-378. Elevated epithelial insulin-like growth factor expression is a risk factor for lung cancer development. *Cancer Res* 69, 7439-7448.
- Kim, W. Y., Prudkin, L., Feng, L., Kim, E.S., Hennessy, B., Lee, J. S., Lee, J. J., Glisson, B., Lippman, S. M., Wistuba, II, *et al.* (2012b). Epidermal growth factor receptor and K-Ras mutations and resistance of lung cancer to insulin-like growth factor 1 receptor tyrosine kinase inhibitors. *Cancer* 118, 3993-4003.
- Klempt, M., Hutchins, A. M., Gluckman, P. D., 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.
- Kloting, N., Koch, L., Wunderlich, T., Kern, M., Ruschke, K., Krone, W., Bruning, J. C., Bluher, M. (2008). Autocrine IGF-1 action in adipocytes controls systemic IGF-1 concentrations and growth. *Diabetes* 57, 2074-2082.

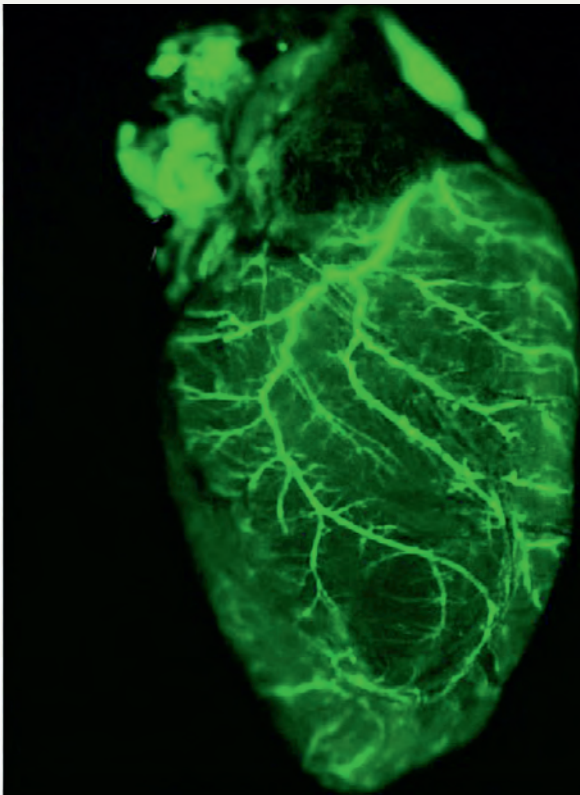
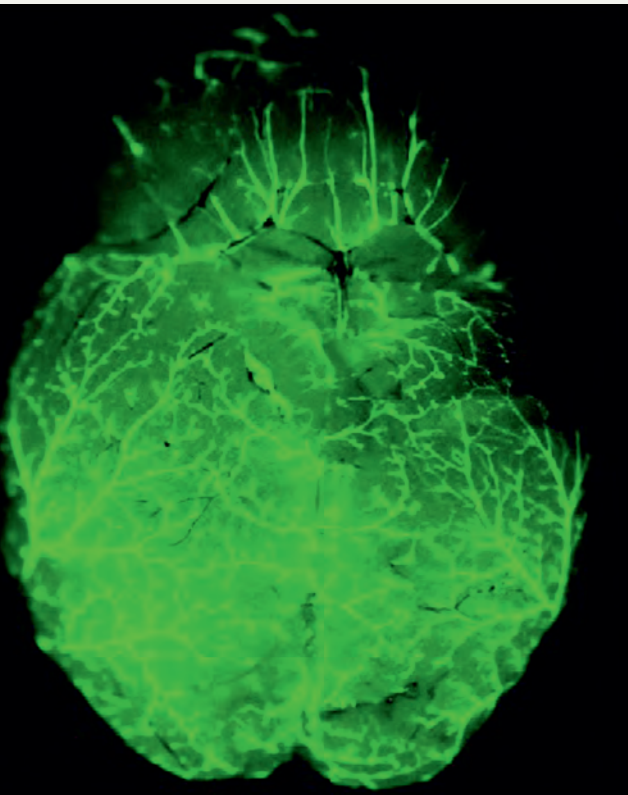
- Knight, D. A., Holgate, S. T. (2003). The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology* 8, 432-446.
- Krein, P. M., Winston, B. W. (2002). Roles for Insulin-Like Growth Factor I and Transforming Growth Factor-I in Fibrotic Lung Disease. *Chest* 122, 289S-293S.
- Krein, P. M., Sabatini, P. J., Tinmouth, W., Green, F. H., Winston, B. W. (2003). Localization of insulin-like growth factor-I in lung tissues of patients with fibroproliferative acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 83-90.
- Lee, C. T., Wu, S., Gabrilovich, D., Chen, H., Nadaf-Rahrov, S., Ciernik, I. F., Carbone, D. P. (1996). Antitumor effects of an adenovirus expressing antisense insulin-like growth factor I receptor on human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 56, 3038-3041.
- Leroith, D., Roberts, C. T., Jr. (2003). The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 195, 127-137.
- Linnerth, N. M., Siwicki, M. D., Campbell, C. I., Watson, K. L., Petrik, J. J., Whitsett, J. A., 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., 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.
- Long, L., Rubin, R., Brodt, P. (1998). Enhanced invasion and liver colonization by lung carcinoma cells overexpressing the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Exp Cell Res* 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.
- López, A. D., Mathers, C. D., Ezzati, M., Jamison, D.T., 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., Efstratiadis, A. (1997). Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev Biol* 189, 33-48.
- Massoner, P., Ladurner-Rennau, M., Eder, I. E., Klocker, H. (2010). Insulin-like growth factors and insulin control a multifunctional signalling network of significant importance in cancer. *Br J Cancer* 103, 1479-1484.
- Mitsiades, C. S., Mitsiades, N. S., McMullan, C. J., Poulaki, V., Shringarpure, R., Akiyama, M., Hideshima, T., Chauhan, D., Joseph, M., Libermann, T. A., *et al.* (2004). Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1

- tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell* 5, 221-230.
- Mok, T. S., Wu, Y. L., Thongprasert, S., Yang, C. H., Chu, D. T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., *et al.* (2009). Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 361, 947-957.
- Moorehead, R. A., Sánchez, O. H., Baldwin, R. M., 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., López-Malpartida, A. V., De Pablo, F., Pichel, J. G. (2006). Alterations in alveolar epithelium differentiation and vasculogenesis in lungs of LIF/IGF-I double deficient embryos. *Dev Dyn* 235, 2040-2050.
- Morgillo, F., Woo, J. K., Kim, E. S., Hong, W. K., Lee, H. Y. (2006). Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res* 66, 10100-10111.
- Morgillo, F., Kim, W. Y., Kim, E. S., Ciardiello, F., Hong, W. K., and Lee, H. Y. (2007). Implication of the Insulin-like Growth Factor-IR Pathway in the Resistance of Non-small Cell Lung Cancer Cells to Treatment with Gefitinib. *Clin Cancer Res* 13, 2795-2803.
- Morrissey, E. E., Hogan, B. L. (2010). Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Dev Cell* 18, 8-23.
- 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.
- Nakae, J., Kido, Y., Accili, D. (2001). Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr Rev* 22, 818-835.
- Nakanishi, Y., Mulshine, J. L., Kasprzyk, P. G., Natale, R. B., Maneckjee, R., Avis, I., Treston, A. M., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Cuttitta, F. (1988). Insulin-like growth factor-I can mediate autocrine proliferation of human small cell lung cancer cell lines in vitro. *J Clin Invest* 82, 354-359.
- Narasaraju, T. A., Chen, H., Weng, T., Bhaskaran, M., Jin, N., Chen, J., Chen, Z., Chinoy, M. R., 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. *J Cell Biochem* 97, 984-998.
- Pandini, G., Frasca, F., Mineo, R., Sciacca, L., Vigneri, R., Belfiore, A. (2002). Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem* 277, 39684-39695.

- Pavelic, J., Pavelic, L., Karadza, J., Krizanac, S., Unesic, J., Spaventi, S., Pavelic, K. (2002). Insulin-like growth factor family and combined antisense approach in therapy of lung carcinoma. *Mol Med* 8, 149-157.
- Pavelic, J., Krizanac, S., Kapitanovic, S., Pavelic, L., Samarzija, M., Pavicic, F., Spaventi, S., Jakopovic, M., Herceg-Ivanovi, Z., Pavelic, K. (2005). The consequences of insulin-like growth factors/receptors dysfunction in lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 65-71.
- Pichel, J. G., Fernández-Moreno, C., Vicario-Aabejon, C., Testillano, P.S., Patterson, P. H., 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. *Mech Dev* 120, 349-361.
- Pollak, M. (2008). Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* 8, 915-928.
- Pollak, M. (2012). The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer* 12, 159-169.
- Pollak, M. N., Schernhammer, E. S., Hankinson, S. E. (2004). Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 4, 505-518.
- Powell-Braxton, L., Hollingshead, P., Warburton, C., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Dalton, D., Gillet, N., Stewart, T. A. (1993). IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev* 7, 2609-2617.
- Retsch-Bogart, G. Z., Moats-Staats, B. M., Howard, K., D'Eercole, A. J., 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. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14, 61-69.
- Rock, J. R., Randell, S. H., Hogan, B. L. (2010). Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech* 3, 545-556.
- Rosell, R., Moran, T., Queralt, C., Porta, R., Cardenal, F., Camps, C., Majem, M., López-Vivanco, G., Isla, D., Provencio, M., *et al.* (2009). Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 361, 958-967.
- Sara, V. R., Hall, K. (1990). Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* 70, 591-614.
- Schuller, A. G., Van Neck, J. W., Beukenholdt, R. W., Zwarthoff, E. C., Drop, S. L. (1995). IGF, type I IGF receptor and IGF-binding protein mRNA expression in the developing mouse lung. *J Mol Endocrinol* 14, 349-355.
- Sharma, S. V., Lee, D. Y., Li, B., Quinlan, M. P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M. A., *et al.* (2010). A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 141, 69-80.

- Silva, D., Venihaki, M., Guo, W. H., López, M. F. (2006). Igf2 deficiency results in delayed lung development at the end of gestation. *Endocrinology* 147, 5584-5591.
- Siwicky, M. D., Petrik, J.J., Moorehead, R. A. (2011). The function of IGF-IR in NNK-mediated lung tumorigenesis. *Lung Cancer* 71, 11-18.
- Snyder, J. C., Teisanu, R. M., Stripp, B. R. (2009). Endogenous lung stem cells and contribution to disease. *J Pathol* 217, 254-264.
- Srinivasan, S., Strange, J., Awonusunu, F., Bruce, M. C. (2002). Insulin-like growth factor I receptor is downregulated after alveolarization in an apoptotic fibroblast subset. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L457-467.
- 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.
- Sullivan, J. P., Minna, J. D., Shay, J. W. (2010). Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy. *Cancer Metastasis Rev* 29, 61-72.
- Takanami, I., Imamuma, T., Hashizume, T., Kikuchi, K., Yamamoto, Y., Yamamoto, T., Kodaira, S. (1996). Expression of PDGF, IGF-II, bFGF and TGF-beta 1 in pulmonary adenocarcinoma. *Pathol Res Pract* 192, 1113-1120.
- 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. *Am J Respir Crit Care Med* 180, 701-712.
- Ulanet, D. B., Ludwig, D. L., Kahn, C. R., Hanahan, D. (2010). Insulin receptor functionally enhances multistage tumor progression and conveys intrinsic resistance to IGF-1R targeted therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10791-10798.
- Volckaert, T., Dill, E., Campbell, A., Tiozzo, C., Majka, S., Bellusci, S., De Langhe, S. P. (2011). Parabronchial smooth muscle constitutes an airway epithelial stem cell niche in the mouse lung after injury. *J Clin Invest* 121, 4409-4419.
- Walenkamp, M. J. E., Wit, J. M. (2007). Genetic disorders in the GH IGF-I axis in mouse and man. *Eur J Endocrinol* 157, S15-26.
- Wallen, L. D., Han, V. K. (1994). Spatial and temporal distribution of insulin-like growth factors I and II during development of rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 267, L531-542.
- Wang, J., Zhou, J., Powell-Braxton, L., Bondy, C. (1999). Effects of Igf1 gene deletion on postnatal growth patterns. *Endocrinology* 140, 3391-3394.

- Warburton, D., Schwarz, M., Tefft, D., Flores-Delgado, G., Anderson, K. D., Cardoso, W. V. (2000). The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech Dev* 92, 55-81.
- Warner, B. B., Stuart, L. A., Papes, R. A., Wispe, J. R. (1998). Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 275, L110-117.
- Warnken, M., Reitzenstein, U., Sommer, A., Fuhrmann, M., Mayer, P., Enzmann, H., Juergens, U. R., Racke, K. (2010). Characterization of proliferative effects of insulin, insulin analogues and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in human lung fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 382, 511-524.
- 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.
- Wynnt, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214, 199-210.
- Yamashita, N., Tashimo, H., Ishida, H., Matsuo, Y., Arai, H., Nagase, H., Adachi, T., Ohta, K. (2005). Role of insulin-like growth factor-I in allergen-induced airway inflammation and remodeling. *Cellular Immunology* 235, 85-91.
- 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. *Am J Transl Res* 1, 101-114.
- Yu, H., Mistry, J., Nicar, M. J., Khosravi, M. J., Diamandis, A., Van Doorn, J., Juul, A. (1999). Insulin-like growth factors (IGF-I, free IGF-I and IGF-II) and insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-6, and ALS) in blood circulation. *J Clin Lab Anal* 13, 166-172.
- Yu, H., Rohan, T. (2000). Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 92, 1472-1489.



ZUBÍA

24



Gobierno de La Rioja
www.larioja.org



**Instituto
de Estudios
Riojanos**