



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA

**ESTUDIO DE LA TRANSFORMACIÓN FIBROBLASTO-
MIOFIBROBLASTO, LA SENESCENCIA Y EL
METABOLISMO DE FIBROBLASTOS AISLADOS DE
PACIENTES CON FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA.
PAPEL DE LA NICOTINAMIDA N-METIL TRANSFERASA
(NNMT).**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÓGIA

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

LOURDES CHULIÁ PERIS

DIRIGIDA POR:

DR. JAVIER PEREDA CERVERA

DR. JULIÁN CARRETERO ASUNCIÓN

ENERO 2021

D. Javier Pereda Cervera, Profesor Titular del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València,

D. Julián Carretero Asunción, Profesor Titular del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València,

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada “ESTUDIO DE LA TRANSFORMACIÓN FIBROBLASTO-MIOFIBROBLASTO, LA SENESCENCIA Y EL METABOLISMO DE FIBROBLASTOS AISLADOS DE PACIENTES CON FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA. PAPEL DE LA NICOTINAMIDA N-METIL TRANSFERASA (NNMT). ”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. Lourdes Chuliá Peris, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 15 de enero del 2021.



Fdo. Javier Pereda Cervera



Fdo. Julián Carretero Asunción

A LA MEUA FAMÍLIA

AGRADECIMIENTOS

Esta tesi és el resultat de molts anys de treball, per això volia agrair a totes les persones que, durant tot este temps, han fet possible que es portara a terme, ja siga de manera directa com indirecta. Moltes gràcies a tots!

Vuic agrair este treball als meus directors de tesi els doctors Javier Pereda i Julián Carretero:

A Javi per introduir-me en el món de la ciència. Sense dubte has sigut el meu guia i pare científic durant tots aquestos anys, ja que he pogut trobar amb tu un recolzament constant. Infinites gràcies per tot el que m'has ensenyat científicament, docentment i personalment. Eres un exemple per a mi. Per creure en mi des del primer dia i confiar per a que portara endavant el teu projecte i cuidara dels "nostres" fibroblastes.

A Julián por inculcarme ese amor a la ciencia y el deseo de crecer cada día personal y científicamente. Cada año que ha pasado me has demostrado tu calidad como persona, tu espíritu de trabajo y tu entusiasmo. Gracias.

Infinites gràcies a les meues companyes i amigues incondicionals del laboratori. Eva, Alicia i Cris vos agraisc de tot cor el que m'heu ajudat per a que esta tesi eixira endavant. Per escoltar-me sempre, per pipetejar juntes i per recolzar-me, especialment en estos últims mesos que han sigut complicats en molts sentits.

Inés, muchas gracias por enseñarme tantas cosas del laboratorio y de la vida, por ser mi mentora. Recuerdo con mucho cariño la paciencia y dulzura con que me guiabas cuando llegué al lab y bueno, siempre. Te echamos de menos. Maria, la teua alegria i "salero" ha sigut llum en dies d'obscuritat, moltes gràcies. Chabeli, germaneta, gràcies per la complicitat i per entendrem sempre.

Són molts els amics i amigues que he trobat al laboratori: Toni (te trobem a faltar), Iván ya la tenemos!, Sergio, Miguel, Isabella y Pablo. Gracias por el día a día científico y por todos esos viajes y risas. Muchas gracias por todos los que somos y por todos los que hemos sido.

Muchas gracias a Ángel, Salva Mena, Salva Pérez y Miguel Asensi, por ayudarme en todo lo que he necesitado y por vuestros sabios consejos. Gràcies Xelo per escoltar-me i cuidar-me sempre, mami.

Muchas gracias a todo el Departamento de Fisiología, en especial el de la Facultad de Farmacia. Me siento muy afortunada por formar parte de él, con la ayuda de todos vosotros han sido unos años muy agradables de trabajo. Muchos momentos se quedan atrás y los recordaré con cariño.

Moltes gràcies a Mari i Rosario per la seua paciència i predisposició a ajudar-me en tot el procés. Teniu el cèl guanyat!

Muchísimas gracias al grupo de Phan en Ann Arbor, fue increíble lo que aprendí y crecí en todos los sentidos durante mi estancia con vosotros.

Al servicio de cultivos del SCSIE por estar siempre dispuesto a ayudarme. A la unidad de Cirugía Torácica del hospital de La Ribera, en especial a Jose M. Galbis, Arantxa Lafuente y Antonio Cremades, sin vosotros no hubiera sido posible. A la unidad analítica de biomarcadores y medicina de precisión del IIS LA Fe por hacer esta tesis un poquito metabólica.

Gracias al servicio de Patología del Hospital Quirón por acogerme en su laboratorio: Javier y Sandra. Especial mención a Javier Alcácer por sumergirme en el maravilloso mundo de la histología con tanto cariño y dedicación.

Moltes gràcies a TOTS i TOTES els meus amics i amigues per creure en mi i per animar-me a complir sempre tots els meus objectius. Senc no haver-vos pogut dedicar tot el temps que voldria, però estic segura que el recuperarem celebrant junts la vida.

Infinites gràcies a la música i al món que l'envolta. Per ser la meua passió i acollir-me en les seues melodies cada dia.

Gràcies de tot cor a Carlos, "bebito", moltes gràcies per comprendre'm, ajudar-me, per estimar-me com ho fas i per convertir-te en un pilar fonamental de la meua vida. També gràcies a la teua família per acollir-me amb tanta estima.

I, per últim, mil milions de gràcies a la meua família, a tots, sense dubte. Tete, gràcies per ser el millor germà que podria tindre i per animar-me sempre a seguir endavant. Un beset Laura i moltíssimes gràcies per la portada.

Mamà i papà, tot el que soc vos ho dec a vosaltres. Gràcies per tant, per fer de mi el que soc, per recolzar-me en tot el que me propose i per guiar-me i ajudar-me sempre que ho he necessitat. Per inculcar-me els vostres valors i l'entusiasme amb el treball i la vida, per estimar-me d'esta manera. Junts hem demostrat que podem amb tot. La tesi és tan meua com vostra.

Per tots vosaltres, moltes gràcies!

ABSTRACT/RESUMEN

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is defined as a fatal and progressive chronic fibrosing interstitial pneumonia of unknown cause, associated with the histopathological pattern of interstitial usual pneumonia (IUP). The lack of effective treatments and its late diagnosis raise the requirement to find new fibrotic biomarkers and therapeutic targets. The pathogenesis of the disease involves loss of alveolar epithelial cells, proliferation and transformation of fibroblasts to myofibroblasts (FMT), and the accumulation of extracellular matrix. This microenvironment favors senescence, the acquisition of mesenchymal and myofibroblast phenotype, as well as changes in cell metabolism. Myofibroblast phenotype, the effector of the fibrotic process, plays a key role due to its role in apoptotic resistance, migration, contraction, and synthesis of extracellular matrix proteins. Previous reports identify the metabolic enzyme NNMT as a driver of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in tumor epithelial cells, a process that shares common molecular features with the FMT. Thus, our hypothesis was that NNMT could play a key function in fibrotic processes associated with FMT and clinical development of IPF. Our objective was to study the role of NNMT in FMT, senescence and metabolism of fibroblasts isolated from IPF patients (N = 15) compared to control fibroblasts from pneumothorax patients (N = 30). Cellular and molecular markers of FMT, EMT and senescence were analyzed and modulated by TGF- β 1 (pro-fibrotic) and IL-1 β (anti-fibrotic and proinflammatory). Next, NNMT was repressed or overexpressed by lentiviral gene transduction. NNMT and fibrotic markers were also evaluated in clinical histological samples. The results showed that IPF fibroblasts overexpress fibrotic and senescence markers compared to control fibroblasts. Induction with TGF- β 1 increased the expression of fibrotic (α -SMA, FN1, COL1A1, COL1A2) and mesenchymal (CDH2 and SNAI1) markers, in all types of fibroblasts. However, IL-1 β decreased them only in IPF fibroblasts. The gene expression, protein levels and enzymatic activity of NNMT was increased in IPF fibroblasts compared to controls. Overexpression and repression of NNMT was observed when fibroblasts were incubated with TGF- β 1 and IL-1 β respectively. Lentiviral inhibition of NNMT in IPF fibroblasts caused a metabolic change and a decrease in the expression of fibrotic, mesenchymal and senescence (p16, p21 and β -galactosidase activity) markers but increased their migration. Lentiviral overexpression of NNMT produced the opposite effects. Immunofluorescence studies showed co-expression of NNMT with α -SMA. Finally, immunohistochemical results revealed us that NNMT is expressed in reactive fibrosis areas vs. healthy tissue. In conclusion, NNMT plays an important role in the fibrotic, senescence and metabolic processes associated with fibrotic fibroblasts and IPF and point out this enzyme as a promising fibrotic marker that could constitute a therapeutic target for this pathology.

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) está definida como una neumonía intersticial fibrosante crónica de causa desconocida, progresiva y fatal asociada con el patrón histopatológico de neumonía intersticial usual (NIU). La ausencia de manifestaciones específicas de la FPI continúa siendo un obstáculo para su detección temprana. La ausencia de tratamientos efectivos y diagnóstico tardío suscitan la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores fibróticos y dianas terapéuticas. La patogenia de la enfermedad conlleva una pérdida de células epiteliales alveolares, una proliferación de fibroblastos y su transformación a miofibroblastos (FMT) y la acumulación de matriz extracelular. Este microambiente fibrótico favorece la senescencia celular, la adquisición de fenotipo mesenquimal y/o asociado al miofibroblasto, así como cambios en el metabolismo celular. El fenotipo miofibroblasto, considerado efector del proceso fibrótico, juega un papel de enorme importancia debido a su capacidad de proliferación, migración, contracción y síntesis de matriz extracelular. Resultados previos de nuestro grupo identifican la enzima metabólica NNMT como directora de la Transformación Epitelio-Mesenquimal (EMT) de células epiteliales tumorales, un proceso que comparte características moleculares comunes con la FMT. Con estos antecedentes, nuestra hipótesis fue que la NNMT podría jugar un papel de relevancia en los procesos fibróticos asociados a la FMT y el desarrollo clínico de la FPI. Nuestro objetivo ha sido estudiar la implicación de la NNMT en la FMT, la senescencia y el metabolismo de poblaciones de fibroblastos aislados de pacientes con FPI (N=15) respecto a los fibroblastos control (N=30). Marcadores celulares y moleculares de FMT, EMT y senescencia fueron analizados y modulados con TGF- β 1 (profibrótico) e IL-1 β (antifibrótico y proinflamatorio). A continuación, mediante técnicas de transducción génica se inhibió y se sobreexpresó la NNMT. Se analizó la presencia de NNMT y otros marcadores fibróticos en muestras histológicas de pacientes. Los resultados nos muestran que los fibroblastos de FPI presentan una sobreexpresión de marcadores fibróticos (α -SMA, COL1A1 y COL1A2) así como de marcadores de senescencia (p16, p21 y actividad β -galactosidasa) respecto a los fibroblastos control. La inducción con TGF- β 1 produjo un aumento en la expresión de parámetros fibróticos (α -SMA, FN1, COL1A1 y COL1A2) y marcadores mesenquimales (CDH2 y SNAI1), en todos los tipos de fibroblastos. En cambio, la IL-1 β provocó una disminución de estos solo en los fibroblastos de FPI. La expresión génica, los niveles proteicos y la actividad enzimática de NNMT se incrementó en los fibroblastos de FPI comparado con los controles. La sobreexpresión y represión de NNMT se observó cuando los fibroblastos se incubaron con TGF- β 1 e IL-1 β respectivamente. La inhibición lentiviral de NNMT en los fibroblastos fibróticos causó un cambio metabólico y una disminución en la expresión de marcadores fibróticos, mesenquimales y de senescencia, pero incrementó su migración. La sobreexpresión lentiviral produjo el efecto contrario. Estudios de inmunofluorescencia mostraron coexpresión de NNMT con α -SMA. Finalmente, resultados de inmunohistoquímica mostraron que NNMT está expresada en áreas de fibrosis reactiva vs. tejido sano. En conclusión, NNMT juega un papel de importancia en los procesos fibróticos de senescencia y metabólicos en fibroblastos fibróticos y de FPI, lo que convierte a esta enzima en un prometedor marcador de fibrosis que podría constituir una diana terapéutica para esta patología

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ABREVIATURAS	XIII
I- INTRODUCCIÓN	1
1. FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA	3
1.1. INCIDENCIA Y PREVALENCIA.....	3
1.2. ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO POTENCIALES.....	4
1.3. HISTORIA NATURAL.....	5
1.4. CUADRO CLÍNICO.....	6
1.5. COMPLICACIONES Y COMORBILIDAD	7
1.6. DIAGNÓSTICO	8
1.7. SEGUIMIENTO DE LA EVOLUCIÓN	13
1.8. TRATAMIENTO	14
1.8.1. Oxigenoterapia	14
1.8.2. Rehabilitación respiratoria.....	15
1.8.3. Tratamiento farmacológico	15
1.8.4. Trasplante pulmonar.....	16
1.8.5. Terapia celular y terapia génica.....	17
2. PATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA	18
2.1. FACTORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS.....	19
2.2. BALANCE DE FACTORES SOLUBLES Y DE SECRECIÓN	21
2.2.1. El Factor Transformante Beta 1 (TGF- β 1)	21
2.2.2. La Interleuquina 1 beta (IL-1 β).....	23
2.3. ROL DE LAS CÉLULAS EPITELIALES ALVEOLARES	24
2.3.1. Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT)	25
2.4. ROL DE LOS MIOFIBROBLASTOS.....	28
2.4.1. Origen de los miofibroblastos	30
2.4.2. Proceso de reparación de una herida	32
2.4.3. Regulación de la matriz extracelular en la FPI	35
2.5. SENESCENCIA Y FPI.....	38

2.5.1. <i>La senescencia celular</i>	38
2.5.2. <i>El fenotipo de secreción asociado a la senescencia</i>	40
2.5.3. <i>Vías de señalización que regulan la senescencia celular</i>	42
2.6. IMPLICACIONES EN LA TERAPIA: SENOLÍTICOS.....	44
3. EL METABOLISMO PULMONAR EN LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA	45
3.1. ADAPTACIONES METABÓLICAS DE LOS FIBROBLASTOS PULMONARES ACTIVADOS (MIOFIBROBLASTOS)	45
4. LA NICOTINAMIDA N-METILTRANSFERASA	49
4.1. EXPRESIÓN DE NNMT Y SU REGULACIÓN	50
4.2. PRINCIPALES RUTAS METABÓLICAS ASOCIADAS A NNMT	51
II- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
III- MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. POBLACIÓN	59
2. CULTIVOS CELULARES	60
2.1. AISLAMIENTO DE FIBROBLASTOS PRIMARIOS DE PULMÓN HUMANO	60
2.2. CONTAJE Y CONGELACIÓN CELULAR.....	61
2.3. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO	62
3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOT	63
3.1. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.	64
3.2. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA	64
3.3. INMUNODETECCIÓN.....	66
4. INMUNOFLUORESCENCIA	68
5. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TGF-β1	69
6. AISLAMIENTO DE RNA Y RT-QPCR	70
6.1. EXTRACCIÓN DE RNA.....	70
6.2. RETROTRANSCRIPCIÓN.....	70
6.3. DISEÑO, PREPARACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LOS <i>PRIMERS</i>	71
6.4. PCR CUANTITATIVA	73
7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NNMT	74

8. KIT DE DETECCIÓN HISTOQUÍMICA DE CÉLULAS SENESCENTES	77
9. MEDIDA DE LA CAPACIDAD DE CIERRE DE UNA HERIDA REALIZADA <i>IN VITRO</i> POR CULTIVOS DE FIBROBLASTOS O MIOFIBROBLASTOS. <i>SCRATCH ASSAY</i>	78
10. ESTUDIOS DE TRANSDUCCIÓN GÉNICA CON CONSTRUCCIONES LENTIVIRALES ..	79
10.1. PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES	79
10.1.1. <i>Protocolo de clonaje con el sistema Gateway</i>	81
10.2. TRANSDUCCIÓN VIRAL O INFECCIÓN DE LAS CÉLULAS DIANA.....	82
11. HISTOLOGÍA: TINCCIONES E INMUNOHISTOQUÍMICA.....	83
11.1. TINCIÓN DE EOSINA/ HEMATOXILINA	83
11.2. TINCIÓN DEL TRICRÓMICO DE MASSON	83
11.3. INMUNOHISTOQUÍMICA (TINCIÓN CON DAB).....	85
12. ANÁLISIS METABOLÓMICOS	85
12.1. PROCESADO DE LA MUESTRA.....	86
12.2. ANÁLISIS MEDIANTE UPLC-MS/MS.....	88
12.3. PROCESADO DE LOS DATOS	90
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y ELABORACIÓN DE FIGURAS	90
IV- RESULTADOS	91
1. CARACTERIZACIÓN BASAL DE LAS POBLACIONES DE FIBROBLASTOS Y MIOFIBROBLASTOS EMPLEADAS COMO MODELOS EXPERIMENTALES.....	93
1.1. EVOLUCIÓN DE LA SENESCENCIA DE LOS FIBROBLASTOS CON EL NÚMERO DE PASES.....	98
1.2. LOS FIBROBLASTOS FIBRÓTICOS PRESENTAN UN FENOTIPO SENESCENTE ELEVADO RESPECTO A LOS FIBROBLASTOS CONTROL	100
2. EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN DE LAS POBLACIONES DE FIBROBLASTOS POR EL TGF-β1 Y LA IL-1β COMO MODULADORES DE LA FMT	103
3. LA NNMT ESTÁ INCREMENTADA EN LOS FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON FPI RESPECTO A FIBROBLASTOS DE PACIENTES CONTROL.....	111
4. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NNMT MEDIANTE TGF-β1 Y DISMINUCIÓN DE NNMT MEDIANTE IL-1β.....	115
5. PAPEL DE LA NNMT EN LOS FIBROBLASTOS ASOCIADOS A FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA	119
5.1. ESTUDIO DEL SILENCIAMIENTO DE LA NNMT EN LOS FIBROBLASTOS ASOCIADOS A LA FPI	119

5.1.1. <i>El silenciamiento de NNMT en fibroblastos FPI produce una disminución de los marcadores fibróticos y de EMT</i>	122
5.1.2. <i>El silenciamiento de NNMT en fibroblastos FPI produce una disminución de los marcadores de senescencia</i>	126
5.1.3. <i>Cierre del área de corte a 24h y 48h por poblaciones de fibroblastos shNT y shNNMT</i>	128
5.1.4. <i>Efecto Del TGF-β1 como inductor de la fibrosis y la IL-1β en fibroblastos con la NNMT silenciada</i>	130
5.2. ESTUDIO DE LA SOBREENPRESIÓN DE LA NNMT EN LOS FIBROBLASTOS ASOCIADOS A LA FPI	132
5.2.1. <i>La sobreexpresión de NNMT en fibroblastos FPI produce un aumento de los marcadores fibróticos y de EMT</i>	135
5.3. LA SOBREENPRESIÓN DE NNMT EN FIBROBLASTOS FPI PRODUCE UN AUMENTO DE LOS MARCADORES DE SENESCENCIA	139
5.3.1. <i>Cierre del área de corte a 24h y 48h por poblaciones de fibroblastos Flag y NNMT</i>	140
5.3.2. <i>Efecto Del TGF-β1 como inductor de la fibrosis y la IL-1β en fibroblastos con la NNMT sobreexpresada</i>	143
6. LA ACTIVIDAD NNMT Y LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO CELULAR EN LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA	145
7. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS EN MUESTRAS DE PACIENTES CON FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA	148
V- DISCUSIÓN	153
1. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE FIBROBLASTOS Y MIOFIBROBLASTOS EN CULTIVOS PRIMARIOS CONTROL Y DE FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA	155
2. LOS FIBROBLASTOS DE FPI PRESENTAN UN FENOTIPO SENESCENTE INCREMENTADO RESPECTO A LOS FIBROBLASTOS CONTROL	160
3. EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN DE LAS POBLACIONES DE FIBROBLASTOS POR EL TGF-β1 Y LA IL-1β COMO MODULADORES DE LA FMT Y LA EMT	162
4. LOS FIBROBLASTOS PROCEDENTES DE PACIENTES CON FPI PRESENTAN UNA EXPRESIÓN INCREMENTADA DE NNMT RESPECTO A LOS FIBROBLASTOS CONTROL	166
5. LA MODULACIÓN DE LA NNMT ESTÁ IMPLICADA EN LA REGULACIÓN DE LA FMT Y EMT DEL PROCESO FIBRÓTICO ASOCIADO A LA FPI	171

6. IMPACTO DE LA MODULACIÓN DE NNMT EN FIBROBLASTOS FIBRÓTICOS EN LA CAPACIDAD DE CIERRE DE UNA HERIDA.....	174
7. LA NNMT Y LA SENESCENCIA CELULAR	176
8. ADAPTACIONES METABÓLICAS EN LOS FIBROBLASTOS DE FPI ANTES Y DESPUÉS DE LA MODULACIÓN DE NNMT	178
9. LA NNMT EN EL ESCENARIO CLÍNICO.....	180
VI- CONCLUSIONES	183
VII- BIBLIOGRAFÍA	189

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Historia natural de la FPI.....	6
Figura 2: Algoritmo diagnóstico de la FPI.	9
Figura 3: Imágenes de TCAR de tórax que muestran el patrón NIU	11
Figura 4: Imágenes de TCAR obtenidas con una separación de 20 meses	11
Figura 5: Obtención de una muestra de tejido pulmonar fibrótico mediante una biopsia pulmonar quirúrgica videotoracoscopia.	12
Figura 6: Panalización típica de NIU	13
Figura 7: Daño alveolar en la Fibrosis Pulmonar Idiopática.	18
Figura 8: Mecanismos de transducción de señal inducidos por TGF- β 1	22
Figura 9: Modelo de patogénesis propuesto de Fibrosis Pulmonar Idiopática.....	28
Figura 10: Posibles orígenes descritos del fenotipo miofibroblasto	31
Figura 11: Modelo de la activación de EMT provocada por daño repetitivo que precisa de reparación fisiológica o fibrótica	33
Figura 12: Vías de señalización de factores de crecimiento comunes y esenciales para la EMT y procesos de cicatrización de herida	34
Figura 13: Imagen representativa de la matriz extracelular en el contexto de la FPI	36
Figura 14: Señas de identidad del fenotipo senescente.....	39
Figura 15: Mecanismos de senescencia celular.	41
Figura 16: Vías de señalización que regulan la senescencia celular	43
Figura 17: Visión general de las principales rutas metabólicas en fibroblastos activados y en reposo.....	47
Figura 18: Principales rutas metabólicas en las que está implicada NNMT.....	52
Figura 19: Inmunofluorescencia de marcadores FMT y epiteliales en fibroblastos fibróticos.	62
Figura 20: Esquema del Procedimiento de realización del <i>Western Blot</i>	63
Figura 21: Esquema de la reacción enzimática catalizada por NNMT empleada para la determinación de su actividad.	75
Figura 22: Esquema del plásmido de expresión pEXP304 NNMT/V5.....	82

Figura 23: Representación de la “cascada ómica” junto con la estimación de los componentes de cada nivel.....	86
Figura 24: Expresión proteica de α -SMA en cultivos de fibroblastos control y de FPI	94
Figura 25: Inmunofluorescencia representativa de la expresión de α -SMA en cultivos control y de FPI	95
Figura 26: Expresión relativa de diferentes genes implicados en el proceso fibrótico: <i>ACTA2</i> , <i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i> y <i>FN1</i> , en cultivos control y procedentes de FPI	96
Figura 27: Niveles de TGF- β 1 extracelular	97
Figura 28: Expresión relativa de <i>p21</i> , <i>p16</i> , <i>ACTA2</i> y <i>COL1A1</i> en fibroblastos control y fibróticos a diferentes pases.....	99
Figura 29: Imágenes representativas de la detección cualitativa de la actividad de la β -galactosidasa por tinción con X-gal de fibroblastos control y fibróticos a pase 4 y pase 12.....	100
Figura 30: Expresión relativa de mRNA de <i>p16</i> y <i>p21</i> en fibroblastos controles y fibróticos	101
Figura 31: Imágenes representativas de la detección cualitativa de la actividad de la β -galactosidasa por tinción con X-gal de fibroblastos control y fibróticos.	102
Figura 32: Inducción de la EMT y la FMT en fibroblastos control y fibróticos tratados con TGF- β 1. <i>Western Blot</i>	104
Figura 33: Inmunofluorescencia representativa de la expresión de α -SMA en cultivos control y con FPI tras ser incubados en presencia y ausencia de TGF- β 1.....	106
Figura 34: Inducción de la EMT y la FMT en fibroblastos control y fibróticos tratados con TGF- β 1. RT-PCR	107
Figura 35: Tratamiento de los fibroblastos control en presencia o ausencia de la citoquina proinflamatoria IL-1 β	109
Figura 36: Tratamiento de los fibroblastos procedentes de pacientes con FPI con la citoquina proinflamatoria IL-1 β	110
Figura 37: Medida de la actividad NNMT en fibroblastos control y fibróticos	112
Figura 38: Expresión de NNMT en las poblaciones de fibroblastos control y fibróticos.....	113

Figura 39: Inmunofluorescencia representativa de la expresión de NNMT en cultivos control y con FPI	114
Figura 40: Expresión de la NNMT en fibroblastos control y fibróticos cultivados en presencia o ausencia de TGF- β 1 o IL-1 β	115
Figura 41: Inmunofluorescencia representativa de la expresión de α -SMA y NNMT en fibroblastos control tras ser incubados en presencia y ausencia de TGF- β 1 o IL-1 β	117
Figura 42: Inmunofluorescencia representativa de la expresión de α -SMA y NNMT en fibroblastos fibróticos tras ser incubados en presencia y ausencia de TGF- β 1 o IL-1 β	118
Figura 43: Silenciamiento de NNMT en fibroblastos FPI mediante la infección lentiviral de partículas shRNA medido por <i>Western Blot</i>	120
Figura 44: Silenciamiento de NNMT en fibroblastos FPI mediante la infección lentiviral de partículas shRNA medido por RT-PCR e inmunofluorescencia..	121
Figura 45: Medida de la actividad NNMT en fibroblastos shNT y shNNMT	122
Figura 46: Disminución de los marcadores fibróticos y EMT en fibroblastos FPI con la NNMT silenciada. <i>Western Blot</i>	123
Figura 47: Disminución del gen <i>ACTA2</i> en fibroblastos shNNMT respecto a los shNT. RT-PCR.....	124
Figura 48: Inmunofluorescencia representativa de la expresión de α -SMA y NNMT en fibroblastos shNT y shNNM	125
Figura 49: Expresión relativa de mRNA de <i>p16</i> y <i>p21</i> en fibroblastos shNT y shNNMT	126
Figura 50: Imágenes representativas de la detección cualitativa de la actividad de la β -galactosidasa por tinción con X-gal de fibroblastos shNT y shNNMT	127
Figura 51: Área cerrada por fibroblastos shNT y shNNMT en presencia o ausencia de Mitomicina C a 24 horas.....	128
Figura 52: Área cerrada por fibroblastos shNT y shNNMT en presencia o ausencia de Mitomicina C a 24 y 48 horas	129
Figura 53: Expresión de diferentes marcadores fibróticos, mesenquimales y NNMT en fibroblastos shNT y shNNMT cultivados en presencia o ausencia de TGF- β 1 o IL-1 β	131

Figura 54: Sobreexpresión de NNMT en fibroblastos FPI mediante la infección lentiviral de partículas pExpRNA. <i>Western Blot</i>	133
Figura 55: Sobreexpresión de NNMT en fibroblastos FPI mediante la infección lentiviral de partículas pExpRNA. PCR e inmunofluorescencia.	134
Figura 56: Medida de la actividad NNMT en fibroblastos Flag y NNMT	135
Figura 57: Incremento de los marcadores fibróticos y EMT en fibroblastos FPI con la NNMT sobreexpresada. <i>Western Blot</i>	136
Figura 58: Aumento del gen <i>ACTA2</i> en fibroblastos NNMT. RT-PCR	137
Figura 59: Inmunofluorescencia representativa de la expresión de α -SMA y NNMT en fibroblastos Flag y NNMT	138
Figura 60: Expresión relativa de mRNA de <i>p16</i> y <i>p21</i> en fibroblastos Flag y NNMT	139
Figura 61: Imágenes representativas de la detección cualitativa de la actividad de la β -galactosidasa por tinción con X-gal de fibroblastos Flag y NNMT	140
Figura 62: Área cerrada por fibroblastos Flag y NNMT en presencia o ausencia de Mitomicina C a 24 y 48 horas	141
Figura 63: Área cerrada por fibroblastos Flag y NNMT en presencia o ausencia de Mitomicina C a 24 y 48 horas	142
Figura 64: Expresión de diferentes marcadores fibróticos, mesenquimales y NNMT en fibroblastos Flag y NNMT cultivados en presencia o ausencia de TGF- β 1 o IL-1 β	144
Figura 65: Adaptaciones metabólicas en fibroblastos de FPI y control	146
Figura 66: Adaptaciones metabólicas entre fibroblastos shNT y shNNMT	147
Figura 67: Análisis inmunohistoquímico de Hematoxilina/ eosina, Tricrómico de Masson y tinciones de α -SMA y NNMT en cortes pulmonares procedentes de pacientes con FPI y control	149
Figura 68: Análisis inmunohistoquímico de hematoxilina/ eosina, tricrómico de Masson y tinciones de α -SMA y NNMT en cortes pulmonares de pacientes con FPI.....	151

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Factores que se han asociado con la etiología de la fibrosis pulmonar	4
Tabla 2:	Presentación clínica de la FPI	7
Tabla 3:	Gestión Farmacológica de la FPI	16
Tabla 4:	Senolíticos en estudio para el tratamiento de la FPI	44
Tabla 5:	Dianas metabólicas para inhibir la activación de miofibroblastos	48
Tabla 6:	Características de los pacientes empleados para la obtención de las poblaciones de fibroblastos utilizadas en nuestro estudio.....	60
Tabla 7:	Composición geles electroforesis SDS-PAGE.....	65
Tabla 8:	Listado de los diferentes anticuerpos primarios y secundarios empleados en el <i>Western Blot</i>	67
Tabla 9:	Listado de los diferentes anticuerpos primarios y secundarios empleados en inmunofluorescencia.....	69
Tabla 10:	Volúmenes de los reactivos empleados en la retrotranscripción	71
Tabla 11:	Listado de los diferentes genes empleados con su pareja de primers diseñados y optimizados.....	73
Tabla 12:	Volúmenes de los reactivos de la solución de trabajo empleada en la PCR cuantitativa	74
Tabla 13:	Reactivos empleados para la formación de partículas lentivirales	80
Tabla 14:	Características de la secuencia pLKO.1 de silenciamiento de NNMT.....	80
Tabla 15:	Lista de patrones internos para la detección de metabolitos del ciclo de la metionina y relacionados.....	88
Tabla 16:	Transiciones, voltajes del cono y energías de colisión para la determinación de los patrones.	89
Tabla 17:	Clasificación de los focos fibróticos según sus características inmunohistoquímicas	150

ABREVIATURAS

1-MNA	1-metilnicotinamida
1-MQ	1-metilquinolina
5-MTA	5-metil tioadenosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEC	Células epiteliales alveolares
AF	Ácido fórmico
AKT	Proteína quinasa B
ALAT	<i>Latin American Thoracic Society</i>
ANG II	Angiotensina II
AP-1	Proteína activadora 1
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenina trifosfato
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	Albúmina bovina sérica
CCL2	Quimiocina C-C <i>motif 2</i>
CDH1	E-cadherina
CDH2	N-cadherina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CK2	Caseín quinasa 2
COL1A1	Colágeno tipo I, alfa 1
COL1A2	Colágeno tipo II, alfa 2
COL3A1	Colágeno tipo III, alfa 1
COL4A2	Colágeno tipo IV, alfa 2
COL5A2	Colágeno tipo V, alfa 2
COX2	Ciclooxigenasa 2
CST	<i>Cell Signaling Technology</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i> - Número de ciclos en la RT-PCR
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo
CVF	Capacidad vital forzada
CXCL1	Quimiocina C-X-C <i>motif</i> ligando 1
CXCR2	Quimiocina C-X-C <i>motif</i> receptor 2
DAB	3,3' diaminobenzidina
DKC1	Gen del complejo proteico de la telomerasa
DLCO	Difusión del monóxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>

ABREVIATURAS

ECM	Matriz extracelular
EDTA	Etilendiaminotetracético
EGF	Factor de crecimiento epitelial
EGTA	Ácido aminopolicarboxílico
EMT	Transición epitelio mesenquimal
EPI	Enfermedad pulmonar intersticial
EPID	Enfermedad pulmonar intersticial difusa
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
ET-1	Endotelina-1
ETC	Cadena de transporte de electrones
FADH ₂	Flavín adenina dinucleótido
FAP	Proteína activadora de fibroblastos
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FMT	Transformación fibroblasto-miofibroblasto
FN1	Fibronectina
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
FSP1	Proteína 1 específica de fibroblastos
FTs	Factores de transcripción
G6PD	Glucosa-6- fosfato deshidrogenasa
GLS	Glutaminasa
GLUT1	Transportador de glucosa 1
GSH	Glutación reducido
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasas	Guanosina trifosfatasa
HFBA	Ácido heptafluoroutírico
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HIF1 α	Factor inducible por hipoxia α
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IFN- γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulinas G
IL-13	Interlequina 13
IL-1 β	Interlequina 1 beta
IL-4	Interlequina 4
JAK	Quinasa Janus-activada
JRS	<i>Japanese Respiratory Society</i>
kDA	Kilodalton
LBA	Lavado broncoalveolar
LDH	Lactato deshidrogenasa
LTV	Lentivirus
MAPK	Quinasa activada por mitógenos
miRNA	MicroRNA

MMP	Metaloproteinasa
MNAM	Metilnicotinamida
mTOR	Diana de la rapamicina en mamíferos
MUCB5	Mucina 5B
NAD ⁺	Dinucleótido de adenina y nicotinamida
NADH	Forma reducida del dinucleótido de adenina y nicotinamida
NADP	Fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida
NADPH	Forma reducida del fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida
NAF1	Ribonucleoproteína factor de ensamblaje nuclear 1
NAM	Nicotinamida
NAMN	Ácido nicotínico mononucleótido
NEM	N-etilendiamina
NF- κ B	Factor nuclear κ B
NIU	Neumonía intersticial usual
NLRP3	Imflammasoma de la familia NLR
NMN	Nicotinamida mononucleótido
NNMT	Nicotinamida N-metiltransferasa
Nox4	Gen codificante de la NADPH oxidasa 4
NR	Nicotinamida ribósido
NRF2	Factor nuclear 2 derivado del eritroide 2
OBFC1	Gen que codifica el sitio de unión 1 oligonucleótido/ oligosacárido
PAI-1	Inhibidor-1 activador de plasminógeno
PARN	Poli(A)-ribonucleasas
PARPs	Poli-ADP-ribosiltransferasas
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Proteína C reactiva
PDFG	Factor de crecimiento plaquetario
PFA	Paraformaldehido
PFK	Fosfofructosaquinasa-1
PFKFB3	6-Fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa
PGC-1a	Coactivador del receptor g activado por proliferador de peroxisoma
PGE ₂	Prostaglandina E2
PHGDH	Fosfatasa
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinasa
PSAT1	Fosfoserina deshidrogenasa
PSPH	Fosfoserina
PTEN	Fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato 3-fosfatasa
RGE	Reflujo gastroesofágico
RLU	Unidades relativas de luminiscencia

ABREVIATURAS

ROS	Especies reactivas de oxígeno
RTEL	Helicasa reguladora de la longitud del telómero
RT-PCR	Transcripción reversa- Reacción en cadena de la polimerasa
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SASP	Fenotipo de secreción asociado a la senescencia
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato sódico
SFTPC	Gen que codifica la proteína C tensioactiva
SHMT	Serina hidroximetiltransferasa
SIRT1	Sirtuína 1
SIRT6	Sirtuína 6
TBS	Solución salina tamponada
TC	Tomografía computarizada
TCAR	Tomografía axial computarizada de alta resolución
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TERC	Componente de ARN de telomerasa
TERT	Telomerasa transcriptasa inversa
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta 1
TIMPs	Inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz
TINF2	El factor nuclear 2 que interactúa con TERF1
TNF	Factor de necrosis tumoral
TOLLIP	Proteína de interacción de peaje
TTF-1	Factor tiroideo de transcripción 1
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de ultra resolución- Espectrómetro de masas en tándem
v/v	Volumen/volumen
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VSG	Velocidad de sedimentación globular
α -SMA	Alfa- actina del músculo liso

I. INTRODUCCIÓN

1. FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) está definida como una neumonía intersticial fibrosante crónica de causa desconocida, progresiva y que afecta fundamentalmente a adultos mayores de 60 años, limitada a los pulmones y asociada con el patrón histopatológico de neumonía intersticial usual (NIU) (J. King *et al.* 2000; Travis *et al.* 2002; Visscher y Myers 2006). La definición de FPI requiere de la exclusión de otras formas de neumonía intersticial incluyendo las neumonías intersticiales y otras enfermedades intersticiales pulmonares (EPI) asociadas con la exposición a agentes medio ambientales, medicación o enfermedad sistémica (J. King *et al.* 2000; Travis *et al.* 2002).

1.1. INCIDENCIA Y PREVALENCIA

La FPI es la enfermedad pulmonar intersticial difusa más frecuente y la más común de las formas progresivas de fibrosis pulmonar. La incidencia y prevalencia real de la FPI no son completamente conocidas. Los estudios epidemiológicos realizados muestran cifras muy variables en función del criterio utilizado para definir la enfermedad, la población de estudio, la metodología y el diseño del trabajo. No obstante, es conocido que la incidencia de la FPI se incrementa con la edad y se inicia con episodios de disneas en las décadas sexta y séptima (Ganesh Raghu *et al.* 2006; 2014). Raramente los pacientes con FPI pueden presentar una exacerbación aguda como manifestación inicial (Collard *et al.* 2016). A su vez, la incidencia es mayor en hombres que en mujeres y la mayor parte de los pacientes tienen una historia previa como fumadores (Behr *et al.* 2015). Se estima que la incidencia es de 4,6-7,4 casos/100000 y la prevalencia de 13 casos/100000 en mujeres y de 20 casos/100000 en hombres. En España, el número de pacientes con FPI varía probablemente entre 8000 y 12000 (Xaubet *et al.* 2013; Ganesh Raghu *et al.* 2006). Se desconoce si la incidencia y la prevalencia están influidas por factores étnicos, raciales o geográficos. En los últimos años se ha notificado una mayor incidencia debido probablemente a la optimización de los métodos diagnósticos y al aumento en la esperanza de vida (Xaubet, Ancochea y Molina-Molina 2017).

Actualmente, la infección viral SARS-CoV-2 (COVID-19) presenta una última fase de desarrollo en el que puede consolidarse fibrosis pulmonar con el

depósito de colágeno y la proliferación celular de los espacios intersticiales (Tian *et al.* 2020). La aparición de fibrosis se ha correlacionado con la gravedad y la duración de la enfermedad, así como con la necesidad de ventilación asistida y tiempo en la unidad de cuidados intensivos (UCI) y comorbilidades como hipertensión, diabetes, afecciones cardíacas y exposición al tabaco, entre otras. Aunque todavía se desconoce, algunos estudios sugieren que un tercio de los pacientes presentan características radiológicas de la fibrosis a los 3 y 6 meses desde el desarrollo de la sintomatología (Spagnolo *et al.* 2020; Guan *et al.* 2020).

1.2. ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO POTENCIALES

Aunque la FPI es por definición una enfermedad de causa desconocida, es probable que sea consecuencia de la acción de diversos factores en sujetos con predisposición genética (Tabla 1).

Tabla 1: Factores que se han asociado con la etiología de la fibrosis pulmonar.

FACTORES DE RIESGO POTENCIALES DE LA FPI
PREDISPOSICIÓN GENÉTICA
TABAQUISMO
EXPOSICIÓN A PLOMO, LATÓN Y ACERO
EXPOSICIÓN A POLVO DE MADERA
EXPOSICIÓN A DIFERENTES CONTAMINANTES AMBIENTALES
ACTIVIDADES LABORALES EN GANADERÍA Y AGRICULTURA
CONSTRUCCIÓN DE CASAS DE MADERA
INFECCIONES VÍRICAS
REFLUJO GASTROESOFÁGICO
AUTOINMUNIDAD
ENVEJECIMIENTO

La relevancia de la predisposición genética está fundamentada en la existencia de formas familiares de la enfermedad. Entre el 2,2 y el 3,7% de las FPI son familiares. Debe destacarse que miembros de una misma familia pueden estar afectados por varios tipos de enfermedad pulmonar intersticial. Las alteraciones genéticas con más relevancia en la predisposición y evolución de la enfermedad son las mutaciones de los genes que mantienen la longitud de los telómeros y que se encuentran en el complejo telomerasa, como el gen de la telomerasa transcriptasa inversa (TERT), el gen del componente de ARN

de la telomerasa (TERC), el gen del complejo proteico de la telomerasa (DKC), o el gen de la helicasa reguladora de la longitud del telómero (RTEL), de la proteína C del surfactante y de la región promotora de la mucina 5B (MUC5B) (Alder *et al.* 2008; McDonough *et al.* 2018; Van Batenburg *et al.* 2020; Muñoz-Espín y Serrano 2014; Seibold *et al.* 2011).

El tabaquismo, la exposición al sílice, latón, acero y polvo de madera, las actividades laborales en ganadería y en agricultura, la exposición a diferentes contaminantes ambientales y la construcción de casas de madera son considerados factores de riesgo (véase Tabla 1) (Taskar y Coultas 2006). El reflujo gastroesofágico (RGE) tiene probablemente un rol en la patogenia de la FPI y en su historia natural ya que predispone a aspiraciones o microaspiraciones del contenido gastroesofágico que podrían constituir factores desencadenantes del daño del epitelio alveolar que caracteriza a la FPI (Ganesh Raghu 2011; G. Raghu y Meyer 2012). Aunque se han realizado varios estudios, no existe suficiente evidencia para considerar que las infecciones víricas (virus Epstein-Bars, virus de la hepatitis C, herpes virus, adenovirus) sean factores etiológicos (Xaubet *et al.* 2013; Jafarian *et al.* 2020). La posible contribución de la autoinmunidad se basa en que el patrón histológico y radiológico de la neumonía intersticial usual puede asociarse a enfermedades del tejido conectivo, sobre todo la artritis reumatoide (Fischer y Du Bois 2012; E. J. Kim *et al.* 2010). También se ha sugerido que la FPI es consecuencia del envejecimiento incrementado de las células del pulmón o de algunos mecanismos patogénicos asociados con el envejecimiento (López-Otín *et al.* 2013; Torres-González *et al.* 2012).

1.3. HISTORIA NATURAL

Desde el momento del diagnóstico, la evolución de la FPI es variable e impredecible, como se observa en la Figura 1. La enfermedad puede permanecer asintomática durante los 2-3 primeros años y en ocasiones es estable durante largos períodos de tiempo. En algunos casos, los síntomas pueden preceder al diagnóstico durante 6-24 meses. La evolución más común es la progresión lenta, aunque existen formas aceleradas que conducen a insuficiencia respiratoria en 6-12 meses. En el transcurso de la enfermedad pueden presentarse exacerbaciones agudas que empeoran el pronóstico. La supervivencia media clásicamente descrita es de 2-5 años desde el inicio de

los síntomas, aunque gracias a la reciente introducción de fármacos antifibróticos, el tiempo libre de progresión de la enfermedad se está alargando. Se desconoce si las diferentes formas de la historia natural representan fenotipos diferentes de la enfermedad (Xaubet, Ancochea y Molina-Molina 2017).

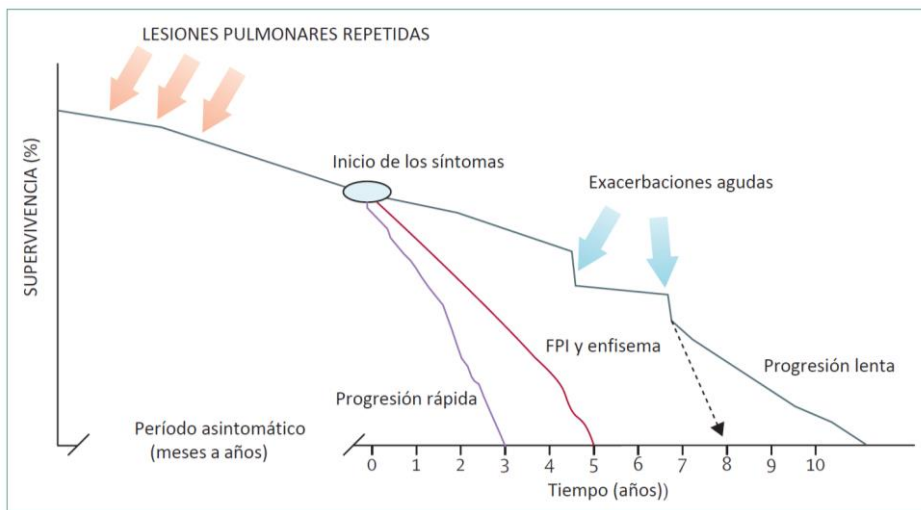


Figura 1: Historia natural de la FPI. La enfermedad tiene un largo (de meses a años) periodo asintomático. La mayoría de los pacientes siguen una evolución clínica y funcional lenta (progresión lenta) después del diagnóstico. El 10% de estos pacientes presentan episodios de exacerbaciones agudas que pueden provocar el inicio de la fase terminal de la enfermedad. Pocos pacientes muestran una progresión rápida de la enfermedad (adaptado de (T. E. King, Pardo y Selman 2011)).

1.4. CUADRO CLÍNICO

El cuadro clínico es de inicio insidioso y se caracteriza por disnea de esfuerzo progresiva, tos seca persistente, crepitación inspiratoria bibasilar y / o acropaquía digital. La presencia de síntomas sistémicos debe hacer sospechar un diagnóstico alternativo. El inicio de la sintomatología es lento y la aparición de los primeros síntomas y el diagnóstico son variables (entre los 6 meses y 2 años), por lo que se desconoce el momento exacto del inicio de la patología (Dong, Collard y King 2006).

En las fases avanzadas es habitual la insuficiencia respiratoria crónica. La exploración física muestra estertores crepitantes en el 90% de los casos y acropaquía en el 50%. No existen alteraciones específicas en los análisis

sanguíneos. La velocidad de sedimentación globular (VSG), la proteína C reactiva (PCR) y las inmunoglobulinas G (IgG) pueden estar discretamente elevadas. Los anticuerpos antinucleares y el factor reumatoide son positivos en el 10-20% de los casos, aunque a títulos bajos.

La exploración funcional respiratoria muestra una alteración ventilatoria restrictiva con disminución de los volúmenes pulmonares y de la capacidad de difusión para el monóxido de carbono (DLCO). La prueba de la marcha de los 6 minutos es una sencilla prueba de esfuerzo que se utiliza para valorar la tolerancia al ejercicio. La hipoxemia está presente en las fases avanzadas de la enfermedad y la hipercapnia en las fases finales.

Tabla 2: Presentación clínica de la FPI. DLCO: Difusión Pulmonar para el CO en una sola inspiración; CVF: Capacidad Vital Forzada

PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA (FPI)
HISTORIA: <ul style="list-style-type: none"> - DISNEA DE ESFUERZO CRÓNICA - AUMENTO DE LA PURULENCIA DEL ESPUTO - FATIGA
EXAMEN FÍSICO: <ul style="list-style-type: none"> - CREPITACIÓN INSPIRATORIA BIBASILAR - ACROPAQUÍA - ACROCIANOSIS
HALLAZGOS FISIOPATOLÓGICOS: <ul style="list-style-type: none"> - DESCENSO DE DLCO - HIPOXEMIA EN REPOSO O ESFUERZO - DESATURACIÓN NORMAL O DESCENSO DE LA CVF

1.5. COMPLICACIONES Y COMORBILIDAD

Los pacientes con FPI pueden desarrollar complicaciones que modifican el curso de la enfermedad y provocan un empeoramiento de su pronóstico. Normalmente se trata de complicaciones asociadas con la edad y aumentan la disfuncionalidad respiratoria. Entre las complicaciones y comorbilidades más habituales en los pacientes con FPI cabe destacar:

- Enfisema pulmonar
- Hipertensión pulmonar
- Exacerbaciones agudas
- Síndrome de apneas e hipopneas durante el sueño

- Reflujo gastroesofágico
- Cáncer de pulmón
- Hipercoagulabilidad sanguínea
- Neumotórax
- Vasculitis de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos positivas

Las exacerbaciones agudas se producen con un deterioro rápido de la enfermedad en ausencia de ninguna causa identificable, llegando a una mortalidad del 60-70% en 3-6 meses. En algunas formas genéticas, hay también una enfermedad extrapulmonar que se manifiesta a nivel de la médula ósea y enfermedad hepática.

1.6. DIAGNÓSTICO

La ausencia de manifestaciones específicas de la enfermedad dificulta su diagnóstico, por lo que existe un interés creciente en encontrar biomarcadores para la caracterización de la enfermedad, ya que no se dispone de ninguna prueba específica diagnóstica (Ley *et al.* 2012; Drakopanagiotakis *et al.* 2018). A su vez, actualmente se están desarrollando escalas multidimensionales que contienen datos clínicos y pruebas funcionales para mejorar el protocolo diagnóstico e intentar predecir el riesgo individual de mortalidad (Ley *et al.* 2012).

En la actualidad, el diagnóstico definitivo de la FPI requiere, en primer lugar, de la exclusión de otras patologías pulmonares intersticiales difusas de causa conocida. También es necesaria la presencia de un patrón histológico característico de neumonía intersticial usual observado en imagen radiológica obtenida por tomografía axial computarizada de alta resolución (TCAR) y/o en tejido pulmonar obtenido mediante biopsia quirúrgica pulmonar.

Dado la complejidad de toma de decisiones dentro del algoritmo a seguir para el diagnóstico de la FPI (Figura 2), un comité de expertos multidisciplinar se encarga de evaluar las pruebas funcionales, radiológicas e histológicas para establecer un diagnóstico en consenso interdisciplinario y así aumentar la precisión diagnóstica (Ganesh Raghu *et al.* 2018). La presencia de abundantes focos fibroblásticos está asociada a un peor pronóstico y se correlaciona con un incremento de la mortalidad en FPI (Nicholson *et al.* 2002).

Además, la reproducibilidad de un diagnóstico de FPI establecida por discusión multidisciplinaria es muy positivo y mejora el pronóstico (Walsh *et al.* 2016).

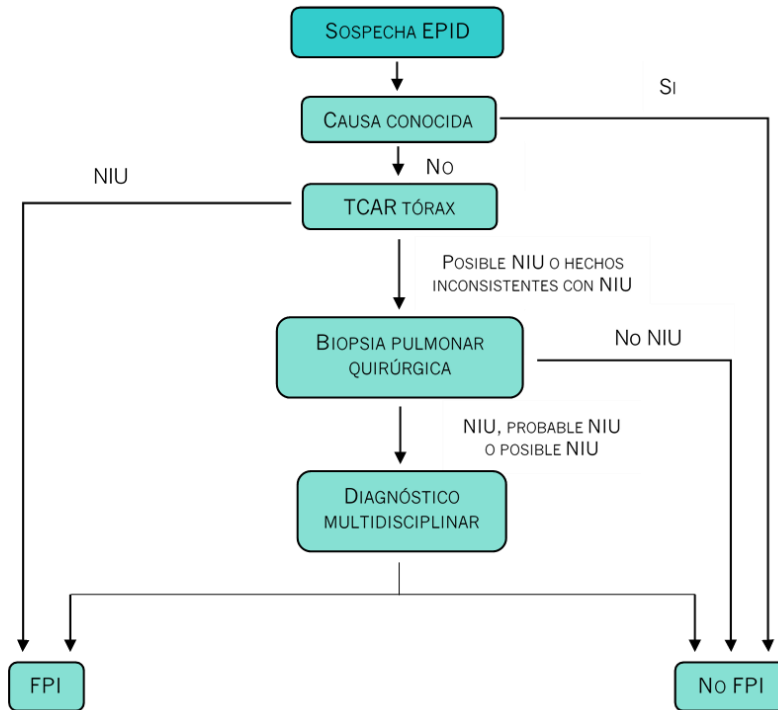


Figura 2: Algoritmo diagnóstico de la FPI. La complejidad en el diagnóstico de la FPI hace necesaria la participación de un equipo multidisciplinario que se encargue de evaluar las pruebas funcionales, radiológicas e histoquímicas (adaptado de (Ganesh Raghu *et al.* 2018)).

Las diferentes pruebas diagnósticas empleadas para la detección y determinación de la FPI actualmente son las siguientes:

- **Anamnesis**

En el historial clínico del paciente se debe recoger el uso de medicamentos y exposiciones ambientales en el hogar, el trabajo y otros lugares a los que el paciente acuda con asiduidad para excluir posibles causas de enfermedad pulmonar difusa.

- **Lavado broncoalveolar (LBA)**

El lavado broncoalveolar consiste en la introducción y posterior aspiración de solución salina en los espacios alveolares. El LBA en FPI muestra

una neutrofilia discreta con o sin eosinofilia y ha sido empleado de manera clásica para descartar otras patologías pulmonares. Actualmente, su utilidad está muy cuestionada (Ganesh Raghu *et al.* 2018).

- **Biopsia transbronquial:**

Esta biopsia resulta útil en enfermedades que presenten hechos diagnósticos característicos y que tienen una distribución difusa. El reducido tamaño de la muestra obtenido no permite observar la distribución de la lesión correctamente, de forma que su utilidad es limitada. La variedad de biopsia transbronquial con criosonda o criobiopsia es una técnica muy prometedora pero se requieren más estudios para corroborar su utilidad en la detección de las EPIs (Babiak *et al.* 2009; Casoni *et al.* 2014).

- **Tomografía computarizada de alta resolución (TCAR)**

La TCAR es la técnica indiscutible en el diagnóstico de la FPI ya que su valor predictivo positivo en el diagnóstico de la NIU es del 90 al 100% (Johkoh *et al.* 1999; Hunninghake *et al.* 2001; Nishimura *et al.* 1993). El objetivo es identificar características típicas del patrón de NIU y distinguirlos de patrones menos específicos presentes en otras neumonías intersticiales idiopáticas. El consenso oficial ATS/ERS/JRS/ALAT del año 2018 estableció que, en el TCAR, el diagnóstico de NIU se basa en la identificación de las siguientes características típicas:

- Afectación pulmonar predominantemente basal y de localización subpleural.
- Presencia de panalización subpleural constituida por espacios aéreos quísticos de diámetro típicamente consistente (3-10 mm, pero ocasionalmente más grandes) con paredes gruesas y bien definidas.
- Presencia de alteraciones reticulares evidentes que contienen bronquiectasias de tracción (Hansell *et al.* 2008).
- Demostrar que hay ausencia de características excluyentes de un patrón NIU y que, por tanto, sugieran un diagnóstico alternativo. La presencia de opacificación de vidrio esmerilado (radiopacidad del pulmón) debe ser mínima o inexistente.

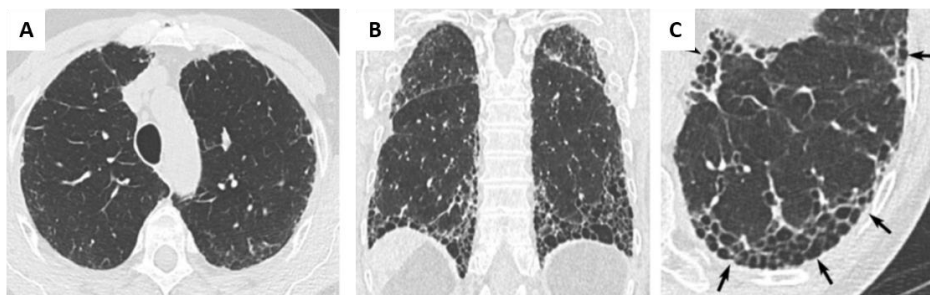


Figura 3: Imágenes de TCAR de tórax que muestran el patrón NIU. (A) Sección de TC transversal y (B) reconstrucción coronal que ilustra la presencia de panal de abeja con predominio subpleural y basal. (C) Vista ampliada del lóbulo inferior izquierdo que muestra las características típicas del panal de abejas, que consta de espacios aéreos quísticos agrupados, con paredes bien definidas y diámetros variables (adaptación de (Ganesh Raghu *et al.* 2018)).

La panalización es un criterio imprescindible para el diagnóstico de NIU con certeza y debe estar presente para un diagnóstico definitivo de NIU por TCAR. Puede ser observado con o sin bronquiectasia o bronquiolectasia de tracción periférica.

Se han establecido cuatro categorías diagnósticas según los hallazgos detectados en las pruebas diagnósticas: patrón NIU, probable patrón NIU, patrón NIU indeterminado y diagnóstico alternativo.

Al mismo tiempo, el TCAR permite valorar la presencia de comorbilidades asociadas como el enfisema, la hipertensión pulmonar o el cáncer de pulmón, que pueden condicionar la evolución de la enfermedad. Cuando no haya panalización visible, se deberá realizar el diagnóstico definitivo con la ayuda de biopsia pulmonar quirúrgica. Además, la biopsia pulmonar podrá evitarse únicamente en aquellos casos en los que el TCAR muestre un patrón claro de NIU.

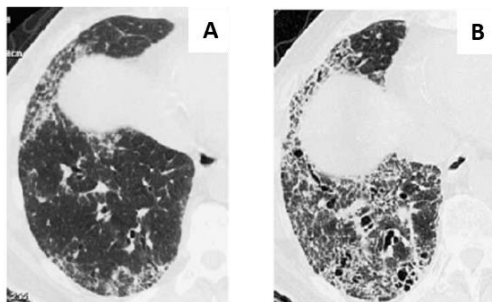


Figura 4. Imágenes de TCAR obtenidas con una separación de 20 meses. Se observa con claridad la progresión de la panalización en la FPI.

- **Biopsia pulmonar: patrón histopatológico**

En caso de que el TCAR no sea concluyente, el diagnóstico definitivo se deberá realizar mediante biopsia pulmonar quirúrgica, idealmente de más de un lóbulo pulmonar, a causa de la distribución irregular de la patología.

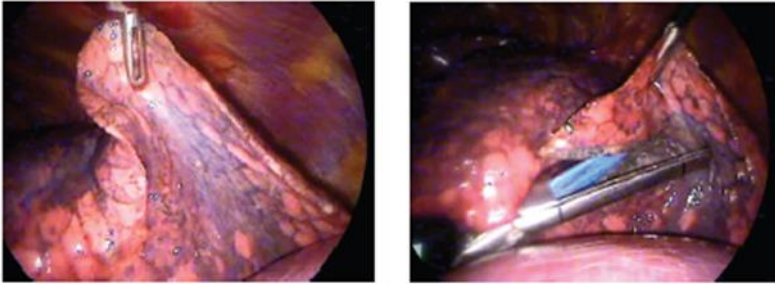


Figura 5: Obtención de una muestra de tejido pulmonar fibrótico mediante una biopsia pulmonar quirúrgica videotoracoscopia. Al mismo tiempo que se extrae la muestra, se corta y se sella el parénquima pulmonar utilizando una endograpadora mecánica (Gabasa. 2014).

El patrón histológico de NIU está definido necesariamente por cuatro criterios:

1. Evidencia de fibrosis marcada o distorsión de la arquitectura pulmonar, con más o menos panalización con distribución principalmente subpleural o paraseptal. Las zonas con panalización están compuestas por espacios aéreos de fibrosis quística que frecuentemente están recubiertos por epitelio bronquiolar y llenos de mucosa y células inflamatorias.
2. Presencia de lesiones en zonas diferentes, donde se combinan zonas fibróticas con áreas de pulmón sano (J. King *et al.* 2000; Travis *et al.* 2002).
3. Las zonas fibróticas están constituidas principalmente por colágeno denso y por focos fibróticos dispersos con proliferación de fibroblastos y miofibroblastos como hecho destacable. Es común observar metaplasia del músculo liso en zonas fibróticas y de panalización.
4. Ausencia de características inconsistentes con el patrón NIU que sugieran un diagnóstico alternativo (membranas hialinas, foco con neumonía organizativa, granulomas, infiltrado

inflamatorio intersticial marcado alejado de las zonas de panalización, etc.).

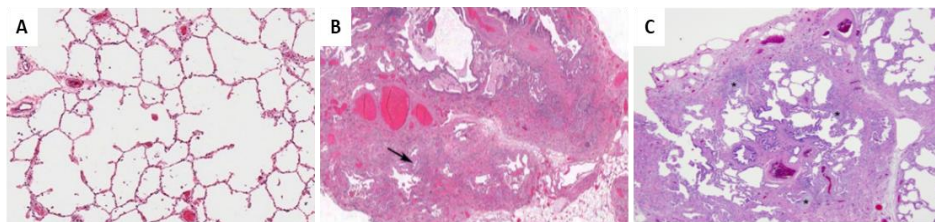


Figura 6: Panalización típica de NIU. La panalización es la característica de los espacios aéreos císticos subpleurales con paredes con pocillos bien definidos y es característico del patrón de neumonía intersticial usual (NIU). (A) Histología normal de pulmón de un bronquiolo terminal, bronquiolo respiratorio, conducto alveolar y alvéolo. X100. (B) Tinción de eosina-hematoxilina obtenida de una biopsia quirúrgica en un paciente con NIU, revelando el patrón de micro-panalización (flecha). (C) Tinción de hematoxilina-eosina obtenida de la misma biopsia pulmonar que el panel b, para la confirmación del foco fibroblástico, el cual son agregados de fibroblastos y miofibroblastos presentes en las áreas de FPI. (adaptado de (Ganesh Raghu *et al.* 2018)).

Las características clínicas de la FPI y otras patologías respiratorias como la neumonitis por hipersensibilidad crónica pueden ser indistinguibles. Por ello, es necesario descartar factores ambientales ocultos que causan fibrosis pulmonar en pacientes con sospecha de FPI durante la evaluación diagnóstica. Un ejemplo de ello sería la neumonitis provocada por las plumas de edredones y colchones (Morell *et al.* 2013).

1.7. SEGUIMIENTO DE LA EVOLUCIÓN

En el seguimiento de la evolución, el estado del paciente determinará las exploraciones a realizar. Generalmente se aconseja practicar las siguientes observaciones cada 3-6 meses:

- Pruebas funcionales respiratorias: Capacidad Vital Forzada (CVF) y Capacidad de Difusión del Dióxido de Carbono (DLCO).
- Valoración del grado de disnea.
- Pulsioximetría en reposo.
- Radiografía de tórax.
- Prueba de la marcha de los 6 minutos.

No obstante, dichas exploraciones deberán practicarse en períodos de tiempo más cortos si existen signos y síntomas evidentes de progresión de la enfermedad. La gasometría arterial y la TCAR se aconseja realizarse en caso de progresión de la enfermedad y sospecha de complicaciones (Xaubet, Ancochea y Molina-Molina 2017).

1.8. TRATAMIENTO

La guía de la ATS de práctica clínica de la FPI de 2015 muestra avances significativos en cuanto al abordaje clínico de la patología respecto a la guía de 2011. Los clínicos deben realizar un tratamiento personalizado a los pacientes, como sugieren las recomendaciones condicionales y deben ser muy exigentes a la hora de comparar el beneficio neto de cada una de las intervenciones. Actualmente, existen avances importantes en el tratamiento de la FPI. Sin embargo, es urgente el desarrollo de nuevos tratamientos que presenten más eficacia en la reversibilidad de la patología o en el retraso de su progresión. Según la gravedad y evolución de la enfermedad existen diferentes tratamientos adecuados a cada fase de progresión, entre los que cabe destacar:

- Oxigenoterapia
- Rehabilitación respiratoria
- Tratamiento farmacológico
- Trasplante pulmonar
- Terapia génica y celular

1.8.1. OXIGENOTERAPIA

Las guías de práctica clínica recomiendan encarecidamente oxígeno suplementario para pacientes con FPI (Ganesh Raghu *et al.* 2011). La administración de oxígeno reduce la disnea de esfuerzo y mejora la tolerancia al ejercicio (Dowman *et al.* 2017). Una saturación de oxihemoglobina del 88% o menos en reposo, durante el esfuerzo o durante el sueño, debe impulsar el inicio de la oxigenoterapia domiciliaria. La prescripción de oxígeno debe informarse con la prueba de la marcha de 6 minutos, la prueba de saturación de oxígeno en cinta rodante (oximetría de ejercicio), así como oximetría nocturna o polisomnografía cuando se indique (Lederer y Martinez 2018).

1.8.2. REHABILITACIÓN RESPIRATORIA

La *American Thoracic Society* (ATS) y la *European Respiratory Society* (ERS) han definido la rehabilitación respiratoria como una intervención integral basada en una minuciosa evaluación del paciente, seguida de terapias diseñadas a medida. Estas terapias incluyen el entrenamiento muscular, la educación y los cambios en los hábitos de vida, con el fin de mejorar la condición física y psicológica de las personas con enfermedad respiratoria crónica y promover la adherencia a conductas para mejorar la salud a largo plazo (Holland y Hill 2008). Estudios recientes muestran que los efectos más duraderos se observan en la enfermedad leve-moderada. Es recomendable incluir a los pacientes con FPI en un programa de rehabilitación respiratoria antes de que la enfermedad alcance estadios evolucionados (Vainshelboim *et al.* 2016).

1.8.3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

Durante los últimos años, los esfuerzos están dirigidos a entender mejor los mecanismos involucrados en la patogénesis de la FPI, ya que este conocimiento es indispensable para diseñar ensayos clínicos exitosos. Las principales dificultades que se presentan en el momento de encontrar tratamientos efectivos, son la heterogeneidad de la enfermedad, la variabilidad individual entre los pacientes y el largo período de tiempo que hay entre el inicio de la patología y su diagnóstico.

Sin embargo, recientemente se han llevado a cabo notables avances en el abordaje farmacoterapéutico de la FPI. Dos medicamentos, nintedanib y pirferidona, han demostrado cierta eficacia en el tratamiento de la FPI, por lo que ambos son recomendados para el tratamiento de estos pacientes (véase Tabla 3 (Ganesh Raghu *et al.* 2015).

Tabla 3: Gestión Farmacológica de la FPI (Lederer y Martinez 2018).

VARIABLE	NINTEDANIB	PIRFERIDONA
MECANISMO DE ACCIÓN	INHIBIDOR DE LA TIROSINA QUINASA	INHIBIDOR DE LA PRODUCCIÓN DE TGF- β 1, LA SÍNTESIS DE COLÁGENO Y LA PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS
EFICACIA	RALENTIZA LA DISMINUCIÓN DE LA CVF UN 50%	RALENTIZA LA DISMINUCIÓN DE CVF UN 50%
DOSIS APROBADA POR LA FDA	150 MG DOS VECES AL DÍA DURANTE 1 MES	801 MG TRES VECES AL DÍA DURANTE UN MES
EFFECTOS SECUNDARIOS COMUNES	DIARREA	ANOREXIA, NÁUSEAS, FOTOSENSIBILIDAD
PRECAUCIONES	RIESGO DE HEMORRAGIA Y TROMBOSIS ARTERIAL; RIESGO DE PERFORACIÓN GASTROINTESTINAL; EVITAR EL HÁBITO TABÁQUICO Y LOS TRATAMIENTOS CON ANTICOAGULANTES Y PROTROMBÓTICOS	LA FLUCOXAMINA Y EL CIPROFLOXACINO PUEDEN AUMENTAR LOS NIVELES DE PIRFERIDONA; EL OMEPRAZOL PUEDE DISMINUIR LOS NIVELES DE PIRFERIDONA
NECESIDAD DE MOTORIZAR LA FUNCIÓN HEPÁTICA	Sí	Sí
ESTRATEGIAS CLÍNICAS PARA MINIMIZAR LOS EFECTOS SECUNDARIOS	USO DE AGENTES ANTIDIARREICOS.	LA MEDICACIÓN DEBE TOMARSE DESPUÉS DE LAS COMIDAS, SE RECOMIENDO EL USO DE MEDICAMENTOS ANTIÁCIDOS Y ANTIEMÉTICOS, ASÍ COMO EVITAR LA EXPOSICIÓN AL SOL

El nintedanib es un inhibidor de la tirosina quinasa que tiene como diana las vías de los factores de crecimiento, incluida la desregulación de los factores de crecimiento endotelial 1, 2 y 3, los factores de crecimiento fibroblástico 1, 2 y 3, y el factor de crecimiento plaquetario.

La pirferidona tiene una gran cantidad de efectos antiinflamatorios y antifibróticos, incluida la inhibición de la síntesis de colágeno, la desregulación del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) y el factor alfa de necrosis tumoral, y una reducción de la proliferación de fibroblastos (Martin Kolb, Bonella y Wollin 2017).

1.8.4. TRASPLANTE PULMONAR

El trasplante pulmonar constituye el único tratamiento en estadios avanzados de la enfermedad y ocasiona una importante mejoría funcional e incrementa la supervivencia. La supervivencia al año es del 81%, a los 3 años es del 64% y a los 5 años, del 51%. Además, es similar si el trasplante es

unilateral o bilateral (Kistler *et al.* 2014). Desde el punto de vista práctico, deben remitirse a un centro de trasplantes los pacientes con enfermedad avanzada, con deterioro progresivo de la función pulmonar y que no responden al tratamiento farmacológico. Sin embargo, la edad avanzada de los pacientes y el escaso número de pulmones complican la posibilidad del trasplante pulmonar y su pronóstico.

1.8.5. TERAPIA CELULAR Y TERAPIA GÉNICA

Tanto la terapia celular como la terapia génica en la FPI están en fase de estudio experimental, por lo que todavía se deberá investigar en profundidad para conocer su efectividad como tratamiento alternativo o asociado a los tratamientos farmacológicos. La FPI se caracteriza por la muerte de las células del epitelio alveolar que son reemplazadas por fibroblastos. Por tanto, las aproximaciones terapéuticas basadas en terapias celulares van encaminadas hacia la reposición de las células alveolares encargadas de regenerar el epitelio alveolar (Serrano-Mollar *et al.* 2016). En este contexto, se ha demostrado que la implantación de células alveolares tipo II mediante trasplante intratraqueal fueron capaces de reducir la fibrosis (Serrano-Mollar 2018). En los últimos años, la implantación de las células madre, con la capacidad de proliferar y diferenciarse a células alveolares, se ha planteado como una estrategia terapéutica tras observar resultados satisfactorios en modelos animales preclínicos y estudios clínicos traslacionales (Guillamat-Prats *et al.* 2020).

2. PATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

Como se ha comentado a lo largo de la descripción clínica de la FPI, muchos son los posibles factores de riesgo implicados en la patogénesis de la enfermedad, incluyendo factores ambientales, el hábito tabáquico, las infecciones crónicas virales y ciertas comorbilidades. Los pulmones están constantemente expuestos a grandes peligros por el necesario íntimo contacto con el exterior que precisan. Evolutivamente, muestran una gran habilidad para defenderse, repararse y regenerarse gracias a una cascada finamente sincronizada de procesos biológicos. Sin embargo, un daño alveolar repetitivo, en un individuo susceptible genéticamente, podría conducir a una reprogramación epigenética profibrótica estocástica, la senescencia de las células epiteliales prematura y persistente, una producción excesiva de mediadores profibróticos y la activación de las células mesenquimales, que desembocan en el desarrollo eventual de FPI.

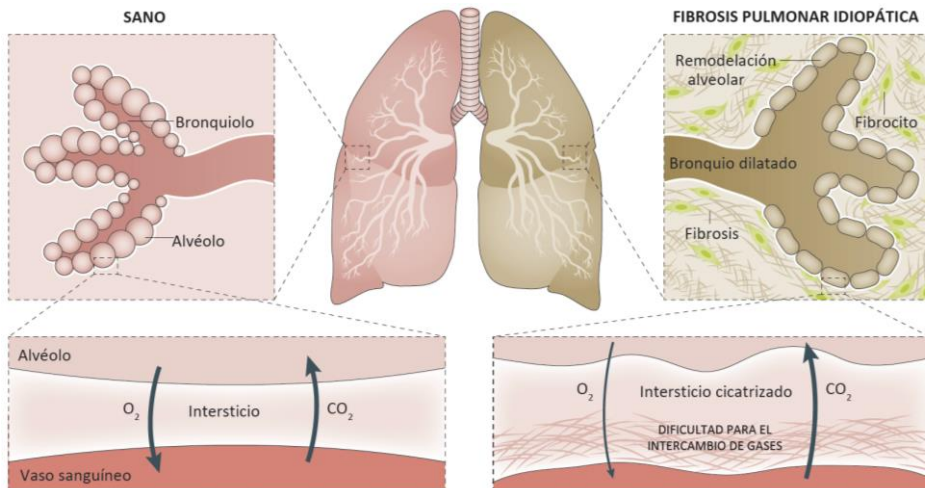


Figura 7: Daño alveolar en la Fibrosis Pulmonar Idiopática. La fibrosis pulmonar idiopática produce bronquiectasia de tracción (dilatación del bronquio), remodelación alveolar y fibrosis del parénquima, lo cual imposibilita el intercambio de gases en los alvéolos pulmonares (Modificado de (Martinez *et al.* 2017)).

La presencia y evolución del proceso fibrótico asociado a la FPI produciría una remodelación alveolar y bronquial que implicaría una pérdida de la estructura fisiológica pulmonar y el desarrollo de un intersticio cicatrizado

(Figura 7). Estos cambios fisiopatológicos producirían, a su vez, una dificultad para el intercambio de gases que comprometería la difusión normal de los mismos y, en fases avanzadas, la viabilidad del paciente.

En efecto, la FPI es un complejo desorden resultado de las interacciones entre estos factores de riesgo, teniendo en cuenta que la diferente contribución de ellos difiere en cada individuo (Selman, López-Otín y Pardo 2016). La complejidad de la FPI también está determinada por las innumerables y variables interacciones que se producen entre las células epiteliales, las células mesenquimales y la matriz extracelular. A pesar de que los mecanismos exactos de cómo estos factores intervienen para desarrollar la enfermedad son todavía inciertos; los procesos más importantes que determinan la patogenia de la FPI son:

- Factores genéticos y epigenéticos
- Desequilibrio de factores solubles, factores de secreción y mediadores inflamatorios
- Células epiteliales y Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT)
- Activación de los fibroblastos y transformación a miofibroblasto (FMT)
- Regulación de la matriz extracelular
- Procesos de senescencia
- Metabolismo pulmonar y procesos de adaptación metabólica

2.1. FACTORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS

De todos los factores de riesgo, los genéticos son los más convincentes (Ley y Collard 2013). Se estima que las variaciones genéticas explican un tercio del riesgo individual inherente a la enfermedad (Mathai *et al.* 2016). Los estudios sobre la arquitectura genética de la FPI y la implicación del epitelio pulmonar en el desarrollo de la enfermedad vislumbran la importancia de conocidas mutaciones involucradas en su forma familiar. Diferentes variantes de los genes TERT así como otros genes relacionados con el mantenimiento de la telomerasa, tales como TINF2 (factor nuclear 2 que interactúa con TERF1), DKC1, RTEL1, PARN (poli(A)-ribonucleasas) y NAF1 (factor de ensamblaje nuclear 1), han sido identificados en aproximadamente el 25% de los pacientes con fibrosis pulmonar familiar (Armanios *et al.* 2007; Tsakiri *et al.* 2007; Kropski *et al.* 2014; Alder *et al.* 2015; Stuart *et al.* 2015). Estas mutaciones se

corresponden con el acortamiento aberrante de los telómeros que específicamente afecta a las células epiteliales alveolares 2 (AEC2s) pulmonares. El acortamiento de telómeros también ha sido observado en pacientes con FPI esporádica (Alder *et al.* 2008). De manera similar, mutaciones en los genes que codifican las proteínas del surfactante, principalmente el gen que codifica la proteína C tensioactiva (SFTPC) que se expresa exclusivamente por AEC2s, causan plegamiento y procesamiento disfuncional del surfactante, proteostasis desregulada y estrés del retículo endoplasmático y podría promover la dediferenciación epitelial (es decir, la transición epitelio-mesenquimal) (Mulugeta, Nureki y Beers 2015).

La variante rs35705950 del promotor del gen que codifica mucina 5B es el polimorfismo más común que aumenta notablemente el riesgo de producirse tanto FPI esporádica como familiar (Fingerlin *et al.* 2013; Noth *et al.* 2013). Sin embargo, esta modificación en el promotor de MUC5B no se observa universalmente; es raro encontrarlos en la población asiática pero es un importante factor de riesgo para la población blanca y mexicana (Fingerlin *et al.* 2013; Noth *et al.* 2013; Seibold *et al.* 2011). Paradójicamente, los pacientes con esta variante en el promotor han mejorado su supervivencia comparado con aquellos pacientes que no la poseen (Peljto *et al.* 2015).

Las mutaciones en TOLLIP (gen que codifica un inhibidor de la ruta del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y regulador importante del receptor *Toll-like* mediador de las respuestas inmunes) y OBFC1 (gen que codifica el sitio de unión 1 oligonucleótido/oligosacárido, también conocido como STN1), así como TERC y TERT están también implicados en la FPI esporádica.

Durante el envejecimiento, son muchos los cambios epigenéticos que se producen, entre ellos se encuentran la pérdida de histonas, la desregulación de microRNAs (miRNAs) y un cambio en los patrones de metilación del ADN. Todos estos cambios lideran diferencias impredecibles en los metilomas entre los individuos; la naturaleza estocástica de los cambios que se producen se considera que puede tener un rol diferente en el proceso patogénico de la FPI (Sen *et al.* 2016; Issa 2014; Hannum *et al.* 2013).

2.2. BALANCE DE FACTORES SOLUBLES Y DE SECRECIÓN

Se conoce que durante el proceso fibrótico hay un desequilibrio de factores solubles, de modo que se acumulan aquellos con propiedades profibróticas respecto aquellos que poseen propiedades antifibróticas. Se han identificado múltiples mediadores y factores de crecimiento implicados en la patogenia de la enfermedad. La mayoría de las células epiteliales en la FPI pulmonar están activadas de manera aberrante y producen los diferentes mediadores que contribuyen a la expansión de la población de fibroblastos y miofibroblastos y a la remodelación de la matriz extracelular (T. E. King, Pardo y Selman 2011; Selman y Pardo 2014). Estos mediadores incluyen de nuevo el factor de crecimiento transformante (TGF- β 1), el factor de crecimiento plaquetario, factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), TNF, osteopontina, la angiotensina II (B. Uhal *et al.* 2007), la endotelina-1 (ET-1), diversas metaloproteinasas de la matriz (incluyen MMP1, MMP7, MMP19, MMP1 y MMP2), un número extenso de quimiocinas y el factor derivado de células estromales 1 (Broekelmann *et al.* 1991).

También se ha descrito una disminución de mediadores antifibróticos, pero la lista de estos mediadores es mucho más limitada. Cabe destacar la prostaglandina E2 (PGE₂), una molécula procedente del metabolismo del ácido araquidónico con numerosas propiedades antifibrogénicas. La IL-1 β , citoquina perteneciente al inicio de la cascada del ácido araquidónico produce una gran secreción de PGE₂ emulando sus funciones. Esta citoquina se considera que podría ejercer un efecto profibrótico en fases iniciales del proceso fibrótico, pero se le otorga un papel antifibrótico en fases más avanzadas de este.

2.2.1. EL FACTOR TRANSFORMANTE BETA 1 (TGF- β 1)

El TGF- β 1 es el inductor principal de EMT durante el desarrollo embrionario, en la progresión tumoral y en condiciones de daño o remodelación tisular y la formación de una cicatriz como ocurre durante la fibrosis. Se considera el principal factor profibrótico, ya que actúa como inductor de la transformación fibroblasto-miofibroblasto y en el incremento de la deposición de colágeno durante la fibrosis. La señal del TGF- β 1, liberado por las propias AECs y miofibroblastos del foco fibrótico, es transducida por dos receptores serín-treonín quinasa distintos (TGF β R1 y TGF β R2) en las células alveolares mesenquimales, que fosforilan y activan a las proteínas citoplasmáticas SMAD2 y SMAD3 (Figura 8). Posteriormente, estas proteínas forman complejos con

SMAD4 que se translocan al núcleo para regular la activación o inhibición de factores de transcripción importantes tanto para la activación y formación de miofibroblastos (Derynck y Zhang 2003), como en la expresión de genes importantes en el control del estado de diferenciación celular. Esta ruta de señalización del TGF- β 1 juega un papel importante en la inflamación, angiogénesis, reepitelización y la regeneración del tejido (Ramirez, Patel y Pastar 2014). Las proteínas SMAD activas son capaces de inducir de forma directa la expresión de SNAI1. Como consecuencia, se produce la activación de algunos genes mesenquimales, como por ejemplo, los de la fibronectina, vimentina, N-cadherina (Vincent *et al.* 2009), colágeno alfa tipo I (Kaimori *et al.* 2007) y la disminución de E-cadherina, ocludina y otros marcadores epiteliales.

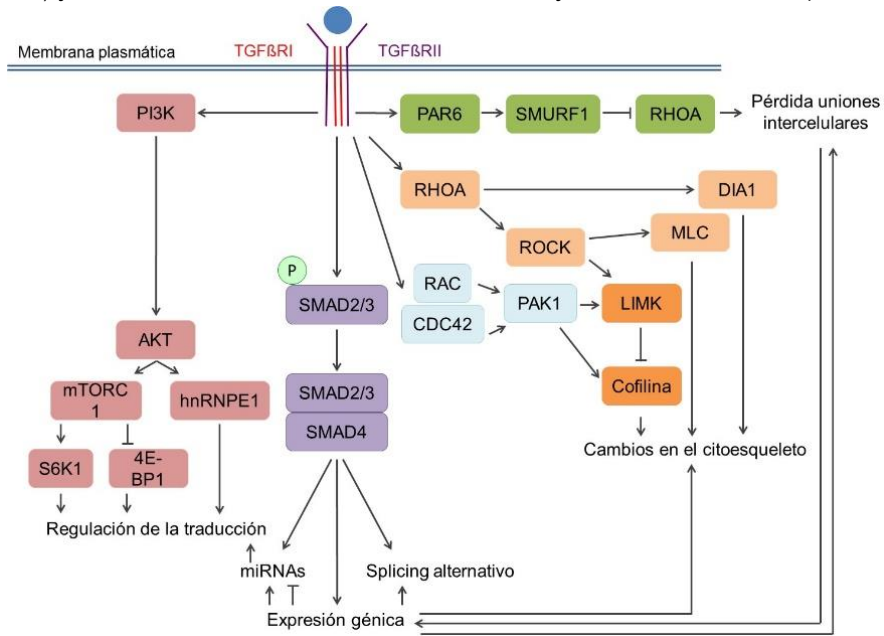


Figura 8: Mecanismos de transducción de señal inducidos por TGF- β 1.

Además de la señalización vía SMAD, el TGF- β 1 también induce EMT mediante la activación de guanosinas trifosfatasa (GTPasas) similares a RHO y las rutas de señalización de PI3K y MAPK. En células AECs, el TGF- β 1 activa AKT (proteína quinasa B) a través de PI3K (fosfatidil inositol-3-quinasa) (Derynck y Zhang 2003), lo que conlleva la activación de mTOR (diana de la rapamicina en mamíferos) que promueve el aumento del tamaño celular, la síntesis proteica, además de aumentar la motilidad y la capacidad invasiva (Lamouille y Derynck 2010).

2.2.2. LA INTERLEUQUINA 1 BETA (IL-1 β)

La interleuquina 1 beta (IL-1 β) es una potente citoquina proinflamatoria codificada por el gen IL-1 β . Su precursor, la pro-IL-1 β es hidrolizado por la enzima caspasa 1, liberándose la IL-1 β funcional, que es la forma madura y secretable (Hoffman y Wanderer 2010). Una vez la IL-1 β deja la célula, se une al receptor 1 de interleuquina-1 y produce como resultado la inducción de la respuesta inflamatoria. Se sintetiza fundamentalmente por los macrófagos activados, pero las células epiteliales y endoteliales también la producen. La IL-1 β incrementa la síntesis de proteasas y de esta forma es capaz de antagonizar el efecto del TGF- β 1 sobre la matriz extracelular. A su vez, la IL-1 β se ha utilizado como estímulo de la expresión de la enzima inducible ciclooxigenasa-2 *in vitro* (Roca-Ferrer *et al.* 2011), ya que es capaz de incrementar el metabolismo del ácido araquidónico en diversos tipos celulares, entre ellos los fibroblastos, las células endoteliales, hepatocitos y osteoclastos (Hoffman y Wanderer 2010).

Se ha descrito que niveles elevados de IL-1 β están asociados al desarrollo de la lesión fibrótica (Thomas A. Wynn y Ramalingam 2012), particularmente en modelos animales de sobreexpresión de esta citoquina, donde la inflamación inicial conduce a una respuesta fibrótica progresiva (M. Kolb *et al.* 2001). En FPI, se han descrito niveles incrementados de secreción de IL-1 β por macrófagos (Y. Zhang *et al.* 1993). Sin embargo, se le atribuye un papel antifibrótico en fases más avanzadas de la enfermedad principalmente a través de la síntesis de PGE-2 producto de la inducción de COX-2. De hecho, la FPI está caracterizada como un proceso asociado a una alteración severa del metabolismo del ácido araquidónico (Huang y Peters-Golden 2008; Xaubet *et al.* 2004).

2.3. ROL DE LAS CÉLULAS EPITELIALES ALVEOLARES

El alvéolo es la unidad funcional del pulmón donde se realiza el intercambio de gases entre la circulación sanguínea y el aire atmosférico. El epitelio alveolar está compuesto por células epiteliales de tipo I (neumocitos de tipo I (AECs1)) y tipo II (neumocitos de tipo II (AEC2s)). La membrana basal subepitelial separa este espacio del intersticio alveolar, que se encuentra entre el endotelio capilar pulmonar y el epitelio alveolar y está formado esencialmente por matriz extracelular y fibroblastos. En el espacio alveolar también existen los macrófagos alveolares.

Las AEC1s cubren aproximadamente el 96% de la superficie del epitelio pulmonar y son las encargadas de realizar el intercambio de gases. Estas células no son capaces de dividirse. Las AEC2s, a pesar de que cubren menos superficie alveolar, son más abundantes y tienen diversas funciones inmunológicas, metabólicas y secretoras. Una de ellas es producir surfactante, que se almacena en los orgánulos llamados cuerpos lamelares. La función principal del surfactante es recubrir la superficie alveolar para evitar que se colapse el alvéolo durante el proceso de intercambio de gases. Las AEC2s son las progenitoras de las AEC1s y, por tanto, serían las responsables directas de la reepitelización del alvéolo en caso de producirse daños en el pulmón (Serrano-Mollar 2012).

En la FPI, el epitelio es el principal lugar dañado por una lesión reiterada. Más concretamente, las células epiteliales alveolares, principalmente las células alveolares de tipo 2 (AEC2s), son las más afectadas. Muestran inestabilidad genómica, destrucción de la telomerasa, cambios epigenéticos, pérdida de proteostasis, disminución de la capacidad de nutrición, disfunción mitocondrial, envejecimiento celular y comunicación intercelular alterada (Selman y Pardo 2014). De este modo, los daños producidos por la FPI están caracterizados por una proliferación anómala de las células epiteliales, apoptosis, senescencia y una transición epitelio-mesenquimal parcial, todo ello relacionado con un aumento de la capacidad migratoria de las células. Por ejemplo, algunos estudios han demostrado la presencia de AEC2s apoptóticas normalmente en zonas de fibrogénesis activa; esta apoptosis quizás sea una de las primeras consecuencias del daño epitelial (B. D. Uhal *et al.* 1998; Jablonski *et al.* 2017). Además, también se han detectado zonas de proliferación hiperplásica del epitelio en algunas zonas pulmonares con FPI

(Qunn *et al.* 2002). El origen y la duración de estos fenómenos sigue siendo incierto.

Aunque el daño epitelial alveolar repetitivo por lesiones exógenas pueden ser un factor crítico que conduce a la reparación y regeneración desregulada en la FPI, existen evidencias científicas que demuestran que se puede producir una falta de la integridad epitelial con respuesta fibrótica sin lesión exógena (Selman y Pardo 2014; Kulkarni *et al.* 2016).

Una disfunción de la telomerasa restringida en las AEC2 también afecta a la función de las células madre, que afectaría severamente el potencial regenerativo de las células madre epiteliales del parénquima pulmonar y que podría conducir las al agotamiento o fracaso (Alder *et al.* 2015). La migración y la proliferación de las células basales bronquiolares y AEC2s, y el aumento de las poblaciones de células progenitoras, podrían participar en la reepitelización del tejido pulmonar como respuesta a una lesión (Smirnova *et al.* 2016).

2.3.1. TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL (EMT)

La transición epitelio-mesenquimal es el proceso por el cual las células epiteliales adquieren características moleculares y fisiológicas asociadas con células mesenquimales a través de la activación de factores de crecimiento como el TGF- β 1 (Kim *et al.* 2006; Kage y Borok 2012). Esta reprogramación molecular causa que las células epiteliales expresen genes mesenquimales, en detrimento de la expresión de genes epiteliales. Más concretamente, la activación de las células epiteliales mediante los factores de crecimiento promueve la inducción de determinadas proteínas como SLUG, la proteína 1 específica de fibroblastos (FSP1), la actina del músculo liso α -SMA, vimentina, integrina, fibronectina y metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Las integrinas que actúan e interaccionan con componentes de la matriz extracelular como la fibronectina, quedarán sobreexpresadas y promoverán la motilidad (Maschler *et al.* 2005; Yang *et al.* 2009). Al mismo tiempo, se reduce la expresión de proteínas epiteliales como la E-cadherina y sindecan-1. Estos cambios en la expresión de proteínas tendrá como consecuencia que las células epiteliales pierdan su polaridad ápico-basal y sus uniones intercelulares y posean más capacidad migratoria (Willis y Borok 2007).

Los cambios en la expresión génica que contribuyen a la represión del fenotipo epitelial y a la activación del fenotipo mesenquimal requieren una regulación muy precisa por parte de factores de transcripción (FTs) como

SNAIL (SNAI1), SLUG (SNAI2), TWIST1, TWIST2, ZEB1 y ZEB2, entre otros. Su expresión se activa de manera secuencial durante la EMT y juegan un papel muy importante en el desarrollo embrionario, la fibrosis y el cáncer (Barrallo-Gimeno y Nieto 2005).

Sin embargo, este proceso no siempre es completo. En algunas circunstancias, las células pueden sufrir una transición incompleta y tanto marcadores epiteliales como mesenquimales pueden aparecer simultáneamente (Jordan, Johnson y Abell 2011).

2.3.1.1. La Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT) en la FPI

La homeostasis del tejido normal no requiere procesos de EMT. Sin embargo, la EMT se encuentra activada durante condiciones de daño y remodelación tisular, como ocurre durante la fibrosis (Willis y Borok 2007; Kalluri y Neilson 2003). Las células pulmonares epiteliales responden al daño repetitivo, inflamación persistente y EMT sostenida generando fibrosis (Chapman 2011; Crosby y Waters 2010). Aunque el origen de los miofibroblastos en la fibrosis pulmonar no está totalmente esclarecido, algunos estudios han reportado la importancia de la EMT en la fibrosis pulmonar a través de la señalización del TGF- β 1 (Chen *et al.* 2015; K. K. Kim *et al.* 2006; Mubarak *et al.* 2012; Willis *et al.* 2005; Zhou *et al.* 2009; Zolak *et al.* 2013). De modo que las células epiteliales alveolares a través de la EMT pueden contribuir a la patología fibrótica inducida por TGF- β 1 (Dong, Collard y King 2006; Willis *et al.* 2005; Zhou *et al.* 2009).

En regiones de pulmón sano o pulmón con FPI, las células epiteliales y los fibroblastos están en posición cercana. La mejor evidencia de esta asociación son los focos fibróticos, donde los fibroblastos aparecen recubiertos por una capa de células epiteliales. En estas regiones, las células epiteliales pueden influir (señalizar) directamente a los fibroblastos liberando factores solubles que pueden actuar activando fibroblastos adyacentes. Un ejemplo de ello es la liberación por las células epiteliales de TGF- β 1 (Y. D. Xu *et al.* 2003) y su activación por la integrina epitelial α _v β ₆, que podría activar a los fibroblastos convirtiéndolos en miofibroblastos que expresan α -SMA. Otra citoquina producida en grandes cantidades por las AECs presentes en pulmones con FPI es PDGF (factor de crecimiento plaquetario) (Bergeron *et al.* 2003), el cual podría contribuir al agravamiento de la fibrosis pulmonar al promover la proliferación de los fibroblastos (Hetzl *et al.* 2005).

La evidencia de que las células alveolares exhiben EMT en pacientes con FPI se basa en estudios inmunohistoquímicos de colocalización de proteínas mesenquimales en secciones de pulmones de pacientes con FPI (Kim *et al.* 2006; Marmai *et al.* 2011; Willis *et al.* 2005). En un estudio, los marcadores de células alveolares de tipo II TTF-1 (factor tiroideo de transcripción 1) y la proteína prosurfactante B se colocalizaron con α -SMA en la mayoría de las AECs de los pulmones con FPI (Willis *et al.* 2005). De manera similar, se obtuvieron resultados de inmunohistoquímica que colocalizaban la proteína prosurfactante C, característica de las células alveolares de tipo II, con proteínas mesenquimales como la N-cadherina, α -SMA y la calponina-1 en pulmones con FPI (Kim *et al.* 2006; Marmai *et al.* 2011). Esta colocalización no fue observada en pulmones sanos. Además, análisis de mRNA confirmaron que las células epiteliales procedentes de pulmones con FPI expresaban proteínas mesenquimales como COL1A1 (colágeno de tipo 1), α -SMA y calponina 1, así como el factor de transcripción SLUG, todas ellas implicadas en el desarrollo de la EMT (Marmai *et al.* 2011). En un modelo murino de fibrosis pulmonar con TGF- β 1, la β -galactosidasa se expresaba en células epiteliales que también expresaban marcadores mesenquimales en pulmones dañados, indicando que las células epiteliales podrían ser progenitores de los fibroblastos. Por otro lado, el cultivo de AECs primarias en combinación con componentes de la matriz, como fibronectina o fibrina, desarrolló EMT a través de la activación de TGF- β 1 latente por la vía de la integrina-dependiente indicando que la ECM actúa como regulador del proceso EMT durante la fibrogénesis (K. K. Kim *et al.* 2006).

Otros mediadores solubles adicionales producidos por las células epiteliales que podrían afectar a los fibroblastos son las proteínas Wnt. Son glicoproteínas de señalización secretadas que tienen un papel fundamental en el desarrollo del pulmón, cáncer y fibrogénesis.

A pesar de la incertidumbre que existe todavía respecto a la implicación de la EMT en el proceso fibrótico en pulmones de pacientes con FPI y teniendo en cuenta que la fibrosis actualmente es un proceso irreversible, estos resultados sugieren que la modulación de la EMT mediante fármacos podría ser útil clínicamente (Kage y Borok 2012).

2.4. ROL DE LOS MIOFIBROBLASTOS

En general, una característica de la reparación anómala es la expansión exagerada de la población de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos. Los miofibroblastos también inducen apoptosis de las células epiteliales a través de la secreción de péptidos de angiotensina y oxidantes que afectan a la reepitelización (Wang *et al.* 1999; Waghray *et al.* 2005).

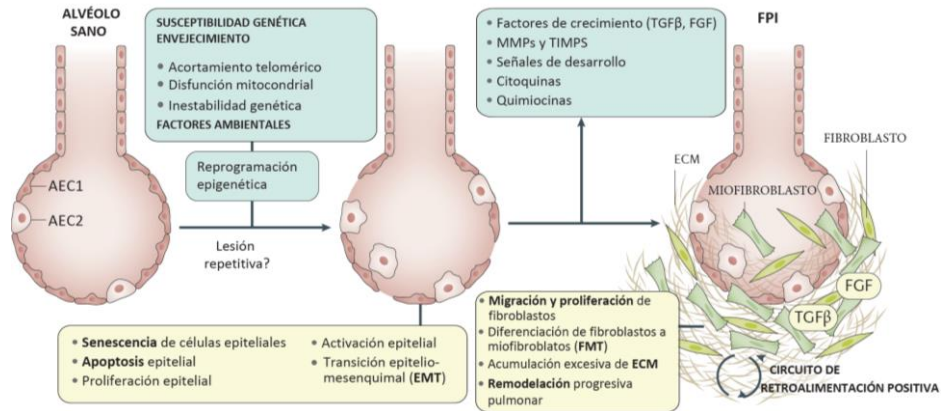


Figura 9: Modelo de patogénesis propuesta de fibrosis pulmonar idiopática. La convergencia de tres elementos: una arquitectura genética que afecta a la integridad de las células epiteliales, los factores ambientales y los cambios acelerados asociados con el envejecimiento, da como resultado una reprogramación epigenética compleja que promueve la activación de las células epiteliales aberrantes en la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), que podría o no exacerbarse por lesiones continuadas. El epitelio activado secreta una gran cantidad de mediadores que inducen la migración, proliferación y activación de fibroblastos y miofibroblastos, que son resistentes a la apoptosis y secretan persistentemente componentes de la matriz extracelular (ECM). La ECM también es un reservorio de factores de crecimiento que pueden liberarse como ligandos solubles tras la degradación de la misma. En lugar de ser lineal, la secuencia se caracteriza por una serie de bucles de retroalimentación positiva, como entre la rigidez de la matriz y la activación de los fibroblastos. Además, la diafonía (*crosstalk*) (por ejemplo, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y la señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF- β 1)) se suma a la complejidad y probablemente conduce a la progresión inexorable de la enfermedad. AEC1: célula alveolar de tipo 1; MMP: metaloproteinasa de matriz. Modificado de (Martínez *et al.* 2017).

Los miofibroblastos son las células efectoras de la fibrosis. Se trata de un fenotipo diferenciado de fibroblasto con capacidad contráctil igualable a las células musculares lisas y presenta expresión de α -SMA (Hinz *et al.* 2007). Una característica clave común a las lesiones fibróticas y durante el proceso de reparación y cicatrización de una herida, es la presencia de miofibroblastos en

las zonas de síntesis activa de la matriz extracelular y remodelado (Figura 9). Representan la fuente principal del incremento de la matriz y de citoquinas (Zhang *et al.* 1994), intervienen en la apoptosis de las células alveolares y retardan la regeneración epitelial (Waghray *et al.* 2005), todos ellos factores considerados clave en el mantenimiento del ciclo fibrótico.

En condiciones normales, los fibroblastos quiescentes tienen escasos contactos célula-célula o célula-matriz extracelular asociados a actina y presentan una síntesis escasa de matriz extracelular (Tomasek *et al.* 2002).

Después del daño de un tejido, los fibroblastos y miofibroblastos se activan y migran hacia la zona dañada donde sintetizan componentes de la matriz extracelular estimulados por la secreción de citoquinas por parte de las células inflamatorias y otras células residentes. El estrés mecánico asociado a los cambios de la matriz extracelular presente en la zona de la herida, también estimula a la transición fenotípica de los fibroblastos que adquieren fibras de estrés de actina conectadas a las proteínas de la matriz mediante integrinas (Tomasek *et al.* 2002). Este fenotipo se conoce como proto-miofibroblasto. El paso que lo convierte a un miofibroblasto diferenciado es la síntesis *de novo* y ensamblaje de alfa actina del músculo liso (α -SMA), el marcador más utilizado para definir un miofibroblasto y que le confiere una gran capacidad contráctil, así como la expresión de otros marcadores mesenquimales como el colágeno. Este complejo proceso fisiopatológico se conoce con el nombre de Transición Fibroblasto-Miofibroblasto (FMT) e implica la aparición o aumento de marcadores mesenquimales de los fibroblastos en detrimento de marcadores asociados al epitelio, dando como resultado un cambio fenotípico hacia el miofibroblasto (S. Zhang *et al.* 1999; Larsen *et al.* 2004). Es un fenómeno que ocurre en el cuerpo humano bajo circunstancias tanto fisiológicas como patológicas y guarda grandes similitudes con la EMT.

Para activar la FMT y generar α -SMA se han de producir al menos tres factores: 1) la presencia de TGF- β 1 activo, 2) la presencia de proteínas específicas de la matriz extracelular y 3) cierta tensión mecánica mínima parecida a las propiedades de un tejido en proceso de remodelado (Gabbiani 2003).

Como se adelantaba en apartados anteriores, el principal inductor de la activación del fibroblasto y su consecuente transformación a miofibroblasto es el TGF- β 1 que incrementa la expresión de los componentes de la matriz necesarios para la diferenciación, como la fibronectina (Thannickal *et al.* 2003). Numerosas citoquinas fibrogénicas como el factor de crecimiento derivado de

plaquetas (PDFG), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Rubbia-Brandt, Sappino y Gabbiani 1991), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Desmouliere *et al.* 1992), interleuquina 4 (IL-4) e interleuquina 13 (IL-13) (Hashimoto *et al.* 2001), incrementan la expresión de α -SMA, mientras que el interferón-gamma (IFN- γ) y la IL-1 β disminuyen su expresión (Gharaee-Kermani *et al.* 2009).

Los fibroblastos y miofibroblastos también juegan un papel en la coagulación sanguínea y la angiogénesis y producen señales paracrin, CTGF, varias quimiocinas y especies reactivas de oxígeno que favorecen la respuesta fibrótica. Sin embargo, el grado de impacto de esta participación en la FPI no está todavía claro (Kendall y Feghali-Bostwick 2014).

2.4.1. ORIGEN DE LOS MIOFIBROBLASTOS

Como se ha mencionado anteriormente, muchos de los mediadores secretados por las células epiteliales participan en el reclutamiento de miofibroblastos. Sin embargo, la fuente de miofibroblastos en la FPI y su contribución a la enfermedad, siguen sin estar del todo esclarecidos (Hinz *et al.* 2012). Entre las células candidatas como progenitoras de miofibroblastos se incluyen (Figura 10):

- Fibroblastos perivasculares y peribronquiolares residentes en el intersticio pulmonar por el proceso de transición fibroblasto-miofibroblasto (FMT).
- Células epiteliales alveolares por el proceso de transición epitelio-mesenquimal (EMT).
- Fibrocitos circulantes procedentes de la médula ósea.

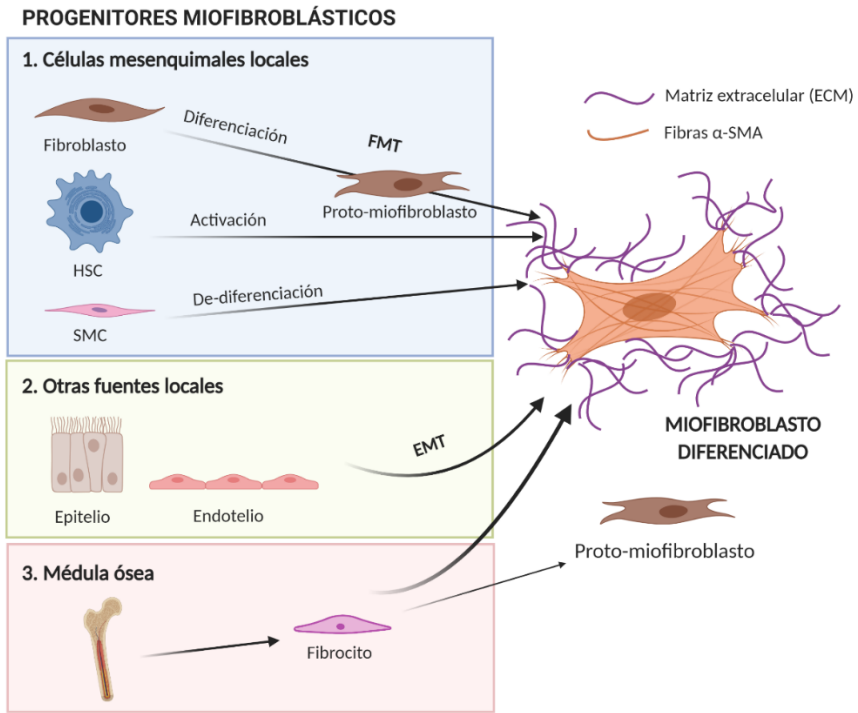


Figura 10: Posibles orígenes descritos del fenotipo miofibroblasto. Los miofibroblastos diferenciados se caracterizan por una mayor producción de proteínas de la ECM y por el desarrollo de fibras de estrés α -SMA positivas que están conectadas en sitios super maduros de adhesión focal (Fas) de la ECM y entre las células a través de uniones adherentes. El miofibroblasto progenitor después de la lesión de diferentes tejidos, parece ser el fibroblasto que reside localmente, que se diferencia transitoriamente en un protomiofibroblasto, caracterizado por ser negativo a α -SMA. En el pulmón, la EMT puede provocar otro mecanismo para la generación de miofibroblastos. La contribución de los fibrocitos circulantes derivados de la médula ósea en la formación de miofibroblastos no está clara en la actualidad, aunque es muy probable que la transdiferenciación de fibrocitos termine en la etapa de protomiofibroblasto. HSC: célula hematopoyética pluriipotencial de la médula ósea. (adaptado de Hinz *et al.* 2007)

Una de las principales fuentes de miofibroblastos serían los fibroblastos locales residentes en estado de quiescencia, que se activarían en respuesta a estímulos extracelulares como el TGF β -1, wnt, Jagged/Notch, endotelina-1, ácido lisofosfatídico u otras moléculas de señalización, así como por causa de hipoxia y el estrés mecánico causado por el incremento de la dureza y rigidez de la matriz extracelular (Varga y Abraham 2007; Kis, Liu y Hagood 2011). Todos estos estímulos inducen la expresión de α -SMA y la formación de fibras de estrés en cultivos de fibroblastos procedentes de diversos órganos.

Los fibrocitos circulantes también se consideran posibles precursores de los miofibroblastos. En condiciones normales, las células derivadas de la médula ósea representan menos de un 1% del total de células circulantes. En respuesta a lesiones, se liberan fibrocitos en cantidades superiores y llegan a la zona dañada, donde se diferencian a protofibroblasto y miofibroblastos e incrementan la deposición de matriz extracelular, contribuyendo al proceso fibrótico.

Las células del epitelio alveolar y las células endoteliales presentes en el alvéolo pueden sufrir procesos de EMT mediante la inducción de la misma a través de factores como el TGF- β 1 y convertirse en precursores directos de miofibroblastos.

Se ha demostrado mediante diversas aproximaciones que existen diferencias en los perfiles proteicos, genéticos y transcripcionales entre precursores de miofibroblastos procedentes de diferentes orígenes y sus equivalentes fibróticos (Larsson *et al.* 2008). Se ha descrito que se mantienen las características específicas de los miofibroblastos durante diversos pases *in vitro*, lo que sugiere una memoria de miofibroblasto que preserve el fenotipo. (Hinz *et al.* 2012). Sin embargo, se desconoce si los miofibroblastos procedentes de diferentes orígenes celulares tienen papeles diferentes en el proceso de reparación de una herida normal, así como en la respuesta fibrótica.

2.4.2. PROCESO DE REPARACIÓN DE UNA HERIDA

Los procesos de reparación de una herida tienen típicamente dos fases: una fase regenerativa en la cual las células dañadas son sustituidas por células del mismo tipo, sin consecuencias visibles del daño reparado; y una fase fibrótica, en la cual el tejido conectivo sustituye el parénquima normal del tejido. A pesar de que inicialmente es necesario y beneficioso, el proceso reparativo se convierte en patogénico si no es controlado apropiadamente, lo que resulta en una deposición anormal de matriz extracelular, donde el tejido normal es sustituido por una cicatriz permanente (Figura 11) (T. A. Wynn 2008).

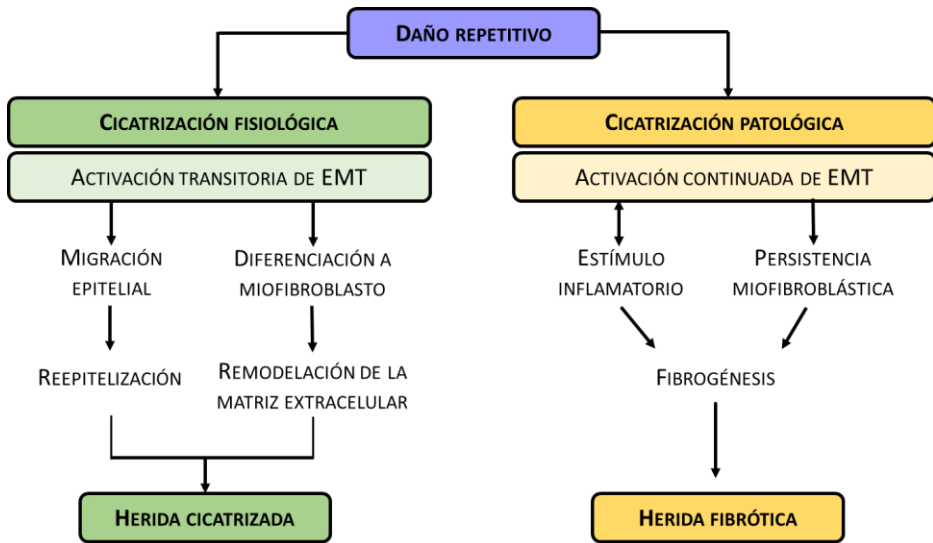


Figura 11: Modelo de la activación de EMT provocada por daño repetitivo que precisa de reparación fisiológica o fibrótica (adaptado de (Stone *et al.* 2016)).

En condiciones normales, cuando se produce una herida en un tejido se rompen los vasos sanguíneos, se liberan factores quimiotácticos como el TGF- β 1 o el factor de PDGF que permiten y promueven la migración hacia la zona de la herida de células inflamatorias, fibroblastos y células endoteliales (Amadeu *et al.* 2003). En este proceso, hay fibroblastos que adquieren el fenotipo miofibroblasto, proceso en el que participan diversas citoquinas, factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular como la heparina (Desmouliere *et al.* 1992) y la fibronectina (Serini *et al.* 1998).

Posteriormente se produce la reepitelización del tejido. Las células epiteliales pierden su polaridad apico-basal y proliferan y migran utilizando la matriz provisional de fibrina y fibronectina debido a que existe una disrupción de la membrana basal. A continuación, se produce un proceso de remodelado que acaba con la formación de una cicatriz. En esta fase se sustituye la matriz provisional por una de colágeno tipo I, un proceso mediado por las enzimas metaloproteinasas (MMPs) y sus inhibidores (TIMPS). Se incrementa la contracción de la herida y se reorganizan los filamentos de la matriz. Los miofibroblastos, conectados a la matriz por medio de las integrinas, son los encargados del proceso contráctil. Finalmente, cuando finaliza el proceso de reparación, tanto la composición de la matriz extracelular reparada como el descenso en la tensión mecánica inducen una desaparición masiva de los

miofibroblastos por apoptosis (Desmouliere *et al.* 1995; Desmoulière *et al.* 1997).

En la FPI esta desaparición no se produce porque los miofibroblastos muestran una resistencia incrementada a la apoptosis. Esto produce un proceso de respuesta a una herida permanente y se produce la cicatrización constante que desemboca en fibrosis.

Además, cabe recordar que diversas rutas de señalización de diferentes factores de crecimiento activadas durante el proceso de reparación de una herida, están también involucradas en la inducción y regulación de la EMT, lo que hace evidente la importancia del proceso EMT en la restauración del tejido después de sufrir un daño (Figura 12). Los factores de crecimiento comunes para ambos procesos son: el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento epitelial (EGF), el factor transformante de crecimiento beta (TGF- β 1) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Akhurst y Derynck 2001; Camenisch *et al.* 2002; Jechlinger *et al.* 2006; H.-J. Kim *et al.* 2007).

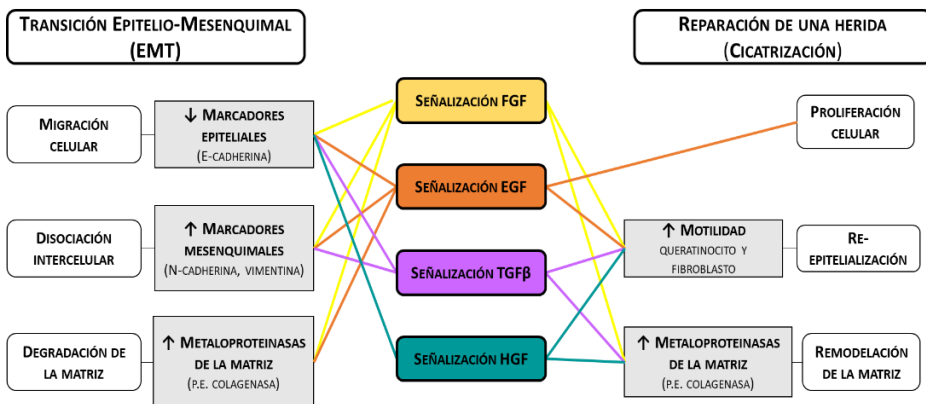


Figura 12: Vías de señalización de factores de crecimiento comunes y esenciales para la EMT y procesos de cicatrización de herida. FGF: factor de crecimiento fibroblástico; EGF: el factor de crecimiento epitelial; TGF- β : el factor transformante de crecimiento beta y HGF: el factor de crecimiento de hepatocitos (adaptado de (Stone *et al.* 2016)).

2.4.3. REGULACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA FPI

Los componentes de la matriz son sintetizados por las células residentes y secretados a la matriz, donde se agregan con los componentes existentes y tienen una potente influencia sobre las funciones celulares (Clarke *et al.* 2013). La matriz está formada por una mezcla de proteínas fibrosas y glicosaminoglicanos, pero el componente más abundante es el colágeno. Los principales colágenos son el tipo I y el tipo III, que crean una red de fibras en el intersticio de los tejidos. El colágeno tipo IV es el componente principal de la membrana basal.

En FPI, existe un incremento de la síntesis y deposición de colágeno por parte de los fibroblastos y los miofibroblastos. En condiciones normales, la matriz sintetizada por los fibroblastos presentes en el pulmón sirve de entramado de soporte para las células y de vía para los mediadores solubles, de modo que permite una respuesta rápida frente a los cambios en las tensiones físicas que recibe el órgano. En el pulmón, los fibroblastos se encuentran principalmente en áreas subepiteliales de las vías aéreas y en el intersticio del parénquima pulmonar. Se ha observado que los fibroblastos aislados de pulmón con FPI presentan características fenotípicas diferentes a los fibroblastos normales, con alteraciones en la respuesta a factores de crecimiento y el incremento en la expresión de receptores de quimiocinas.

Como se comentaba anteriormente, la secreción de matriz extracelular está altamente regulada por las metaloproteinasas (MMPs) y sus inhibidores (TIMPs). Las MMPs son enzimas con actividad proteolítica que se encargan de la degradación de la matriz extracelular. Las células epiteliales, fibroblastos y miofibroblastos y macrófagos tienen capacidad de síntesis de MMPs en el pulmón, controlando las tasas de recambio de la matriz y, por tanto, la arquitectura del tejido pulmonar y el inicio y resolución de los procesos de cicatrización de una herida.

En efecto, la ECM es una estructura altamente organizada que proporciona un marco físico para las células y tiene un papel dinámico en la señalización; también es reservorio de factores de crecimiento que pueden liberarse como factores solubles por degradación de esta. Además, algunos proteoglicanos son importantes en ciertas rutas de señalización de factores de crecimiento (Figura 13).

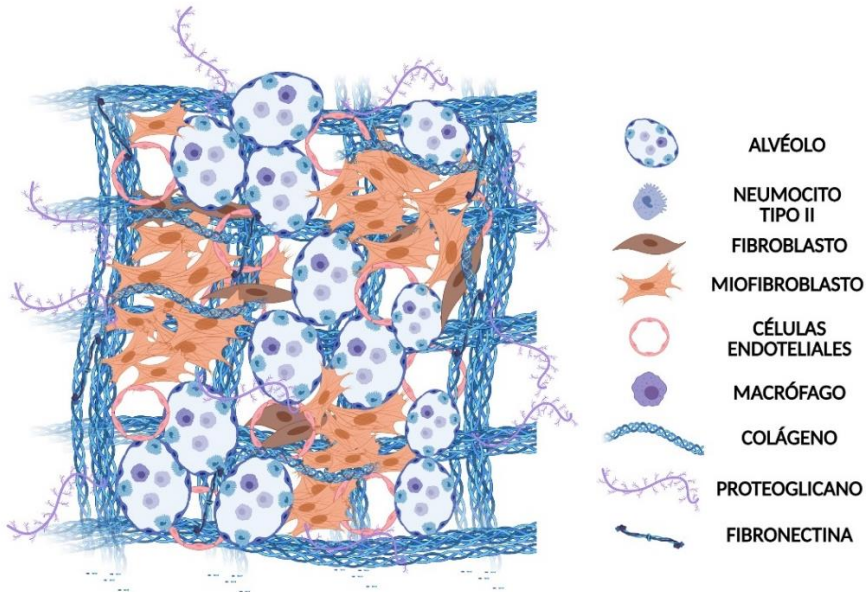


Figura 13: Imagen representativa de la matriz extracelular en el contexto de la FPI.

Las características mecánicas de la matriz (su rigidez y deformabilidad) contribuyen notablemente al comportamiento celular (Mouw, Ou y Weaver 2014). La propia ECM podría tener un papel fundamental en la patogénesis de la FPI, debido, en parte, a su rigidez, elasticidad y dinamismo. A través del análisis de la ECM por medio de microscopía atómica se ha revelado un considerable endurecimiento de la matriz en pulmones con FPI en comparación con los pulmones normales (Booth *et al.* 2012). La influencia de la rigidez de la ECM ha sido documentada por numerosos estudios experimentales (F. Liu *et al.* 2010; Balestrini *et al.* 2012). Los fibroblastos cultivados bajo condiciones de rigidez patológica se diferencian a miofibroblastos y ven incrementada su contractilidad, proliferación, producción de colágeno y de TGF- β . Además, la ECM presente en la FPI produce alteraciones en la regulación transcripcional de los fibroblastos de pulmón que, a su vez, modifica la traducción de proteínas que enriquecen el proteoma característico de la matriz extracelular de la FPI como: COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A2, COL4A2, MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, MMP10 y TIMP2. Estas proteínas abundan en los focos fibróticos y podrían contribuir a la destrucción y remodelado del tejido (Clarke *et al.* 2013). Curiosamente, los genes que codifican estas proteínas son

modulados por mir-29, que parece estar regulado negativamente en fibroblastos cultivados en matriz extracelular derivada de FPI. Este descubrimiento sugiere un circuito de retroalimentación positiva entre fibroblastos y ECM aberrante en el que la ECM fibrótica es a la vez una causa y consecuencia de la activación de los fibroblastos (Parker *et al.* 2014). Otros estudios han identificado un papel clave para las α -integrinas de los miofibroblastos en la regulación de la fibrosis a través de la activación del TGF- β 1.

La acumulación excesiva de matriz en la FPI no solo afecta a la capacidad respiratoria física del pulmón, sino que altera de manera activa las funciones biológicas de las células con las que está en contacto, promoviendo el proceso de cicatrización permanente y desequilibrando el balance de síntesis y degradación de matriz.

2.5. SENESCENCIA Y FPI

Un envejecimiento prematuro o acelerado parece ser importante en algunas enfermedades pulmonares, incluyendo a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la FPI, pero también podría ser clave en enfermedades como el asma, la bronquiectasia y la hipertensión pulmonar en infecciones pulmonares. La edad es el factor de riesgo más importante para la FPI, sugiriendo que un envejecimiento acelerado pulmonar es una fuerza impulsora para su desarrollo (Wolters, Collard y Jones 2014). De hecho, la mayor parte de los sellos distintivos moleculares del envejecimiento están aumentados u ocurren de manera prematura en la FPI. Un mejor entendimiento de los mecanismos de envejecimiento acelerado en enfermedades pulmonares crónicas está permitiendo identificar nuevas dianas terapéuticas, así como el desarrollo de nuevas terapias dirigidas para dichas enfermedades.

Los signos más característicos del proceso de envejecimiento incluyen la inestabilidad genómica, el acortamiento de los telómeros, proteostasis reducida (autofagia), disfunción mitocondrial, disminución de la asimilación de nutrientes, cambios epigenéticos, agotamiento de las *stem cells* y senescencia celular (López-Otín *et al.* 2013).

2.5.1. LA SENESCENCIA CELULAR

La senescencia celular describe un estado celular provocado por agresiones estresantes y ciertos procesos fisiológicos, que se caracteriza por un prolongado y generalmente irreversible arresto del ciclo celular, con daño macromolecular, con alteraciones de la secreción y con un metabolismo alterado. Estas características, que son interdependientes entre sí, provocan cambios fenotípicos en las células, los cuales dirigen la patología en muchas enfermedades relacionadas con la edad.

Para entender mejor cómo se desarrolla la senescencia celular, es fundamental conocer los distintos procesos que pueden ser desencadenantes de la misma, entre los más importantes se encuentran (Figura 14):

- Senescencia replicativa (desgaste de los telómeros).
- Senescencia relacionada con el estrés (estrés celular).
- Arresto del ciclo celular
- Fenotipo de secreción asociado a la senescencia (SASP).

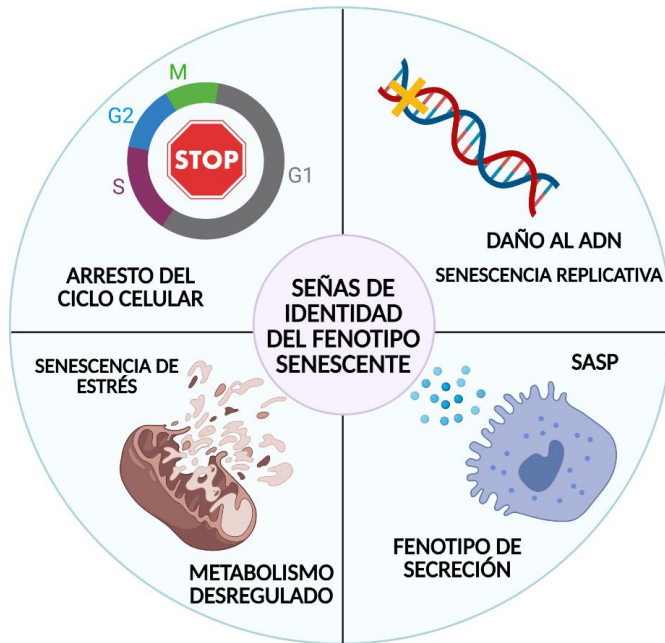


Figura 14: Señas de identidad del fenotipo senescente. Las células senescentes muestran las siguientes cuatro características interdependientes: arresto del ciclo celular, daño al ADN, fenotipo de secreción (SASP) y desregulación del metabolismo. Modificado de (Gorgoulis *et al.* 2019) .

La senescencia celular es un sello distintivo del envejecimiento y puede desarrollarse después de repetitivas divisiones celulares debido al desgaste progresivo de los telómeros, con activación de las vías de respuesta de daño al ADN, lo que resulta en la activación del supresor tumoral p53 (senescencia replicativa). Alternativamente, puede producirse debido al estrés celular, por ejemplo, a causa del estrés oxidativo, radiaciones ionizantes o terapias citotóxicas, los cuales pueden activar el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina p16^{ink4} (senescencia relacionada con el estrés). Estos caminos pueden interactuar entre sí y ambos activan el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p21^{cip1} que conduce a la detención (arresto) del ciclo celular a través de la inhibición de la quinasa 2/4 dependiente de ciclina (Tchkonia *et al.* 2013; Muñoz-Espín y Serrano 2014).

La senescencia celular aguda puede ser beneficiosa durante el desarrollo embrionario, la cicatrización de una herida y en procesos de reparación de tejidos (Muñoz-Espín y Serrano 2014). A pesar de que la senescencia celular ha sido considerada beneficiosa para proteger contra la

malignidad, la acumulación de células senescentes en animales envejecidos a lo largo del tiempo provoca disfunción tisular, enfermedades relacionadas con el envejecimiento y acortamiento de la vida útil (Van Deursen 2014). De hecho, la eliminación de células senescentes que expresan p16^{ink4a} a través de un mecanismo dependiente de caspasa, da como resultado un aumento de la vida útil (>30%) de ratones que normalmente envejecen debido a fallo orgánico y desarrollo de cáncer (Baker *et al.* 2016).

En el contexto de la FPI, las AECs y los fibroblastos pueden sufrir procesos de senescencia (Schafer *et al.* 2017), los cuales, en algunos casos, son a causa del acortamiento de los telómeros (Alder *et al.* 2008). La acumulación de células senescentes favorece el progreso de la fibrosis pulmonar en la FPI. Al mismo tiempo, la senescencia celular podría estar implicada en un incremento del riesgo de sufrir cáncer de pulmón en pacientes con EPOC o FPI. La senescencia también puede encontrarse en células fuera de los pulmones como es el caso de las células madre derivadas de la médula ósea en pacientes con FPI, de modo que la senescencia en células con inmunidad innata y adaptativa (inmunosenescencia) puede resultar en respuestas inmunes deterioradas y mayor susceptibilidad a las infecciones, el cáncer y la autoinmunidad (Akha 2018).

2.5.2. EL FENOTIPO DE SECRECIÓN ASOCIADO A LA SENESCENCIA

En contraste con las células apoptóticas, las células senescentes son metabólicamente activas. El fenotipo de secreción asociado a la senescencia (SASP) podría afectar a otras células a través de la secreción de múltiples proteínas inflamatorias descritas (Salama *et al.* 2014; Correia-Melo, Hewitt y Passos 2014) (Figura 15). La respuesta SASP es activada por p21^{cip1}, lo que provoca la activación de la proteína quinasa mitógeno-activada p38 y las quinasas Janus-activadas. Este hecho produce la activación de NF- κ B (factor nuclear κ B) y la secreción de proteínas inflamatorias (IL1 β , IL-6 y TNF α [factor de necrosis tumoral α], factores de crecimiento (VEGF [factor de crecimiento endotelial vascular] y TGF- β 1), quimiocinas (CXCL1 [quimiocina (C-X-C *motif*) ligando 1], CXCL8 y CCL2 [quimiocina (C-C *motif*) ligando 2]) y MMPs (MMP2 y MMP1) los cuales están todos incrementados en enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como es el caso de la FPI. Otra proteína característica del SASP, el PAI-1 (inhibidor-1 activador de plasminógeno), está incrementado en el esputo y en los alveolos de pacientes con FPI (Schuliga *et al.* 2018), lo

que podría sugerir que la senescencia celular quizá podría contribuir a la inflamación crónica observada en estas patologías. Además, el CXCL8 se une al receptor de quimiocinas CXCR2 (quimiocina C-x-C *motif receptor* 2) y posteriormente se induce daño al ADN y senescencia celular. El bloqueo de CXCR2 con antagonistas específicos reduce la senescencia de tipo replicativo y por estrés (Acosta *et al.* 2008).

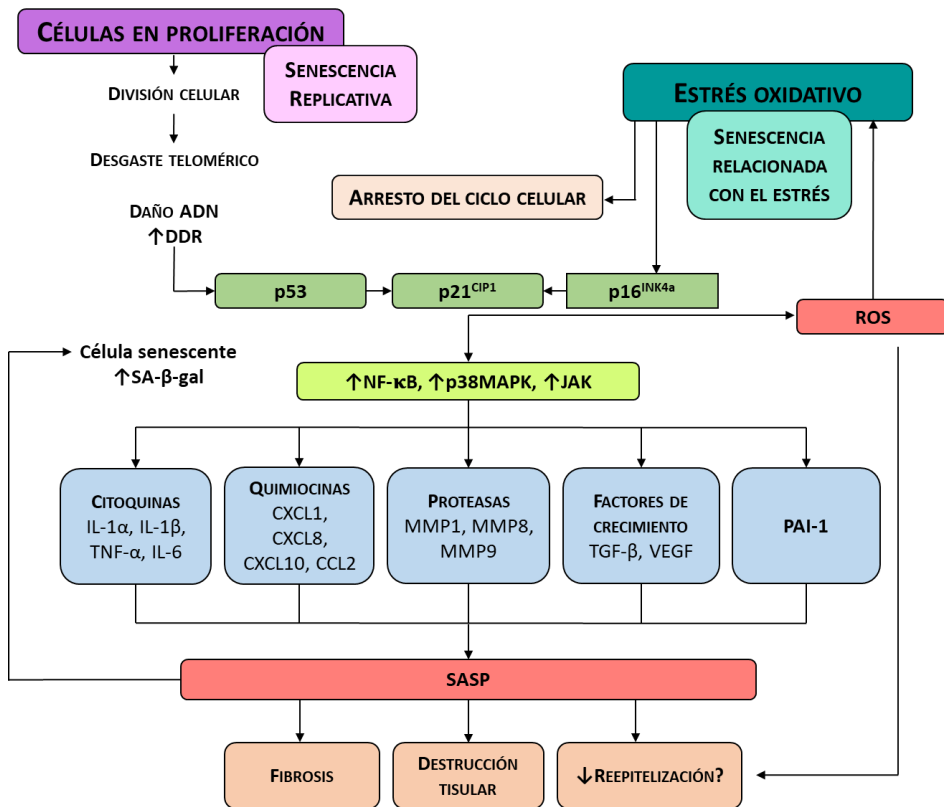


Figura 15: Mecanismos de senescencia celular. Principalmente existen tres vías que conducen a la senescencia celular: la senescencia replicativa, la senescencia relacionada con el estrés y la senescencia asociada al fenotipo secretor (SASP). La división celular conduce a un acortamiento progresivo de los telómeros, lo que eventualmente conduce a la activación de la respuesta al daño del ADN (DDR), que activa p53 (senescencia replicativa). El estrés celular, como el estrés oxidativo, también puede causar daño al ADN y activa p16^{ink4a} (senescencia relacionada con el estrés) y junto con p53 activa al inhibidor de ciclina quinasa p21^{cip1}, que induce la detención del ciclo celular. Estas células se tiñen positivamente para β-galactosidasa asociada a la senescencia. Las células senescentes muestran activación de NF-κβ, p38 MAPK y JAK, lo que resulta en la secreción de múltiples proteínas inflamatorias conocidas como la senescencia asociada al fenotipo secretor (SASP), el cual incluye citoquinas inflamatorias, quimiocinas, proteínas, factores de crecimiento y PAI-1. El SASP induce una mayor senescencia y las células senescentes

liberan especies reactivas de oxígeno (ROS), que impulsan aún más el proceso de senescencia. El SASP también conduce a cambios estructurales, incluida la fibrosis y la destrucción de tejidos (adaptado de (Barnes, Baker y Donnelly 2019)).

Por otro lado, la activación de p16^{ink4a} también activa la forma reducida de las oxidasas del nucleótido de nicotinamida adenina fosfato, produciendo un mayor incremento del estrés oxidativo y la activación de NF- κ B (Takahashi *et al.* 2006). Los inhibidores de JAK (quinasa Janus-activada) inhiben la respuesta SASP y reducen la debilidad de ratones envejecidos (Xu *et al.* 2015). Aún más, el SASP también incluye la activación del inflamasoma NLRP3, produciendo la secreción de IL-1 β , lo que perpetúa la respuesta inflamatoria (Acosta *et al.* 2008).

2.5.3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE REGULAN LA SENESCENCIA CELULAR

Como se observa en la Figura 16, son diferentes las rutas de señalización que regulan la senescencia celular. En primer lugar, el estrés oxidativo que podría estar causado por el tabaquismo o por la presencia de células inflamatorias, inhibe PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina), que produce la activación de PI3K que, a su vez, activa mTOR. Por otro lado, la activación de AMPK (AMP quinasa) también aumenta mTOR y esto conduce a la activación del microARN-34^a (miR-34^a), que inhibe la sirtuína-1 (SIRT1) y sirtuína-6 (SIRT6) en paralelo. La disminución de SIRT1 juega un papel clave en la senescencia a través de la activación de NF- κ B, que da como resultado la activación de SASP; la disminución de PGC-1 α (coactivador del receptor g activado por proliferador de peroxisoma 1 α), que regula la función mitocondrial, la autofagia alterada y la reparación del ADN, así como la activación de p53. La disminución de SIRT6 también activa NF- κ B, disminuye la longitud de los telómeros y reduce la β -catenina, encargada de regular la integridad celular y el VEGF. A su vez, la reducción de SIRT1 también inhibe el factor de transcripción FOXO3a, mientras que la reducción de SIRT6 reduce NRF2, ambos encargados de la regulación de los agentes antioxidantes, lo que resulta en un aumento del estrés oxidativo.

La activación de la MAPK p38 (quinasa activada por mitógenos) conduce a un aumento de c-Jun y la activación de AP-1 (proteína activador-1),

que aumenta miR-570, lo que conllevará la disminución de SIRT1 (pero no de SIRT6) (Dai *et al.* 2018; Kugel y Mostoslavsky 2014).

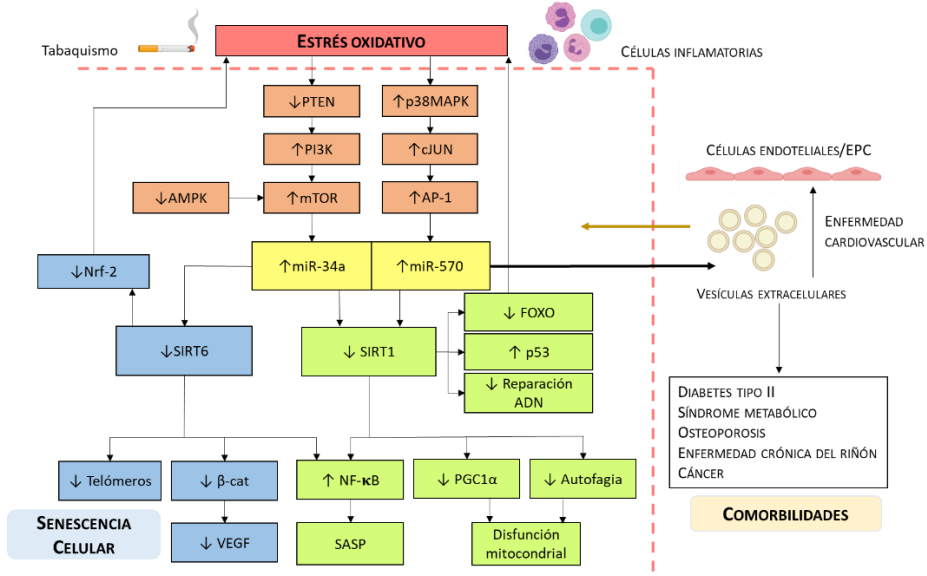


Figura 16: Vías de señalización que regulan la senescencia celular. Adaptado de (Barnes, Baker y Donnelly 2019)

Por lo que respecta a los miARNs, pueden liberarse de células senescentes como vesículas extracelulares. A continuación, pueden ser captadas por otras células en el pulmón o viajar a otros órganos, como el sistema cardiovascular, a través del torrente circulatorio. De esta manera, la senescencia puede diseminarse local y sistemáticamente, hecho que pudiera explicar las comorbilidades de las enfermedades pulmonares crónicas, como la FPI.

2.6. IMPLICACIONES EN LA TERAPIA: SENOLÍTICOS

Como se comentaba con anterioridad, recientemente se han hecho grandes progresos en el descubrimiento de los mecanismos moleculares implicados en la senescencia celular de enfermedades pulmonares crónicas. Aunque por el momento es imposible alcanzar una reversión del envejecimiento normal, puede ser probable que se consigan revertir las vías que dan como resultado la senescencia prematura, ya que la identificación de nuevas dianas terapéuticas ha permitido el desarrollo de senoterapias.

Los senolíticos son drogas que inducen selectivamente la apoptosis de células senescentes, mientras tienen poco o ningún efecto sobre las células en estado de proliferación. El potencial de estas drogas se basa en su capacidad de tratar vías comunes a las comorbilidades asociadas a la patología principal, como la FPI (Barnes 2015). Terapias futuras podrían involucrar un cambio en el estilo de vida, incluyendo dietas nutricionales específicas y ejercicio físico (De Cabo *et al.* 2014). En la Tabla 4 se muestran diferentes senolíticos y los mecanismos y efectos que producen en la FPI.

Tabla 4: Senolíticos en estudio para el tratamiento de la FPI (adaptado de (Barnes, Baker y Donnelly 2019))

FÁRMACO	MECANISMO PROPUESTO	EFFECTOS EN LA FPI
Rapamicina rapalogs	Inhibición de mTORC1	↓ fibrosis bleomicina en ratón
Metformina	Activación de AMPK	↓ fibrosis bleomicina en ratón, ↓ miofibroblastos en FPI, sin beneficio clínico en FPI
Quercetina	Activador senolítico de AMPK	↓ fibrosis bleomicina en ratón, ↑ apoptosis en fibroblastos de FPI
Quercetina + Dasatinib	Senolítico	↓ fibrosis bleomicina en ratón, ↓ marcadores de senescencia y SASP, algunas mejoras clínicas en pacientes
Navitoclax	Senolítico (inhibidor de Bcl2)	↓ fibrosis inducida por radiación en ratón
FOXO4-DRI	Senolítico	No hay estudios en patologías pulmonares
GKT37831	Antioxidante (inhibidor de Nox4)	↓ fibrosis en envejecidos y bleomicina en ratón, ↓ marcadores de senescencia ↑ apoptosis en fibroblastos de FPI

3. EL METABOLISMO PULMONAR EN LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

3.1. ADAPTACIONES METABÓLICAS DE LOS FIBROBLASTOS PULMONARES ACTIVADOS (MIOFIBROBLASTOS)

A pesar de que la fibrosis pulmonar representa un heterogéneo grupo de trastornos y cada condición puede tener diferentes eventos de incitación, las principales células responsables de producir la gran mayoría de tejido cicatricial en todos los casos son los fibroblastos de pulmón activados.

En la actualidad, es conocido que los fibroblastos de pulmón se activan en respuesta a una dramática reprogramación metabólica, ayudando así a facilitar el crecimiento, la proliferación, la contracción y sus actividades de síntesis de matriz extracelular (Phan 2008; Hinz *et al.* 2007; Bernard *et al.* 2015). Uno de los principales cambios que se producen en estos fenómenos de reprogramación metabólica es la regulación positiva de la glucólisis aeróbica. Por ejemplo, Xie y otros han demostrado que varias enzimas limitantes de la glicólisis están reguladas al alza en fibroblastos de pulmón activados y esto se asocia con un marcado aumento del flujo glucolítico (Xie *et al.* 2015; Bernard *et al.* 2015). Aunque estos estudios no determinaron por qué la glucólisis sufre este cambio, recientemente se han propuesto diferentes teorías.

En primer lugar, se considera que la glucólisis ayuda a los fibroblastos a satisfacer sus demandas energéticas. A pesar de que la glucólisis es considerada un medio ineficiente para generar ATP (dos moléculas de ATP por glucólisis versus 36 moléculas de ATP por fosforilación oxidativa), la glucólisis aeróbica en realidad puede producir ATP a mayor velocidad que la fosforilación oxidativa, proporcionando a los fibroblastos una fuente de energía rápida. Además, la glucólisis también genera subproductos que podrían ser importantes para los fibroblastos, como el lactato. Se cree que la producción de lactato puede ser esencial por varias razones, tanto por sus efectos extracelulares como intracelulares. Por ejemplo, la producción de lactato restaura los niveles celulares del nicotín-adenín-dinucleótido (NAD⁺), a través de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH), que no solo permite que continúe la glucólisis, sino que también sirve para mantener el equilibrio redox

de las células. Por otro lado, la producción de lactato también tiene efectos importantes en el medio extracelular, incluido el sinergismo para la activación de TGF- β 1 mediante la reducción del pH extracelular (después de su conversión a ácido láctico) y que sirve de fuente de energía para las células adyacentes (Faubert *et al.* 2017; Kottmann *et al.* 2012).

Además de estos beneficios, la glucólisis es importante para la síntesis de nuevas células. Esto se logra desviando los intermedios glucolíticos a otras vías metabólicas involucradas en la síntesis de nucleótidos, lípidos o aminoácidos. Por ejemplo, la glucosa-6-fosfato es un sustrato esencial para la ruta de las pentosas fosfato, produciendo ribosa-5-fosfato empleada en la síntesis de nucleótidos (ATP y GTP) (Ge *et al.* 2018; Bassett y Fisher 1979) y el NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) para la síntesis *de novo* de lípidos. Los productos intermediarios de la glucólisis también pueden ser desviados a otras rutas metabólicas dependiendo de las necesidades específicas de las células. Por ejemplo, Nigdelioglu *et al.* demostraron que los fibroblastos de pulmón activados desviaban grandes cantidades de intermediarios glucolíticos a la ruta de la síntesis *de novo* de serinas (Nigdelioglu *et al.* 2016). Esto produce, a su vez, aminoácidos no esenciales como la glicina, que son muy abundantes en el colágeno y por tanto necesarios para la formación de las cicatrices pulmonares.

Junto con un aumento en la glucólisis, la glutaminólisis está también incrementada en los fibroblastos pulmonares activos (Ge *et al.* 2018; Bernard *et al.* 2018). La glutaminólisis es el proceso metabólico por el cual el aminoácido glutamina se convierte a glutamato y a α -cetoglutarato por las enzimas glutaminasa y glutamina deshidrogenasa, respectivamente. Ge *et al.* demostraron que los niveles de glutaminasa se incrementaron significativamente tanto en fibroblastos de pulmón de ratón activados con TGF- β 1 como en fibroblastos procedentes de pacientes con FPI. Además, los niveles intracelulares de glutamina en estas células estaban reducidos por el aumento de la actividad glutaminasa (Figura 17).

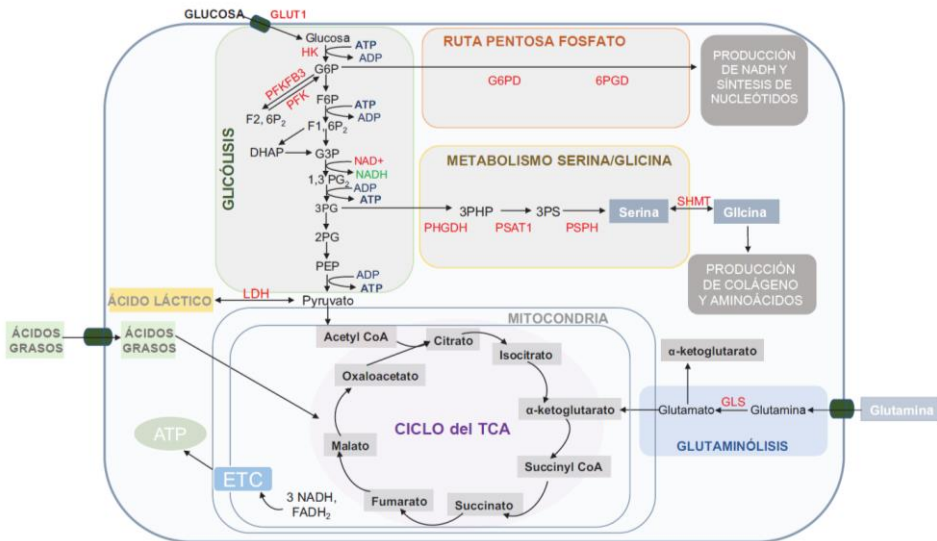


Figura 17: Visión general de las principales rutas metabólicas en fibroblastos activados y en reposo. El metabolismo celular empieza con la entrada de glucosa en la célula y la posterior glucólisis (una serie de reacciones de 10 pasos en el citoplasma). La glucólisis produce dos moléculas de piruvato, el cual se convierte en lactato por la enzima LDH o se transporta a las mitocondrias para el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). El ciclo del TCA produce tres moléculas de NADH y una molécula de FADH₂ que sirve como donador de electrones para la cadena de electrones y la producción de ATP. Otro de las rutas metabólicas empleadas por los fibroblastos incluye la ruta de la pentosa fosfato y el metabolismo de síntesis *de novo* de la serina/glicina. Estas vías dependen de los intermediarios metabólicos de la glucólisis. Además, los fibroblastos activados utilizan la glutaminólisis para promover actividades profibróticas. La glutaminólisis es el proceso por el cual la glutamina se convierte en α -cetoglutarato. Abreviaturas: GLUT1: transportador de glucosa 1; HK: hexoquinasa; G6PD: glucosa-6-deshidrogenasa; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; PFKFB3: 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 3; PFK: fosfofructoquinasa-1; PHGDH: fosfogliceratodeshidrogenasa; PSAT1: fosfoserina aminotransferasa; SHMT: serina hidroximetiltransferasa 2; LDH: lactato deshidrogenasa; GLS: glutaminasa; NADH: nicotinamida adenina dinucleótido; FADH₂: flavin adenina dinucleótido; ETC: cadena de transporte de electrones; ATP: adenina trifosfato.

Recientemente, la glutaminólisis se considera importante también por otras razones, incluyendo la inducción de la transcripción de colágeno a través de la activación de mTOR y la alimentación de la síntesis *de novo* de prolina a través de la acción de la pirrolina-5-carboxilato sintetasa. Además, Xie *et al.* mostraron que los subproductos de la glutaminólisis son importantes por varias razones. Por ejemplo, el succinato, también puede ayudar a estabilizar la expresión del factor inducible por hipoxia α (HIF1 α), aumentando así los niveles de enzimas glucolíticas y favoreciendo la reprogramación metabólica (Xie *et al.*

2015). La Tabla 5 muestra un resumen de las diferentes rutas descritas anteriormente.

Tabla 5: Dianas metabólicas para inhibir la activación de miofibroblastos

RUTA METABÓLICA	DIANA	RESULTADO
GLICÓLISIS	PFKFB3	PRODUCCIÓN DE COLÁGENO PROLIFERACIÓN
RUTA DE LA PENTOSA FOSFATO	G6PD	PRODUCCIÓN DE NADPH SÍNTESIS DE NUCLEÓTIDOS PROLIFERACIÓN
RUTA DE LA SERINA/GLICINA	PHGDH PSAT1 PSPH SHMT	PRODUCCIÓN DE COLÁGENO
FERMENTACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO	LDH	ACTIVACIÓN DEL TGF- β
GLUTAMINÓLISIS	GLS	ACTIVACIÓN DE HIF1A ACTIVACIÓN DEL TGF- β PRODUCCIÓN DE COLÁGENO
CONSERVACIÓN DE LA ENERGÍA	AMPK	PROLIFERACIÓN SÍNTESIS DE LÍPIDOS PRODUCCIÓN DE COLÁGENO
RUTA PRO-CRECIMIENTO	MTOR	PRODUCCIÓN DE COLÁGENO

Abreviaturas: fosfoglicerato deshidrogenasa; PSAT1: fosfoserina aminotransferasa; PSPH: fosfoserina; AMPK: Proteína quinasa activada por AMP; G6PD: Glucosa 6-Fosfato deshidrogenasa; GLS: glutaminasa; LDH: Lactato deshidrogenasa; mTOR: Diana de rapamicina en células de mamíferos; PFKFB3: Fosfofructo-2-quinasa 6-fosfogluconato deshidrogenasa; PHGDH: fosfatasa; SHMT: serina hidroximetiltransferasa.

4. LA NICOTINAMIDA N-METILTRANSFERASA

La Nicotinamida N-metiltransferasa (NNMT) es una enzima citoplasmática de la familia de las N-metiltransferasas que cataliza la N-metilación de la piridina, nicotinamida (NAM) y componentes relacionados estructuralmente usando la S-adenosilmetionina (SAM) como dador de grupos metilos (Thompson *et al.* 1999; Kim *et al.* 2009; Hanazawa *et al.* 1994; Hoshino, Kühne y Kröger 1982). La NNMT está implicada en la regulación de múltiples rutas metabólicas en tejidos, tales como el tejido adiposo y hepático, a través del consumo de dadores de metilos y la generación de metabolitos activos (Pissios 2017).

La nicotinamida es una forma de la vitamina B3 y un precursor del NAD⁺ el cual es crucial en la modulación del metabolismo energético e influye notablemente en la esperanza de la vida celular (Sartini *et al.* 2007; Micheli *et al.* 1990; Houtkooper *et al.* 2010; Xie *et al.* 2014). Además, la NNMT catalizada la transformación de la nicotinamida a 1-metilnicotinamida (1-MNA), el cual tiene una importancia vital en el control de la concentración intracelular de la nicotinamida (Aksoy, Szumlanski y Weinshilboum 1994).

Una actividad elevada de NNMT puede disminuir los niveles celulares de nicotinamida y como consecuencia, inhibir la apoptosis celular (Thompson *et al.* 1999; Eckert *et al.* 2019). Muchos investigadores han identificado altos niveles de expresión de NNMT en diversos tipos de células de cáncer, y esta sobreexpresión de NNMT se considera involucrada en la proliferación celular de estas enfermedades (Xu *et al.* 2016; Emanuelli *et al.* 2010). Mientras gran cantidad de estudios demuestran que NNMT podría ser un marcador potencial en cáncer, el mecanismo exacto por el cual NNMT acentúa la tumorigénesis es todavía incierto.

En modelos humanos y de roedores de daños asociados con la inflamación se han observado niveles incrementados de expresión de NNMT. La NNMT está significativamente incrementada en los pulmones y el músculo esquelético de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica con pérdida muscular (Marmai *et al.* 2011; Savarimuthu Francis *et al.* 2011). Un incremento significativo de la expresión de NNMT también ha sido descrito en pacientes con diferentes formas de distrofias.

Además, un daño hepático experimental con concavalina A e inducción de hipertensión pulmonar también incrementan la expresión y la actividad de NNMT (Sternak *et al.* 2010; Fedorowicz *et al.* 2016). La inflamación

incrementada en estos estados de la enfermedad y en los modelos de daño se consideran que están dirigidos por el incremento de la expresión de NNMT. Esto está apoyado por experimentos *in vitro* que muestran estimulación directa de mioblastos del músculo esquelético humano con IL-6, TNF α y TGF (Ho *et al.* 2010). El rol de NNMT y MNAM (metilnicotinamida) en estos procesos inflamatorios requiere de una investigación más profunda para elucidar su desarrollo pero se sospecha que representa una respuesta compensatoria protectora frente al daño (Ho *et al.* 2010; Jakubowski *et al.* 2016).

4.1. EXPRESIÓN DE NNMT Y SU REGULACIÓN

La NNMT es una enzima citosólica de 29 kDa de peso molecular. Aunque la NNMT está principalmente expresada en el hígado en tejidos sanos (Štefatić *et al.* 2008; Xu *et al.* 2003), niveles bajos de NNMT han sido detectados en el cerebro, pulmón, corazón, riñón, músculo esquelético y placenta. Sin embargo, altos niveles de expresión de NNMT han sido observados en el cerebelo y el núcleo caudado en pacientes que han sido diagnosticados de Parkinson y también en muchas otras enfermedades como osteoartritis, cirrosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad cardiovascular y cáncer (Liu *et al.* 2015). Los resultados indican que la expresión de NNMT está significativamente elevada en tumores (Zhang *et al.* 2014). Además, los altos niveles de NNMT en los diferentes cánceres aparecen inversamente asociados con el tamaño y la progresión del tumor, lo que sugiere que el efecto potencial de NNMT se corresponde con los pasos iniciales de la adquisición de malignidad (Lu y Long 2018).

La sobreexpresión de NNMT asociada a varios cánceres humanos ha causado un gran interés científico con la finalidad de establecer el mecanismo por el cual está regulada (Ulanovskaya, Zuhl y Cravatt 2013).

Xu *et al.* (Xu *et al.* 2005) sugirieron que la activación de factor nuclear hepático-1 beta (HNF-1beta) contribuyó a la sobreexpresión de NNMT en células papilares de cáncer de tiroides y que el inhibidor de la histona desacetilasa de depsipéptido reducía los niveles de NNMT y su actividad catalítica (Jimin Xu y Hershman 2006).

Otros estudios han propuesto una nueva ruta de señalización ZEB1/NNMT donde NNMT es capaz de incrementar la migración celular inducida por ZEB1 en cáncer ovárico. Este hecho podría facilitar la

comprensión de las causas de la plasticidad de las células tumorales y la heterogeneidad y recurrencia tumoral (Kanska *et al.* 2017).

A su vez, la NNMT se encontró presente de manera significativa en la invasión celular y en la activación de la metalopeptidasa de la matriz 2 (MMP2) en células tumorales. Las investigaciones también indicaron que la región de unión del factor de transcripción SP-1 del promotor de la MMP-2 tenía un rol esencial en la expresión de MMP-2 inducida por NNMT, y que la ruta de la fosfatidilinositol 3-quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt) podría estar involucrada en la invasión celular dependiente de NNMT y la activación de MMP-2.

Además, ha sido demostrado que las vías de señalización de los transductores de señal y los activadores de transducción 3 (Stat3) (Tomida *et al.* 2008) y el factor nuclear NFκB (Hsu *et al.* 2012) son importantes en la sobreexpresión de NNMT en tumores; donde niveles elevados de NNMT aparecen asociados al proceso de transición epitelio-mesenquimal (EMT). Otra sugerencia es que la NNMT tiene una modificación postransduccional de manera específica en el cáncer; donde NNMT recombinante es fosforilada por la caseína quinasa 2 (CK2) *in vitro* (B. H. Lim *et al.* 2006).

4.2. PRINCIPALES RUTAS METABÓLICAS ASOCIADAS A NNMT

La NNMT es la principal enzima metabolizadora de la nicotinamida (NAM), ya que cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosilmetionina (SAM) al anillo de nitrógeno de la NAM, produciendo 1-metilnicotinamida (1-MNA) y S-adenosilhomocisteína (SAH). NAM es un precursor del NAD⁺, el cofactor mejor conocido por donar electrones al complejo mitocondrial I en la cadena de transporte de electrones, pero también factor rédox para múltiples oxidorreductasas (Bogan y Brenner 2008). Enzimas como las sirtuínas y las poli-ADP-ribosiltransferasa (PARP) utilizan NAD⁺ como cosustrato para realizar reacciones de desacetilación y ADP-ribosilación y regulan múltiples procesos biológicos (Cantó, Menzies y Auwerx 2015; Y. Yang y Sauve 2016). Tanto las sirtuínas como las PARP rompen el NAD⁺ y liberan NAM, que inhibe su actividad enzimática (Bitterman *et al.* 2002; Clark, Ferris y Pinder 1971). Por tanto, los cambios en la actividad de NNMT podrían influir potencialmente en los niveles intracelulares de NAM y NAD⁺ y en la actividad de múltiples enzimas.

Además, está ampliamente descrito que la activación de NNMT produce una disminución de la capacidad de metilación en los tejidos, ya que la relación SAM/SAH tisular se ve reducida (Pissios 2017). SAM tiene dos funciones principales: proveer de grupos propilamina para la síntesis de poliaminas y donar grupos metilos para diferentes sustratos, como las histonas. Las poliaminas (putrescina, espermina y espermidina) son policationes orgánicas esenciales en diferentes funciones celulares que afectan al crecimiento celular, el cáncer y la edad.

La implicación de estos metabolitos en funciones celulares fundamentales y de gran importancia, sitúan a la NNMT en el foco de interés de gran cantidad de cambios metabólicos observados en diferentes patologías.

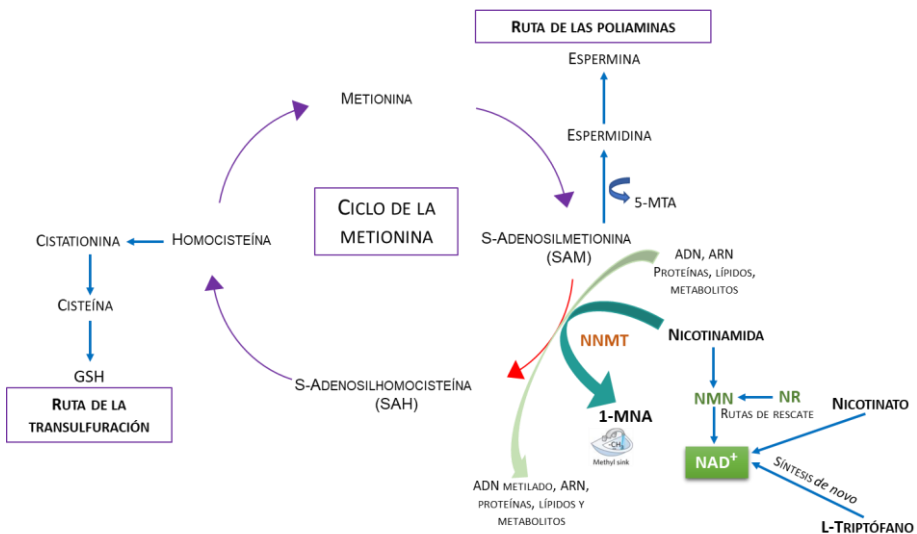


Figura 18: Principales rutas metabólicas en las que está implicada NNMT

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La Fibrosis Pulmonar idiopática es una enfermedad que requiere de marcadores clínicos más específicos para su diagnóstico y de nuevas dianas terapéuticas que nos proporcionen un tratamiento más eficaz.

Los procesos asociados a la fibrosis guardan similitud con aquellos que suceden en el estroma tumoral y con procesos de EMT. En este contexto, se ha atribuido a la enzima NNMT un papel de gran relevancia. La hipótesis de este trabajo fue que la NNMT participa en los procesos fibróticos asociados a la FPI y nos podría proporcionar un marcador de utilidad en la clínica de estos pacientes.

El objetivo principal de la tesis ha sido evaluar la implicación de la NNMT en la transición fibroblasto y miofibroblasto (FMT), la senescencia y el metabolismo en la fibrosis pulmonar idiopática.

Los objetivos concretos han sido los siguientes:

- Obtener y caracterizar una colección de fibroblastos primarios procedentes de pacientes con FPI y neumotórax (control) que nos sirva como modelo *in vitro* para el estudio de la FMT y de la EMT.
- Estudiar la senescencia asociada a las poblaciones fibroblastos obtenidas.
- Evaluar el efecto de la estimulación de las poblaciones de fibroblastos con el factor fibrótico TGF- β 1 y el factor proinflamatorio y antifibrótico IL-1 β como moduladores de la FMT.
- Determinar la actividad, los niveles proteicos y la expresión génica de NNMT en los cultivos de fibroblastos de FPI respecto a los fibroblastos control y su modulación mediante TGF- β 1 e IL-1 β .
- Analizar el impacto funcional de la inhibición y sobreexpresión de NNMT mediante herramientas de transducción génica con partículas lentivirales y su impacto en los parámetros fibróticos, mesenquimales y de senescencia, así como los cambios metabólicos producidos en estas células.
- Validar los resultados obtenidos analizando por inmunohistoquímica la expresión y localización de NNMT comparándola con α -SMA en cortes de tejido parafinado de pacientes.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN

Los estudios se realizaron con fibroblastos primarios de pulmón obtenidos de biopsias de pulmón humano. Con la intención de poder realizar comparaciones en los resultados obtenidos, estas biopsias provenían de dos grupos diferentes de pacientes: un grupo de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y otro grupo formado por individuos control. El tejido del grupo fibrótico se obtuvo durante la biopsia pulmonar quirúrgica realizada para el diagnóstico de pacientes con FPI (N= 15). El diagnóstico de FPI se estableció de acuerdo con los criterios de la *American Thoracic Society (ATS)/ European Respiratory Society (ERS)* (ATS/ERS 2000). Además, ninguno de estos pacientes con FPI había recibido tratamiento con corticoesteroides u otros tratamientos inmunosupresores en el momento de la obtención de la muestra.

El tejido de pulmón del grupo control se obtuvo de individuos sin antecedentes de enfermedad respiratoria, no fumadores y con ausencia de infección respiratoria en los últimos tres meses, a los cuales se les realizó la cirugía como tratamiento de neumotórax espontáneo. A estos pacientes se les realizó una pleurodesis por videotoracoscopia y se obtuvieron explantes de tejido pulmonar normal, sin evidencia histopatológica de enfermedad (N=30). Debido a que no es posible obtener muestras de tejido pulmonar completamente sano, se consideró el tejido procedente de individuos jóvenes con neumotórax sin señal de ninguna enfermedad respiratoria subyacente como la opción más adecuada y realista de disponer de tejido pulmonar normal.

De todos los pacientes se obtuvo consentimiento informado de acuerdo con las guías institucionales y el estudio fue aprobado por el "Comité Ético del Hospital Universitario de La Ribera".

Las principales características de los pacientes que participaron en el estudio se recogen en la Tabla 6

Tabla 6: Características de los pacientes empleados para la obtención de las poblaciones de fibroblastos utilizadas en nuestro estudio.

PACIENTES	SEXO		EDAD	HÁBITO TABÁQUICO		
	HOMBRE	MUJER		FUMADOR/EX FUMADOR	NO FUMADOR	NO INDICADO
Neumotórax (Control)	76,20%	23,8%	28,9±11,23	61,9%	9,5%	28,57%
FPIs	70%	30%	67,63±7,77	64,28%	14,28%	21,42%

2. CULTIVOS CELULARES

Los fibroblastos aislados de las biopsias pulmonares humanas, así como la línea HEK 293 LTV se cultivó en medio completo compuesto por:

- 90% DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con GlutaMAX™ y 4,5 g/l de glucosa (Gibco®, Life Technologies).
- 10% de Serum Bovine Fetal (SBF) (Gibco®, Life Technologies)
- 100 U/ml de penicilina (Gibco®, Life Technologies)
- 0,25 µg/ml de fungizona (Gibco®, Life Technologies)

La línea celular HEK 293 LTV es una línea embrionaria de riñón que se utiliza para el empaquetamiento de partículas lentivirales.

2.1. AISLAMIENTO DE FIBROBLASTOS PRIMARIOS DE PULMÓN HUMANO

Los fibroblastos primarios de pulmón se obtuvieron a partir de la digestión de las biopsias de pulmón. El tejido pulmonar se troceó en pequeñas piezas en una placa y fueron digeridas en un tubo de 1,5 ml durante toda la noche a 37°C con la solución de digestión: DMEM *high glucose* (Gibco, Fisher Scientific, Madrid, España) y 0,1 mg/ml Liberase TM (Sigma). El cóctel enzimático contiene colagenasa I y II que favorece la disgregación y la digestión del tejido pulmonar, con el propósito de obtener los fibroblastos. La solución del tejido se filtró a través de un filtro de 100 µm (BD Falcon™) y el filtrado de células obtenido se centrifugó a 1500 rpm, 25°C durante 15 minutos. El sobrenadante fue descartado cuidadosamente y el *pellet* de células se resuspendió con medio completo (DMEM + SBF al 10%), se transfirió a un

frasco de 25 cm² y se colocó en el incubador de células en atmósfera húmeda (37°C, 5% CO₂).

Cuando los fibroblastos ocuparon alrededor del 80% de la superficie del frasco (aproximadamente 10 días después) se recogieron las células con un tratamiento de 0,05% tripsina- 0,02% de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (Gibco). Posteriormente se realizaron cultivos seriados o subcultivos con el mismo medio en frascos de 150 cm² con el fin de aumentar la cantidad de células disponibles para realizar los diferentes diseños experimentales y evitar la contaminación de otros tipos celulares y su senescencia. Todos los experimentos se realizaron entre los pases 5 y 8, ya que pases superiores pueden alterar el fenotipo normal del fibroblasto. Los estudios siempre se realizaron igualando el número de pases de los grupos. En este sentido, es necesario hacer una congelación al tercer pase para así mantener un fenotipo más estable y poder conservar células a largo plazo obtenidas de cada uno de los pacientes.

2.2. CONTAJE Y CONGELACIÓN CELULAR

Con el fin de garantizar el mantenimiento de las líneas celulares a largo plazo, se congelaron en nitrógeno líquido. Esto permitió establecer una librería de fibroblastos de todos los pacientes. En el tercer pase, se tripsinizaron y se recogieron las células siguiendo el mismo procedimiento que en los subcultivos. Se cuantificaron las células empleando el contador automático *Countess® II* (Invitrogen). La técnica de conteo que utiliza este aparato se basa en el método de exclusión del colorante azul tripán.

El azul tripán es un colorante vital que se introduce en el interior de las células que tienen comprometidas la permeabilidad de la membrana. Sin embargo, no puede atravesar la membrana intacta de las células vivas.

Para realizar el conteo celular, tras la tripsinización y resuspensión de las células en medio completo, se mezcló una alícuota de la suspensión celular obtenida con una solución de azul tripán al 0,4% (Invitrogen) a partes iguales y se cargó en unas cámaras de conteo especiales y específicas para este aparato (*Countess® cell counting chamber slides*; Invitrogen).

Para la congelación de las células se repartieron aproximadamente dos millones de células viables por cada criovial. El medio de congelación de dichas células estaba compuesto por medio completo y un 10% de dimetilsulfóxido

(DMSO). Todo el proceso se realizó en frío y en condiciones estériles. Los crioviales se insertaron en un contenedor de congelación *Mr. Frosty* y se mantuvo durante 24h en un congelador de -80°C , permitiéndose así una disminución progresiva de la temperatura de 1°C por minuto. Este proceso se realiza gracias a una pieza metálica que contiene el recipiente de congelación, mejorando así la calidad de congelación. Posteriormente los crioviales fueron almacenados en un tanque de nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización.

2.3. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO

Para la caracterización de las poblaciones celulares obtenidas y con la finalidad de asegurarnos de la pureza de los fibroblastos primarios aislados de las biopsias pulmonares, se llevó a cabo una inmunofluorescencia de los marcadores más característicos de este tipo celular como son el α -SMA y la vimentina; así como del marcador epitelial por excelencia, la E-cadherina, que se encuentra ausente en este tipo celular.

Para ello, los fibroblastos se cultivaron hasta llevarlos a subconfluencia y se realizó la inmunofluorescencia siguiendo el protocolo especificado en el subapartado 4. Como muestra la Figura 19, el total de los fibroblastos fueron positivos para vimentina (color morado) y además muchos de ellos fueron positivos para α -SMA (color verde), mientras que fueron totalmente negativos para E-cadherina. Esto demostró que no habían células epiteliales contaminantes en los cultivos de fibroblastos.

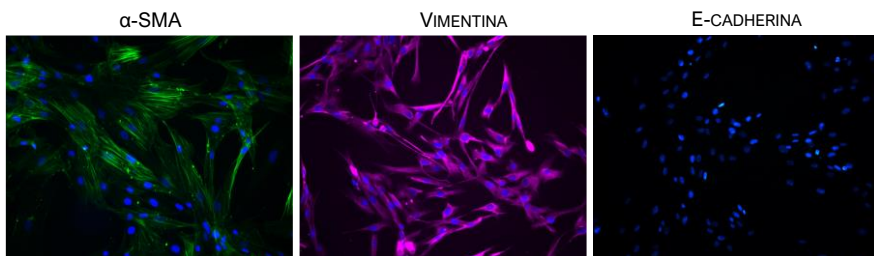


Figura 19: Inmunofluorescencia de marcadores FMT y epiteliales en fibroblastos fibróticos. Diferentes poblaciones de fibroblastos tanto control como fibróticos se sembraron en cubreobjetos en placas de 24 pocillos y tras 48 horas se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%. Se observan imágenes representativas, en las que los núcleos teñidos con Hoechst-33342 aparecen en azul, α -SMA en verde, vimentina en morado y e-cadherina está ausente. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Leica DM4500B (200x).

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE *WESTERN BLOT*

El *Western Blot* es una técnica ampliamente utilizada en la biología molecular y celular que permite determinar la cantidad de una proteína específica en un extracto proteico y compararlo con los niveles existentes en otras muestras. Esta técnica es una secuencia de diferentes procesos, entre los que cabe destacar: extracción proteica, electroforesis en el gel y transferencia y, por último, la inmunodetección (Figura 20).

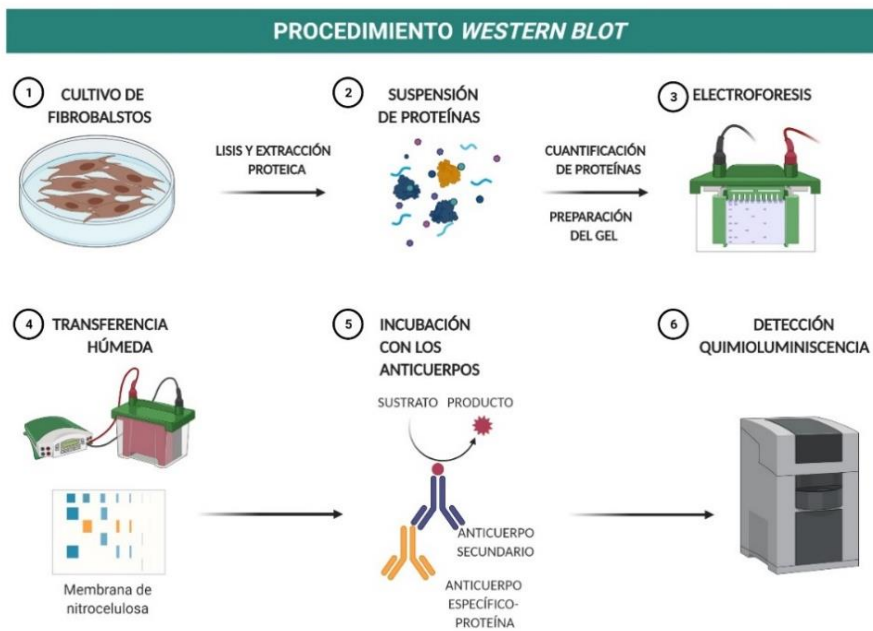


Figura 20: Esquema del Procedimiento de realización del *Western Blot*.

3.1. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.

Las células se cultivaron en placas de cultivo de 90 cm y se realizaron los tratamientos correspondientes según el diseño experimental. A continuación, para obtener el extracto proteico, se eliminó el medio de cultivo de las placas y se lavaron dos veces con PBS (tampón fosfato salino) en frío. Seguidamente, las células se lisaron directamente en frío sobre la placa en presencia de 200 µl de un tampón de lisis compuesto por 20 mM de Tris pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de Na₂EDTA, 1 mM de EGTA (ácido aminopolicarboxílico) 1% de Triton™ X-100 (v/v), 2,5 mM de pirofosfato sódico, 1 mM de β-glicerofosfato, 1 mM de Na₃VO₄ y 1 µg/ml de leupeptina (*Cell Signaling Technology*), suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa (*ThermoFisher Scientific*). El lisado obtenido se mantuvo en frío y se sometió a seis ciclos de sonicación de 5 segundos de ultrasonidos, intercalados por 15 segundos de parada, empleando un sonicador Branson SLPe. A continuación, el homogenado se centrifugó a 15.000 rpm y 4°C durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante transfiriéndose a un tubo nuevo para descartar el pellet de restos celulares que quedó en el fondo. Para asegurarnos que la misma cantidad de proteína era cargada durante el ensayo de *Western Blot*, la concentración de proteínas de los sobrenadantes se determinó con ayuda del kit colorimétrico *Pierce BCA Protein Assay (Fisher Scientific)* y midiendo la absorbancia a 562 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en una recta patrón de albúmina sérica bovina (BSA; Roche) de rango 0,01 mg/ml-2 mg/ml. Todos los extractos proteicos se guardaron a -80°C.

3.2. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA

En condiciones desnaturalizantes, las proteínas se pueden separar según su tamaño en geles de acrilamida. Dado que la migración de las proteínas con similares pesos moleculares puede variar según las diferencias en su estructura secundaria, terciaria o cuaternaria, se utilizó dodecil-sulfato sódico (SDS) para reducir las proteínas a su estructura primaria teniendo una carga negativa prácticamente uniforme a lo largo de todo el polipéptido. El voltaje aplicado durante la electroforesis permite la migración de los aniones y

las proteínas se separan por su peso molecular. Para ello, se mezclaron entre 12 y 15 μg de proteína con el volumen adecuado de tampón de carga (Tris 50 mM pH 6,8, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v), 0,005% azul de bromofenol (p/v)) y se incubaron en una placa calefactora a 98°C durante 5 minutos. El volumen final de cada una de las muestras depende del número de pocillos y el grosor del gel que se emplee en la electroforesis.

Para la mayoría de las electroforesis que se llevaron a cabo, se emplearon geles hechos a mano, de manera que dependiendo del tamaño de las proteínas que se pretendían determinar, se utilizaban diferentes concentraciones de acrilamida. La Tabla 7 recoge los diferentes volúmenes de reactivos para la preparación de un gel de 0,75 mm de grosor:

Tabla 7: Composición geles electroforesis SDS-PAGE

VOLÚMENES (ML) GEL "RESOLVING" (SEPARADOR)					
Tamaño de proteínas a separar (kDa)	25-200	15-100	10-70	12-45	4-40
Concentración acrilamida	8%	10%	12%	15%	20%
H ₂ O _d	1,345	1,095	0,845	0,47	0
Acrilamida-Bisacrilamida (29:1)	1	1,25	1,5	1,875	2,5
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
SDS 10% (peso/volumen)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
APS 10% (peso/volumen)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005

VOLÚMENES (ML) GEL "STACKING" (CONCENTRADOR)	
CONCENTRACIÓN ACRILAMIDA	5%
H ₂ O _d	3,791
Acrilamida-Bisacrilamida (29:1)	0,625
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,5
SDS 10% (peso/volumen)	0,04
APS 10% (peso/volumen)	0,04
TEMED	0,004

Abreviaturas: SDS: dodecil sulfato sódico; APS: persulfato de amonio; TEMED: tetrametiletilendiamina.

Una vez desnaturalizadas las muestras y los geles preparados, se cargaron y se sometieron a electroforesis utilizando el sistema *Mini-Protean*® 3 *electroforesis Cell* (Bio-Rad) en presencia de un tampón compuesto por Tris

25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0,1% (p/v) de pH 8,3. Se utilizó un marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Standards Dual Color, Bio-Rad*) que facilita la identificación de la banda. Las proteínas del marcador tienen un peso molecular en kilodaltons (kDa) conocido que permite comparar el peso de las proteínas de la muestra. El voltaje empleado inicialmente fue de 70 voltios (V) y 2,5 amperios hasta que las muestras alcanzaron el gel separador, momento en el que los valores se incrementaron hasta 140 V, manteniendo el mismo amperaje.

Una vez concluida la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfirieron mediante un sistema de transferencia húmeda a membranas de nitrocelulosa de 0,2 μm (Amserham) con el sistema *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-rad) en presencia de un tampón de transferencia compuesto por Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% v/v, pH 8,3, con las siguientes condiciones: 100 V y 2,5 A constantes, durante 90 minutos a 4°C.

3.3. INMUNODETECCIÓN

Las membranas se incubaron con una solución de bloqueo de BSA al 5% en TBS-Tween (Tris-Cl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) durante 45 minutos en agitación suave a temperatura ambiente, para bloquear las uniones inespecíficas presentes en ellas. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween y se incubaron con los anticuerpos primarios específicos para cada una de las proteínas diluidos en BSA al 5% en TBS-Tween durante toda la noche a 4°C. En la Tabla 8, se detallan los distintos anticuerpos empleados.

Tabla 8: Listado de los diferentes anticuerpos primarios y secundarios empleados en el *Western Blot*

DIANA	PM (kDA)	ORIGEN	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
α -SMA	42	Ratón	1:1000	Sigma	A5228
NNMT	28	Conejo	1:1000	CST	PA059180
Vimentina	57	Conejo	1:1000	CST	57415
Vimentina	57	Ratón	1:1000	Sigma	V6630L
FAP	95	Conejo	1:1000	Abcam	Ab207178
CDH2	140	Conejo	1:1000	CST	131165
FN1	300	Ratón	1:1000	Invitrogen	MA5-11981
COX2	74	Conejo	1:1000	CST	4842
CDH1	135	Conejo	1:1000	CST	3195S
SNAI1	29	Conejo	1:1000	CST	3879S
β -Actina	45	Conejo	1:1000	CST	4967S
Anti Conejo IgG	-	-	1:1000	CST	7076P2
Anti Ratón IgG	-	-	1:1000	CST	7074P2

Seguidamente, tras lavar tres veces durante 5 minutos con TBS-Tween, las membranas se incubaron durante 1,5 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (mostrado en la Tabla 8) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). El anticuerpo secundario permite una amplificación del anticuerpo primario, y favorece la detección de la proteína.

Para finalizar, después de eliminar el exceso del anticuerpo secundario mediante 3 lavados de 5 minutos en agitación fuerte con TBS-Tween, las membranas se incubaron con el reactivo comercial ECL (Pierce, Thermo Scientific), que permite la detección por quimioluminiscencia de los anticuerpos conjugados con peroxidasa. El luminol que se encuentra en el ECL, en presencia de peróxido de hidrógeno, es capaz de transformarse a un dianión excitado el cual emite luz al volver al estado fundamental. Para captar dicha luz se empleó una cámara de quimioluminiscencia mediante el sistema *ChemiDoc™ XRS+* de Bio-Rad. A continuación, las señales obtenidas se analizaron mediante densitometría empleando el software *Image Lab 2.0.1* (BioRad). Los resultados se analizaron teniendo en cuenta la proteína constitutiva β -actina.

4. INMUNOFLUORESCENCIA

Las técnicas inmunocitoquímicas son de gran utilidad para determinar la localización de los antígenos gracias el uso de anticuerpos de alta sensibilidad y especificidad.

Para realizar las inmunofluorescencias que en este trabajo se presentan, se siguió el siguiente protocolo. Se sembraron 75.000 células sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro inseridos en placa de 24 pocillos. De acuerdo con el diseño experimental y habiendo alcanzado el 80% de confluencia, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras tres lavados rápidos con DPBS, las células fijadas se permeabilizaron durante 2 minutos con Tritón X-100 al 0,2% y a continuación se bloquearon las uniones inespecíficas con un tampón de bloqueo (SBF al 5%, 1% de BSA y 0,3% de Tritón X-100, 30 minutos). Con esto se evita que los anticuerpos a los que van a ser sometidas posteriormente se unan de manera inespecífica y den una señal errónea que pueda enmascarar o modificar el resultado final. Dependiendo del anticuerpo primario empleado, los tiempos de incubación y diluciones fueron diferentes, hecho que se constató experimentalmente con una batería de pruebas de concentraciones y tiempos de incubación específicos para la tinción de los fibroblastos con cada uno de ellos (Tabla 9). Las células se incubaron con los anticuerpos primarios en cámara húmeda a 4°C con un tampón compuesto por 1% de BSA y 0.3% de Tritón X-100 en DPBS. Tras las diferentes incubaciones, se lavaron las muestras con un tampón (0,25% BSA y 0,1 Triton X-100). Seguidamente y empleando el mismo tampón, se incubaron las células durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad con una dilución 1:1000 del correspondiente anticuerpo secundario unido al fluorocromo. (véase Tabla 9). Tras tres lavados de 5 minutos con DPBS, para el marcaje de los núcleos, las muestras se incubaron durante 5 minutos con Hoechst 33342 (Molecular Probes®, Life Technologies). Para finalizar, el montaje de los cubreobjetos se realizó con medio de montaje (Prolong Gold Antifade Mountant, ThermoFisher Scientific) y se procedió a la visualización de las muestras en un microscopio de fluorescencia DMI6000 B (Leica Microsystems, Germany) a x200 aumentos. Para realizar los contajes celulares, se fotografiaron de manera aleatoria de 10 a 12 campos por pocillo y las imágenes fueron analizadas con el programa *Image J*.

Tabla 9: Listado de los diferentes anticuerpos primarios y secundarios empleados en inmunofluorescencia

DIANA	ORIGEN	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
α -SMA	Ratón	1:1000	Sigma	A5228
NNMT	Conejo	1:75	CST	PA059180
Vimentina	Ratón	1:1000	Sigma	V6630L
Anti-Ratón Alexa Fluor 488	Burro	1:1000	Abcam	A21202
Anti-Conejo Alexa Fluor 594	Burro	1:1000	Abcam	A21207

5. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TGF- β 1

Para la determinación de los niveles de TGF- β 1 extracelular en las diferentes poblaciones de fibroblastos empleamos el kit *Quantikine Elisa Human TGF- β 1 Immunoassay* de R&D Systems. Más concretamente, los ensayos ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas) son una técnica de inmunoensayo donde un anticuerpo primario que se une específicamente a un antígeno (aquel que se pretende cuantificar) es reconocido por un anticuerpo secundario ligado a una enzima capaz de producir un producto que puede detectarse por espectrofotometría.

Se sembraron $0,2 \times 10^6$ células en placas de 6 pocillos con medio DMEM completo por triplicado y tras 24 horas se realizó un cambio de medio para eliminar el SBF (BSA 4% en DMEM libre). La razón de la sustitución del SBF por BSA se debe a que el suero es rico en TGF- β 1 y podría interferir en los resultados finales del experimento. Después de 48 horas del cambio de medio, se recogió el sobrenadante, se congeló a -80°C y se lisaron, extrajeron y determinaron las concentraciones de los extractos proteicos de cada uno de los pocillos, para poder relativizar la cantidad de TGF- β 1 a la cantidad de proteínas.

Una vez recogidas todas las muestras se procedió a activar el TGF- β 1 latente para que fuera inmunorreactivo mediante la adición de 20 μl de HCl 1N y la neutralización con 20 μl de NaOH 1,2 N/HEPES 0,5 M. A continuación, los volúmenes estandarizados en el protocolo del kit se añadieron a la placa que contiene el anticuerpo frente TGF- β 1. Tras la incubación se añadió el segundo anticuerpo conjugado con la enzima que cambió de color de azul a amarillo,

que podía cuantificarse con una lectura de absorbancia de 450nm con una corrección de longitud de onda a 540 nm con el *Multiskan spectrum* (Thermo Scientific). Finalmente se realizaron los cálculos necesarios para ajustar las diluciones empleadas y los valores se extrapolaron en la recta patrón.

6. AISLAMIENTO DE RNA Y RT-QPCR

6.1. EXTRACCIÓN DE RNA

Para la extracción de RNA se sembraron $0,2 \times 10^6$ células en placas de 6 cm y se empleó el *EZNA TOTAL RNA PURIFICATION KIT* (omega, VWR). El método de extracción de este kit se basa en la unión selectiva de los RNAs de tamaño superior a 200 bases a una membrana de sílice.

Después de dos lavados en frío con PBS, las células se lisaron con tampón de lisis TRK con un 20% de β -mercaptoetanol. A continuación, se añadió el mismo volumen de etanol al 70% en agua libre de RNAsas para favorecer las condiciones de unión del RNA a la columna *HiBind® Mini Column*. Los siguientes pasos consistieron en una serie de lavados y centrifugaciones a través de la columna, con la intención de eliminar los restos celulares no deseados y permitir la unión del RNA a la membrana presente en la columna de extracción. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo nuevo para eluir el RNA en 30 μ L de agua libre de RNAsas y se procedió a su cuantificación utilizando un espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific). Se midió su absorbancia a 260 nm y su pureza con la ratio A_{260}/A_{280} . Se consideró que el RNA era puro cuando la ratio mostraba un valor cercano a 2. Todo el proceso de extracción de RNA se llevó a cabo con material libre de RNAsas y DNAsas y a 4°C para evitar la degradación de este.

6.2. RETROTRANSCRIPCIÓN

La retrotranscripción es el proceso de transcripción inversa para convertir el RNA a cDNA. Se llevó a cabo mediante el uso del *RNA-PrimeScript RT Reagent Kit*, (Takara). En cada reacción de transcripción realizada se emplearon 500 ng de RNA en un volumen final de 20 μ L, de modo que el cDNA obtenido tenía una concentración final de 25 ng/ μ L. El *mix* de reacción empleado para cada una de las reacciones se especifica en la Tabla 10.

Tabla 10: Volúmenes de los reactivos empleados en la retrotranscripción.

RNA-PRIMESCRIPT RT REAGENT KIT, (TAKARA)	
REACTIVO	VOLUMEN (μL)
<i>5X Prime Script Buffer</i> (Tubo 1)	4
<i>PrimeScript Enzyme mix I</i> (Tubo 2)	1
<i>Oligo dT primer</i> (50 μM) (Tubo 3)	1
<i>Random 6 mers</i> (100 μM) (Tubo 4)	1
Agua libre RNAsas	8
RNA 100 ng/μl	5
Volumen total del cóctel	20

El proceso se realizó en un termociclador con función gradiente *BK-EO/BK-TC* (Biobase) siguiendo los siguientes pasos:

- 37°C durante 15 minutos para el desarrollo de la transcripción reversa.
- 85°C durante 5 segundos para la inactivación de la transcriptasa inversa con tratamiento de choque de calor.
- 4°C para la estabilización definitiva del cDNA.

Una vez finalizada la retrotranscripción, las muestras se mantuvieron a 4°C si iban a ser utilizadas en las próximas 24 horas o bien a -20°C para guardarlas a largo plazo.

6.3. DISEÑO, PREPARACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LOS *PRIMERS*

Para el diseño de los *primers* se empleó la base de datos *PubMed*, donde tras seleccionar la especie se accedió al número de identificación del *ENSEMBL*, que es específico para cada gen. A continuación, se buscó una secuencia consenso (CCDS) para estar seguros de que los *primers* diseñados hibridarían y amplificarían una región de nuestro interés. Tras obtener la

secuencia exónica del gen, se introdujo en el programa gratuito *Primer 3* y se procedió a la elección de los *primers* con una secuencia óptima. Para ello, se establecieron unas pautas para la generación de estos: rango de tamaño entre 150 y 250 pares de bases, temperatura fundente o *melting* (T_m) entre 58.5 y 61°C y tamaño del *primer* entre 18 y 24 pares de bases. A la hora de seleccionar los *primers forward* y *reverse* era conveniente considerar lo siguiente: cada uno de los *primers* debe hibridar entre dos exones diferentes o bien cada uno de ellos debe encontrarse en exones diferentes, separados por una secuencia intrónica, lo más grande posible. Además, es conveniente que la composición en GC para ambos *primers* sea del 50%. Se empleó el *Revers complement* para poder comprobar la localización de hibridación del *primer reverse*.

Tras la obtención de las secuencias, había que comprobar que no hibridaban en otras localizaciones del ADN genómico y para ello se empleó la herramienta informática *BLAST*.

Una vez resuspendidos los *primers* en el volumen de agua libre de RNAsas que se indica en la ficha técnica, para preparar el *Primer mix* se mezclaron 4,5 µl del *primer forward*, 4,5 µl del *primer reverse* y 291 µl de agua libre de RNAsas para obtener una concentración final de 1,5 µM de cada uno de los *primers*.

A continuación, se llevó a cabo la optimización de los *primers*. Para ello, se preparó una curva de concentraciones para estudiar la eficiencia de la reacción de PCR. Con este fin, se efectuaron 4 reacciones de amplificación, por triplicado, por cada pareja de *primers*. Cada una de estas reacciones se correspondían con una concentración diferente de cDNA de una misma muestra: 1, 1:4, 1:16, 1:32.

Al acabar la amplificación, se obtuvo el *Ct* (número de ciclos) de cada una de las reacciones realizadas a diferentes concentraciones y se calculó la recta de regresión frente al logaritmo de la concentración. La pendiente (*m*) de la recta obtenida se sustituyó en la siguiente fórmula para obtener la eficiencia de esa pareja de *primers*:

$$\text{EFICIENCIA} = 10^{(-1/m)}$$

Las secuencias de parejas de *primers* se diseñaron, optimizaron y emplearon en este trabajo se recogen en la Tabla 11.

Tabla 11: Listado de los diferentes genes empleados con su pareja de primers diseñados y optimizados

GEN	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERS
ACTA2	ACAACCTGGCATCGTGCTG	GAAGGAATAGCCACGCTCAG
NNMT	ATTCTGCCTAGACGGTGTGAA	AGGCCTCTGGCTCTTTCTTC
β-ACTINA	GACCCAGATCATGTTTGAGACC	AGGGCATACCCCTCGTAGAT
COL1A1	CTGGCCTCGGAGGAACTTT	GCACCATCATTTCCACGAGC
COL1A2	CTCCTGGGCTGAGAGGTAGT	AGGACCTTCTTTTCCAGCGG
FN1	GAGAGTAAACCTGAAGCTGAAGAGA	GCGATGGTACAGCTTATTCT CC
CDKN2A (p16)	GAGGGCTTCCTGGACACG	AATCGGGGATGTCTGAGG
CDKN1A (p21)	AGAACCCATGCGGCAGCAAG	TGGATGCAGCCCGCCATTAG

6.4. PCR CUANTITATIVA

Con el cDNA y los *primers* obtenidos se llevó a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real con el uso del kit *TB Green PrimeScript™ RT-PCR Kit* (Takara) y el termociclador *iQTM5 Multicolor Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad).

La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de fondo oscuro (Biorad). En la Tabla 12 se especifica la dilución de trabajo empleada, así como el volumen de cDNA de 25 ng/μl por cada pocillo.

Tabla 12: Volúmenes de los reactivos de la solución de trabajo empleada en la PCR cuantitativa

REACTIVOS		VOLUMEN (μL) /POCILLO
DILUCIÓN DE TRABAJO (9 μL)	SYBR	6 μL
	Mix <i>primer</i>	1.2 μL
	H ₂ O libre RNAsas	1.8 μL
cDNA (25 ng/ μL)		3 μL

El protocolo que se empleó fue el siguiente:

- 95°C durante 30 segundos para la desnaturalización del cDNA.
- 40 ciclos con los siguientes pasos:
 - o 95°C durante 5 segundos
 - o 60°C durante 30 segundos

Después de que la reacción se completó, se comprobaron la amplificación y las curvas de *melting*. Los resultados se calcularon en función del método $\Delta\Delta\text{Ct}$ y se expresaron en expresión relativa a las muestras control ($t=0\text{h}$). Los resultados obtenidos se normalizaron respecto a la expresión del gen constitutivo o de referencia, β -actina en nuestro caso.

7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NNMT

La determinación de la actividad NNMT se basa en la medida de 1-metilquinolina (1-MQ) mediante un método fluorimétrico. La 1-metilquinolina se forma por la incorporación de un grupo metilo por parte de la quinolina. Este grupo metilo es liberado por la S-adenosilmetionina al transformarse a S-adenosilhomocisteína, en una reacción catalizada por la NNMT. La concentración de 1-metilquinolina será proporcional a la actividad de nuestra proteína de interés.

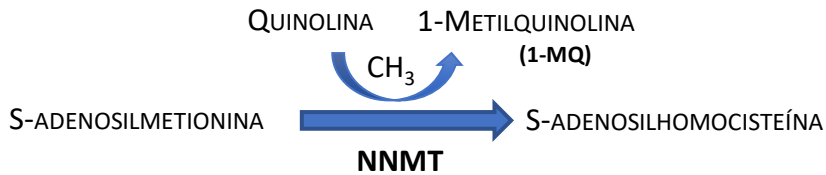


Figura 21: Esquema de la reacción enzimática catalizada por NNMT empleada para la determinación de su actividad. NNMT cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosilmetionina a la quinolina, que se convierte en 1-metilquinolina y, a su vez, se produce s-adenosilhomocisteína. A continuación, se mide la absorbancia de la 1-MQ a 522 nm con el espectrofotómetro.

Para la determinación de la actividad NNMT en un cultivo celular, se sembraron 3×10^6 células en un frasco de 150 cm² y cuando se alcanzó el 90% de confluencia se tripsinizaron las células y se procedió a su conteo. Se precisaban de 10×10^6 células de cada paciente para llevar a cabo este procedimiento, por lo que se ajustó el volumen de suspensión celular, se centrifugaron a 1500 rpm, 25°C durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante cuidadosamente, para obtener el pellet de células.

Cada uno de los pellets de células obtenidos se resuspendió en 1,1 ml de tampón de lisis. La suspensión celular se sometió a 6 ciclos de sonicación de 5 segundos de ultrasonidos, intercalados por 15 segundos de parada, empleando un sonicador *Branson SLPe*. A continuación, el homogenado se centrifugó a 15000 rpm y 4°C durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante transfiriéndose a un tubo nuevo para descartar el pellet de restos celulares que quedó en el fondo. Las muestras se mantuvieron a 4°C mientras se preparaban el resto de los reactivos necesarios.

Para llevar a cabo la determinación se preparó una disolución de trabajo que estaba compuesta por:

- S-adenosilhomocisteína (SAM):
 - o Solución *Stock* (50 mM): 0,019922 g SAM (Sigma) + 1 ml tampón de lisis.
 - o Disolución de SAM por pocillo. La concentración final de SAM por pocillo es de 120 μM, pero hay que tener en cuenta que la solución de trabajo se diluirá 4 veces por pocillo con el volumen de la muestra, así que la concentración de SAM que habrá que preparar es de

480 μM (9,6 μl de la disolución de stock de SAM en 1 ml de tampón de lisis).

- Quinolina:
 - o Solución *stock* (50 mM): 5,91 μl de quinolina (Sigma) y 494 μl de etanol 100%.
 - o Disolución de quinolina por pocillo. La concentración final de quinolina por pocillo es de 400 μM , pero hay que tener en cuenta que la solución de trabajo se diluirá 4 veces por pocillo con el volumen de la muestra, así que la concentración de quinolina que habrá que preparar es de 1,6 mM (32 μl de la disolución de *stock* de quinolina en 968 μl de tampón de lisis).

Así, la solución de trabajo para 1ml de volumen final estará compuesta por:

- 9,6 μl de solución *stock* de SAM (50 mM)
- 32 μl de solución *stock* de quinolina (50 mM)
- 958,4 μl de tampón de lisis NNMT

También se preparó una recta patrón de 1-metilquinolina de rango de concentraciones entre 31,25 nM a 1000 nM en diluciones seriadas 1:2 y un total de 6 concentraciones.

Una vez preparados todos los reactivos y las muestras, se procedió a cargar la placa de fondo plano, negra y opaca, teniendo en cuenta que, para cada blanco, punto de la recta patrón o muestra le correspondían un total de 3 réplicas. La absorbancia se leyó a 522 nm empleando un *Fluoreskan* (Ascent FL, Thermo Labsystems) y los valores de absorbancia obtenidos para cada muestra se interpolaron en la recta patrón de 1-metilquinolina y se relativizaron a la cantidad de proteína existente en cada una de las muestras.

8. KIT DE DETECCIÓN HISTOQUÍMICA DE CÉLULAS SENESCENTES

Para la detección de fibroblastos senescentes, se empleó el kit *Senescence Cells Histochemical Staining Kit* (Sigma, CS0030). Este kit contiene todos los reactivos necesarios para identificar células senescentes usando un procedimiento de tinción muy rápido. El ensayo está basado en la tinción inmunohistoquímica de la actividad β -galactosidasa a pH 6. Bajo estas condiciones, la actividad β -galactosidasa es fácilmente detectable en células senescentes, pero indetectable en células quiescentes, inmortales o células tumorales.

Para la detección, se sembraron $0,5 \times 10^6$ células en placas de 6 pocillos con medio DMEM completo por triplicado. A las 24 horas, cuando las células habían alcanzado el 80% de confluencia, se lavaron tres veces con PBS y se fijaron durante 6-7 minutos a temperatura ambiente con la solución de fijación (20% formaldehído, 2% glutaraldehído, 70,4 mM Na_2HPO_4 , 14,7 mM KH_2PO_4 , 1,37 M NaCl y 26,8 mM KCl). Durante el proceso de fijación, se preparó la solución de tinción siguiendo las instrucciones de preparación del fabricante. A continuación, se lavaron tres veces las células con PBS y se incubaron con la solución de tinción durante toda la noche a 37°C y sin CO_2 , cubriendo la placa para evitar que se secan los pocillos. Es importante tener en cuenta que la atmósfera de incubación sea sin CO_2 porque la tinción de las células senescentes es pH dependiente. Tras la incubación, las células se observaron bajo el microscopio, de modo que las células senescentes habían quedado teñidas de color azul por la detección de la actividad de la β -galactosidasa.

Para poder almacenar las células teñidas a largo plazo, se sustituyó la solución de tinción por una solución de glicerol al 70% y se guardó a 4°C .

9. MEDIDA DE LA CAPACIDAD DE CIERRE DE UNA HERIDA REALIZADA *IN VITRO* POR CULTIVOS DE FIBROBLASTOS O MIOFIBROBLASTOS. *SCRATCH ASSAY*

Los estudios de migración celular son ensayos en los que, al generar una herida en la monocapa, las células en el nuevo borde van a migrar hacia la apertura para cerrarla hasta llegar a formar nuevos contactos célula-célula.

Para ello, se sembraron cultivos de fibroblastos y miofibroblastos procedentes del grupo control y FPI a razón de 200.000 células por pocillo en placa de 6 pocillos. Con la finalidad de obtener el mismo campo durante la adquisición de las imágenes, se delimitó la zona antes de sembrar realizando unas marcas en la placa de una distancia de 1,4 cm en la parte trasera de la misma. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 85-90%, se les cambió el medio a DMEM con un 1% de FBS con la finalidad de sincronizar sus ciclos celulares. A las 24 horas, se les realizó un corte *in vitro* con una punta de pipeta estéril de 1-10 μ l lo más recto y rápido posible. Seguidamente, se realizaron lavados con PBS 1x estéril para eliminar los restos celulares.

A continuación, se les añadió medio DMEM completado con 1% de FBS, en presencia y ausencia de mitomicina C (1,5 μ g/ml), pues se trata de un potente citoestático que evitaría la proliferación de los fibroblastos y permitiría evaluar de manera más objetiva la migración celular, dejando de lado la proliferación celular.

Se tomaron fotos de campo claro de la herida realizada en el cultivo a tiempo inicial (justo después de realizar la herida, tiempo 0h), y después de 24 h y 48 h en un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100) a 50x. El área cerrada a lo largo del tiempo fue medida mediante el programa *ImageJ*, calculando la diferencia del área inicial de la herida y el área entre los dos márgenes de la herida después de 24 h y 48 h.

10. ESTUDIOS DE TRANSDUCCIÓN GÉNICA CON CONSTRUCCIONES LENTIVIRALES

Los vectores lentivirales son sistemas capaces de introducir genes o ARN de interferencia (ARNi) en líneas celulares con gran eficiencia. Estos vectores tienen la capacidad de unirse a las células diana a través de proteínas de la envuelta permitiendo la liberación del ARN que contiene la construcción de interés. Gracias a la actuación de una transcriptasa reversa, este ARN es retro-transcrito a ADN complementario. El complejo entra en el núcleo de la célula y el ADN de interés es integrado en el genoma de la célula diana. Esta integración, por tanto, será de gran estabilidad y será capaz de pasar a las células descendientes en cada división celular. En este trabajo, se emplearon estos vehículos para inducir la expresión de la proteína NNMT y reprimirla mediante secuencias de shRNA.

El protocolo de construcción está constituido por varios pasos divididos en dos fases: producción de partículas virales y transducción viral.

10.1. PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES

El sistema de construcciones lentivirales que se empleó fue de segunda generación. En primer lugar, el gen de la envoltura (*env*) viene codificado en un plásmido VSV-G y el gen de empaquetamiento viene codificado en un plásmido pCMV-dR8.2 dvpr. En este sistema, las partículas virales son producidas por la cotransfección de tres plásmidos en las células productoras, de modo que, a estos dos plásmidos, faltaría añadir el plásmido diana para cada una de las construcciones, ya sea de sobreexpresión o silenciamiento.

Con esta finalidad, los reactivos de la Tabla 13 se combinaron en un microtubo estéril de polipropileno y se incubaron durante 20-30 minutos:

Tabla 13: Reactivos empleados para la formación de partículas lentivirales

VALORES PARA PLACA PETRI 6 CM	
Plásmido Diana pLKO.1	4 µg
Plásmido pCMV-dR8.2 dvpr	4 µg
Plásmido VSV-G	0,5 µg
TransIT-LT1	24 µl
Optimem	Hasta 200 µl

Las características de la secuencia pLKO.1 de silenciamiento de NNMT empleada en nuestros experimentos se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14: Características de la secuencia pLKO.1 de silenciamiento de NNMT.

NOMBRE DEL PLÁSMIDO	ID CLON	SECUENCIA DIANA	ORIGEN
NNMT (sh)	TRCN0000035227	GTGACCTATGTGTGTGATCTT	Sigma Aldrich

Se aprovechó la incubación de la mezcla de los diferentes reactivos para tripsinizar células HEK 293 LTV, se resuspendieron en medio de transfección (DMEM+10% sin antibióticos) y se sembraron 1×10^6 células en placas de alta adherencia de 60 cm² tratadas con colágeno I *BIOCOAT Cell Environments* (Beckton y Dickinson). Es importante que el medio de transfección no contenga antibióticos porque podría comprometer posteriormente la supervivencia de las partículas víricas que han incorporado el plásmido bacteriano. Al terminar la incubación, se añadió la mezcla gota a gota sobre las células productoras sembradas en la placa y se movió ligeramente para facilitar su distribución homogénea.

Tras 24 horas post transfección se cambió el medio por 3 ml de un medio de producción viral (DMEM, 10% SBF y BSA al 1%). Después de 48 horas, se recogió el sobrenadante en un tubo de centrifuga de 15 ml, se guardó a 4°C y se añadió a la placa 3 ml de medio fresco de producción viral. Tras 24 horas, se recogió el sobrenadante de nuevo y se añadió al que se había

recogido el día anterior. A continuación, se congeló la placa con nitrógeno líquido y se recogieron los restos celulares (*debris*) que pudiera haber quedado en la placa con medio del que se había recogido previamente. El medio recogido se centrifugó a 400 g durante 3 minutos y se filtró empleando un filtro estéril de 0,45 µm para eliminar restos de células productoras. Se guardó a 4° C si iba a ser utilizado durante la semana siguiente o a -80° C para ser almacenado a largo plazo. Durante todo este procedimiento hay que emplear una dilución de hipoclorito sódico al 10% para esterilizar al máximo todo aquel material que haya entrado en contacto con las partículas víricas.

10.1.1. PROTOCOLO DE CLONAJE CON EL SISTEMA GATEWAY

El sistema *Gateway* (ThermoFisher) es un sistema de dos pasos para insertar el gen de interés dentro de un vector para la infección de las células en cuestión. Primero se clona dentro de un vector de entrada y luego, éste se subclona dentro del vector final de destino. En el primer paso, el gen de interés (NNMT, DNASU, repositorio de plásmidos) está flanqueado de unas secuencias de clonaje (*attB*) y se hace reaccionar durante 16h con un vector donante (pDONR221) con la enzima BP Clonasa II (reacción BP). El producto de esta reacción se transforma en bacterias *E.coli OneShotStab13* (Invitrogen). Al día siguiente se pican colonias para que crezcan y se pueda extraer por lo menos 1 µg de ADN. Después de comprobar, mediante los enzimas de restricción adecuados, que la secuencia clonada no tiene fallos, se lleva a cabo la reacción LR. En este segundo paso el producto de la reacción BP (el nombre completo sería pENTR221-NNMT) se transfiere al vector de destino (pLX304 que incluye una etiqueta V5 C-terminal para mejor control de la infección). Del mismo modo, el producto LR se transforma en bacterias y tras asegurar que el clon está correctamente, se puede usar en la transducción. El nombre completo del vector de expresión es: pEXP304-NNMT/V5 (Figura 22).

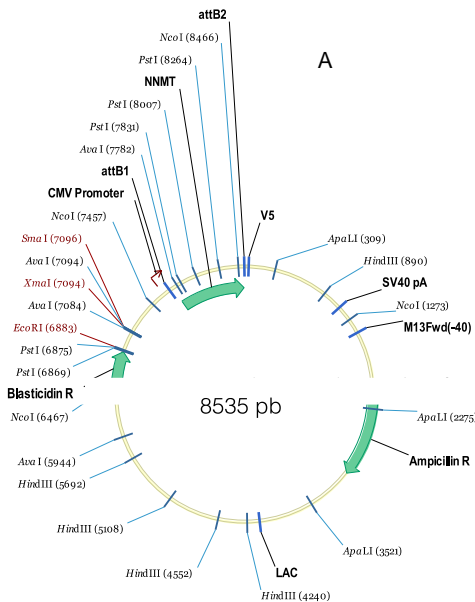


Figura 22: Esquema del plásmido de expresión pEXP304 NNMT/V5

10.2. TRANSDUCCIÓN VIRAL O INFECCIÓN DE LAS CÉLULAS DIANA

Las células diana, es decir, aquellas en las que se deseaba silenciar o sobreexpresar un determinado gen, fueron sometidas a dos rondas consecutivas de infección viral. Con la finalidad de favorecer la infección, se añadió polibreno al medio recogido previamente con las partículas víricas a una concentración final de 10 µg/ml y se añadió al cultivo de las células diana en un volumen adecuado al formato donde estas estaban sembradas. Al día siguiente, se retiró y añadió medio con nuevos virus. Tras 24 horas, se reemplazó el medio vírico por medio completo con el antibiótico de selección a una concentración adecuada al tipo de celular. Normalmente la concentración del antibiótico de selección es creciente con el tiempo hasta que se produce una selección final de las células (para los fibroblastos las concentraciones fueron hasta 5 µg/ml para la puomicina y 10 µg/ml para la blasticidina). La selección de las células es completa cuando el cultivo de células control (sin infectar y por tanto sin gen de resistencia) que han sido tratadas con la misma

concentración de antibiótico que las células infectadas, mueren totalmente y las células infectadas crecen con normalidad. Con la intención de confirmar si se había realizado la infección correctamente, se generó un extracto proteico de cada una de las muestras y se evaluaron los niveles de proteínas por *western blot*.

11. HISTOLOGÍA: TINCIONES E INMUNOHISTOQUÍMICA

11.1. TINCIÓN DE EOSINA/ HEMATOXILINA

La tinción hematoxilina-eosina es uno de los métodos más populares de tinción utilizado en histología y medicina diagnóstica. El método supone la aplicación de la tinción de hematoxilina que, por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; por otro lado, la eosina tiñe componentes básicos (acidófilas) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma. El protocolo se inicia con el desparafinado y la rehidratación de la muestra. A continuación, tras lavarse con agua para eliminar los excesos de alcohol, se sumerge en hematoxilina durante 10 minutos, se lava en agua de nuevo para eliminar posibles restos y se pasa rápidamente por alcohol ácido. Tras lavarse de nuevo, se sumerge 30 segundos en eosina. Por último, la muestra se deshidrata pasándola por soluciones crecientes de etanol y se procede al montaje final. Al visualizar las tinciones en el microscopio se observan los siguientes elementos: el colágeno en rosa pálido, el músculo en rosa fuerte, la queratina en rojo intenso, el citoplasma rosado, los núcleos color azul oscuro o púrpura y los eritrocitos color cereza.

11.2. TINCIÓN DEL TRICRÓMICO DE MASSON

La tinción tricrómica de Masson es una técnica que permite visualizar con claridad las fibras de colágeno de tipo I que forman fibras gruesas o haces, así como las fibras reticulares en menor intensidad. Se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágeno. La composición de las soluciones de trabajo que se emplean se presenta a continuación.

➤ Solución de trabajo A:

Solución 1:

- Fucsina ácida: 0,33 g
- Ácido acético: 0,33 ml
- Agua destilada: 33 ml

Solución 2:

- Ponceau de Xilidine: 0,66 g
- Ácido acético: 0,66 ml
- Agua destilada: 33 ml

➤ Solución de trabajo B:

- Ácido Fosfomolibdico: 2,5 g
- Ácido Fosofotúngtico: 2,5 g
- Agua destilada: 100 ml

➤ Solución de trabajo C:

- Azul de anilina: 2,5 g
- Ácido Acético: 2 ml
- Agua destilada: 98 ml

Una vez preparadas las soluciones de trabajo, hay que desparafinar e hidratar los cortes de tejido parafinados. El primer paso consiste en incubar las preparaciones con hematoxilina durante 10 minutos, tras realizar un lavado con agua destilada, la muestra se decolora con HCL al 4% en un pase rápido. A continuación, con ayuda de agua corriente se da coloración azul a la muestra. Los pasos siguientes consisten en incubaciones seriadas con la Solución de trabajo A (20 minutos), la Solución de trabajo B (5 minutos) y la Solución de trabajo C (3 minutos) con lavados intercalados en agua acética al 0,5%. Para finalizar el protocolo, los cortes se lavan con agua destilada, se deshidratan con soluciones crecientes de etanol y se procede a su montaje. La visualización en el microscopio muestra los núcleos teñidos de azul oscuro; citoplasmas, queratina, fibras musculares y eritrocitos en rojo y el colágeno y la reticulina en azul.

11.3. INMUNOHISTOQUÍMICA (TINCIÓN CON DAB)

La tinción con 3,3' diaminobenzidina (DAB) permite la detección de una molécula en tejidos o células. El proceso es similar a una inmunofluorescencia, pero en este caso el anticuerpo secundario se asocia a un complejo avidina-biotina en lugar de a un fluorocromo. Así, al añadir agua oxigenada y peroxidasa se produce un precipitado marrón. A diferencia de la inmunofluorescencia, en esta técnica no se puede combinar la detección de varios antígenos, pero en este caso la señal no se desgasta. Los anticuerpos empleados en este estudio han sido: α -SMA (Dako Agilent: IS61130-2) y NNMT (Sigma PA059180). El anticuerpo secundario resultó ser una mezcla de *anti-rabbit* y *anti-mouse* de Dako Agilent.

12. ANÁLISIS METABOLÓMICOS

La metabolómica permite medir los últimos productos de la llamada "cascada ómica", generando información que no podría obtenerse de otras disciplinas "ómicas" tales como la genómica, transcriptómica o la proteómica. Los metabolitos son productos intermediarios de las reacciones bioquímicas y por lo tanto, sus niveles son resultado de la integración de diferentes procesos como la transcripción, traducción, modificaciones transcripcionales y efectos alostéricos, resultando en un efecto integrativo entre las capacidades del propio sistema y sus interacciones con el exterior. La metabolómica es el paso final de la información de la cascada, pudiendo así amplificar e integrar las señales de los niveles superiores de regulación (Villas-Bôas *et al.* 2005).

La “cascada ómica”

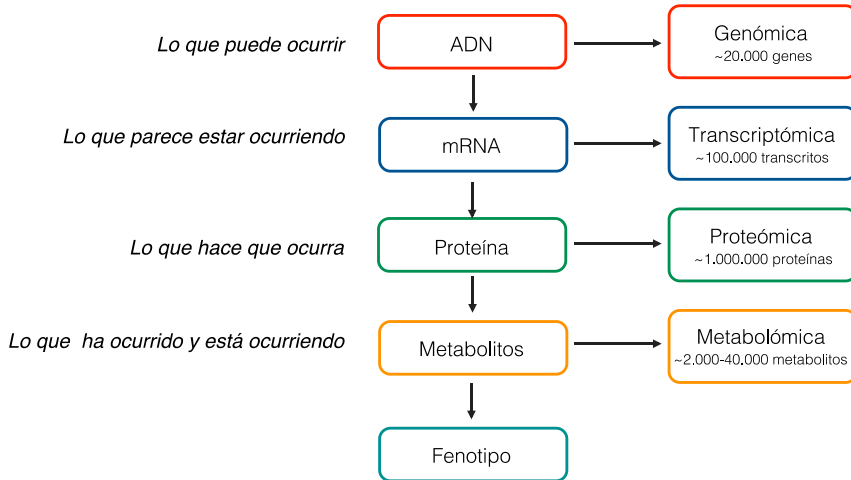


Figura 23: Representación de la “cascada ómica” junto con la estimación de los componentes de cada nivel.

En este trabajo se realizó un abordaje metabolómico dirigido a la cuantificación precisa de los metabolitos pertenecientes al ciclo de la metionina (metionina, S-adenosil-metionina –SAM-, S-adenosil-homocisteína –SAH-, homocisteína), sus vías complementarias de la síntesis de poliaminas (5-metil-tioadenosina, espermidina y espermina), además del metabolismo de la nicotinamida (incluyendo la 1-metilnicotinamida -1-MNA-) y el NAD⁺.

12.1. PROCESADO DE LA MUESTRA

El procesamiento de las muestras biológicas fue diferente dependiendo de si procedían de suero o cultivos celulares.

Más concretamente, se sembraron $0,2 \times 10^6$ células en placas de seis pocillos. A las 24 horas se les realizó un cambio de medio, con DMEM completo y a las 48 horas se recogió el medio, se lavaron las placas dos veces con PBS, se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su análisis metabolómico. Para ello, las placas se rascaron con 600 μl de NEM (N-etilendiamida) 40 nM en H_2O y se realizaron 3 ciclos de congelación-descongelación con la finalidad de asegurar una correcta lisis celular. A continuación, se tomó una alícuota de 100 μl de la lisis celular y se le añadieron

50 μl de NaOH 1.5 M para la valoración de la proteína total en el extracto por el método de *Lowry*.

Para el análisis por UPLC-MS/MS, el primer paso consistió en la eliminación de proteínas y restos celulares, para ello se tomó una alícuota del lisado de 200 μl a la que se le añadió 750 μl de $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$ (9:1) y se sometió a precipitación y centrifugación a 2000 g, 4°C durante 15 minutos. A continuación, se prepararon tres fracciones: a) fracción I, 800 μl para la detección de los analitos menos concentrados; b) fracción II, se obtuvo realizando una dilución (1/20) para detectar los analitos más concentrados; y una c) fracción III, consistió en una alícuota para generar un *pool* de todas las muestras a analizar y que sirvió de control de calidad del análisis metabolómico. Previo al secado mediante *SpeedVac* (*Savant speedvac concentrato*), se añadieron a todas las fracciones 16 μl de una mezcla de patrones internos (Tabla 15). Por último, los *pellets* se reconstituyeron en 80 μl de H_2O conteniendo un 0,5% de AF (ácido fórmico) y un 0,3% de HFBA (ácido heptafluorobutírico) que se correspondían con las condiciones iniciales de la fase móvil.

A continuación, se prepararon tres fracciones: i) fracción I, se toman 800 μl para detectar los analitos menos concentrados; ii) fracción II, obtenida tras un paso previo de dilución (1/20) para los analitos más concentrados; y una iii) fracción III, una alícuota para generar un *pool* de todas las muestras a analizar que será usado como control de calidad en el análisis metabolómico. Antes de secar, mediante un *SpeedVac*, se añade a todas las fracciones 16 μl de una mezcla de patrones internos (Tabla 15). Por último, los *pellets* se reconstituyen en 80 μl de H_2O conteniendo un 0.5% de AF (ácido fórmico) y un 0.3% de HFBA (ácido heptafluorobutírico) (condiciones iniciales de la fase móvil A). En cuanto al medio y al suero se toman 20 μl y 100 μl y se añaden 5 μl y 25 de NEM 40 mM respectivamente, siguiendo a continuación el procedimiento anterior, con la excepción de que en el medio de cultivo la fracción II se diluye 1/10 en lugar de 1/20.

Tabla 15: Lista de patrones internos para la detección de metabolitos del ciclo de la metionina y relacionados.

Compuesto	Fórmula	PM	[final] (ppb) (2x)	[final nM] (2x)
GlySar	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146.14	100	684.275352
Glud5	C ₅ H ₄ D ₅ NO ₄	152.1	100	657.462196
Metd3	C ₅ H ₆ D ₃ NO ₂ S	152.23	50	328.450371
Phed5	C ₉ H ₆ D ₅ NO ₂	170.22	20	117.495006
Theanine	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	174.2	20	114.810563
MetilGSH	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O ₆ S	321.35	50	155.59359
ValTyrVal	C ₁₉ H ₂₉ N ₃ O ₅	379.457	50	131.767236
MTAd3	C ₁₁ H ₁₂ D ₃ N ₅ O ₃ S	300.35		100
1MNAD3	C ₇ H ₅ D ₃ N ₂ O	267.08		100
3-aminobenzamida	C ₇ H ₈ N ₂ O	136.154		1000
Cistina6	C ₆ H ₆ N ₂ O ₄ S ₂ D ₆	246.34		1000

12.2. ANÁLISIS MEDIANTE UPLC-MS/MS

El análisis de la muestra se realizó mediante cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS/MS). La separación por UPLC se llevó a cabo en el sistema *Acquity UPLC* (Waters, Reino Unido) equipado con una columna *Acquity UPLC BEH* (1,8 µm, 2,1 × 100 mm; Waters). Las temperaturas de la columna y el autodispensador fueron 60°C y 4°C respectivamente. El volumen de inyección de la muestra fue 5 µl. La composición de las soluciones de elución y lavado fueron: i) solvente A: 0,1% AF más 0,3% HFBA en agua; ii) solvente B: 0,1% AF en acetonitrilo; iii) WNW y SW: agua:acetonitrilo (90:10, v/v); y iv) SNW: agua acetonitrilo (10:90, v/v). El flujo se estableció en 0,3 ml/min. Se llevó a cabo un gradiente de 7 minutos de elución del siguiente modo: durante los 2 primeros minutos la composición de elución fue 95% A y 5% de B, que se cambió linealmente hasta 5% de A y 95% de B en 1,5 minutos y se mantuvo durante 2 minutos. Finalmente, se volvieron a las condiciones iniciales y se mantuvieron durante 1 minuto para el acondicionamiento de la columna.

El análisis de MS se realizó en un espectrómetro de masas *Waters Xevo TQ-S* (Waters, Reino Unido) equipado con una fuente ESI operando en positivo (ESI+) en un modo MRM. Se aplicó una tensión capilar de 3 kV, una fuente de temperatura de 150°C y una temperatura de desolvatación de 380°C. Los flujos de desolvatación y del cono de gas fueron 800 l/h y 150 l/h respectivamente y

el gas de colisión fue 0.25 ml/min. Las transiciones, voltaje del cono y energías de colisión se determinaron con patrones (Tabla 16). Para el manejo del equipo, el procesado de datos se utilizó el programa informático MassLynx 4.1 y TargetLynx 4.1 (Waters, Reino Unido).

Tabla 16: Transiciones, voltajes del cono y energías de colisión para la determinación de los patrones.

COMPUESTO	IÓN PADRE	IÓN HIJO	CONO (V)	COLISIÓN (V)
IS_GlySar	147.0	90.1	40	10
IS_GluD5	153.1	88.1	40	15
IS_MetD3	153.1	107.1	20	10
IS_PheD5	171.1	125.1	20	10
IS_Theanine	175.1	84.0	20	15
IS_M-GSH	322.1	176.0	40	15
IS_ValTyrVal	380.2	136.1	40	20
IS_3Aminobenzamida	137.1	94.0	40	10
IS_M-NicotinamidaD3	140.1	97.0	60	15
IS_CistinaD6	247.1	155.0	40	10
IS_5MTA_D3	301.2	136.0	40	20
Nicotinamida	123.1	80.1	40	20
		78.0	40	20
1-M-Nicotinamida	137.1	94.0	60	15
		92.0	60	15
Metionina	150.1	104.1	20	10
		133.0	20	10
Cistationina	223.1	88.0	20	20
		134.0	20	15
Cisteína (NEM)	247.1	158.0	20	20
		201.0	20	10
Homocisteína (NEM)	261.0	55.8	20	15
		215.0	20	10
5- MTA	298.2	136.0	40	30
		75.0	40	20
SAH	385.1	136.0	20	20
		250.0	20	10
SAM	399.1	250.0	20	10
		136.0	20	30
GSH (NEM)	433.1	304.1	40	10
		201.0	40	15
NAD	664.0	136.0	40	30
		524.0	40	15

12.3. PROCESADO DE LOS DATOS

Debido a las altas concentraciones de 1-MNA en suero, las muestras se diluyeron 1:20. En el caso de las células, se diluyeron 1-MNA, metionina, espermidina y espermina también por sus altos niveles. Para el manejo del equipo y el procesamiento de los cromatogramas y los picos se utilizó el programa informático *MassLynx 4.1* (Waters, Reino Unido).

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y ELABORACIÓN DE FIGURAS

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el software *Graphpad Prism*. En primer lugar, se analizó si la población tenía una distribución de probabilidad normal respecto a cada uno de los parámetros estudiados mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Este análisis se puede emplear para contrastar la normalidad de una población cuando la muestra tiene un tamaño máximo de 50. Para efectuarla, se calcula la media y la varianza muestral, S^2 , y se ordenan las observaciones de menor a mayor. A continuación, se calculan las diferencias entre primero y último, segundo y penúltimo, tercero y antepenúltimo, etc. y se corrigen con coeficientes tabulados por Shapiro y Wilk. Una vez estudiada la normalidad, para realizar comparaciones entre los grupos Control-FPI, shNT-shNNMT y pExpFlag-pExpNNMT, se llevaron a cabo tests paramétricos (t-student, para distribuciones normales) y tests no paramétricos (test de Mann Whitney U-test, para poblaciones sin distribución normal). Las significancias con un p valor inferior a 0,01 se englobaron conjuntamente (**) para favorecer la simplificación de las figuras,

Las comparaciones entre tratamientos dentro de cada grupo (comparaciones múltiples) se llevaron a cabo mediante el test Anova y el test de Kruskal-Wallis para parámetros con distribución normal y no paramétricos respectivamente.

Las figuras se han elaborado con *Graphpad Prism 8*, la plataforma *BioRender.com* y Microsoft Office 365.

IV. RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN BASAL DE LAS POBLACIONES DE FIBROBLASTOS Y MIOFIBROBLASTOS EMPLEADAS COMO MODELOS EXPERIMENTALES

Tras el adecuado aislamiento de fibroblastos procedentes de pacientes con neumotórax como control y de FPI, descrito en *material y métodos*, se procedió a caracterizar ambos grupos experimentales. Nuestra finalidad fue identificar los marcadores más característicos asociados al proceso fibrótico que nos sirvan de referencia para clasificar las poblaciones como controles o como fibróticas. Como se especificaba en la *introducción*, el α -SMA es el marcador más utilizado para la identificación del fenotipo miofibroblástico, ya que el paso que convierte un fibroblasto en miofibroblasto diferenciado es la síntesis *de novo* de esta proteína del citoesqueleto y su correspondiente ensamblaje. Esto le confiere una gran capacidad contráctil, que se acompaña de un incremento de la expresión de otras proteínas, típicas de las células mesenquimales como el colágeno (COL1A1 y COL1A2 principalmente) y fibronectina (FN1).

Como se observa en la Figura 24, se determinaron los niveles de α -SMA en extractos proteicos procedentes de fibroblastos control y fibróticos mediante *Western Blot*. Los resultados se normalizaron con la expresión de la proteína β -actina de los mismos cultivos. Se observó una mayor expresión de α -SMA en cultivos de fibroblastos procedentes de pacientes con FPI en comparación con cultivos de fibroblastos control.

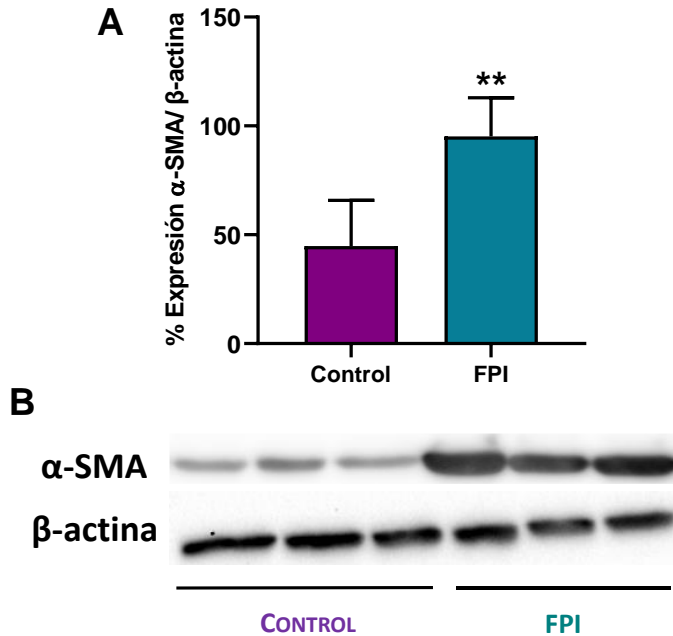


Figura 24: Expresión proteica de α -SMA en cultivos de fibroblastos control y de FPI. Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot* y se incubaron con el anticuerpo específico para α -SMA y β -actina. (A) Densitometría de la expresión de α -SMA como % respecto a la β -actina. (B) Imagen representativa de los niveles proteicos de α -SMA y β -actina. N=12 Control y N=12 FPI. ** $p < 0,01$ en comparación con el grupo control.

La segunda técnica empleada para estudiar la expresión de α -SMA en los cultivos control y FPI consistió en el marcaje por inmunofluorescencia de las células positivas para la proteína. Esta técnica, a diferencia del *Western Blot*, nos permite contabilizar el porcentaje de miofibroblastos que hay en los cultivos respecto a los fibroblastos totales.

Tras la realización de la inmunofluorescencia, se contaron en 10 campos aleatorios las células que presentaban un marcaje para α -SMA. Como se observa en la Figura 25, el porcentaje de células α -SMA positivas fue significativamente superior en pacientes con FPI respecto a los controles, confirmando los resultados obtenidos por *Western Blot*.

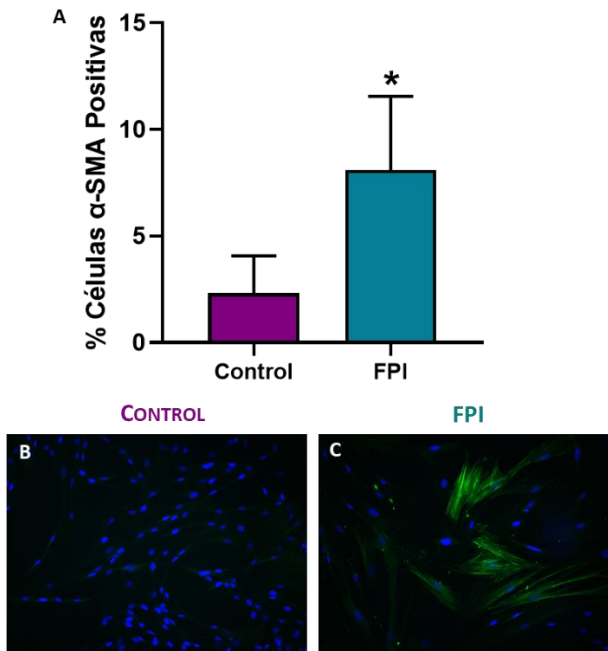


Figura 25: Inmunofluorescencia representativa de la expresión de α -SMA en cultivos control y de FPI. (A) Gráfica que representa el porcentaje de células α -SMA positivas respecto al total. Las células se sembraron en cubreobjetos en placas de 24 pocillos. Al alcanzar la subconfluencia se fijaron y se llevó a cabo la inmunofluorescencia de α -SMA (color verde). Los núcleos se tiñeron con Hoechst-33342 (color azul). (B) Imagen representativa control (B) y FPI (C). Las imágenes presentan un aumento de 200x. El experimento es representativo de una N=8 tanto para el grupo control como para FPI. * $p < 0,05$ respecto al grupo control.

A su vez, se determinaron por RT-PCR los niveles de expresión de los genes *ACTA2* (gen que codifica a la proteína α -SMA), *COL1A1* (gen codificante del colágeno 1 tipo 1), *COL1A2* (gen codificante del colágeno 1 tipo 2) y *FN1* (gen codificante de la fibronectina). Para obtener una cuantificación relativa normalizada de los genes en cuestión, se empleó como gen de referencia la expresión de β -actina. La Figura 26 muestra que el grupo de los fibroblastos fibróticos presenta un aumento significativo en la expresión de *ACTA2*, *COL1A1*, *COL1A2* y *FN1* respecto a los fibroblastos control, lo que corroboraría que las poblaciones de fibroblastos procedentes de pacientes con FPI son más ricas en miofibroblastos respecto a las poblaciones control.

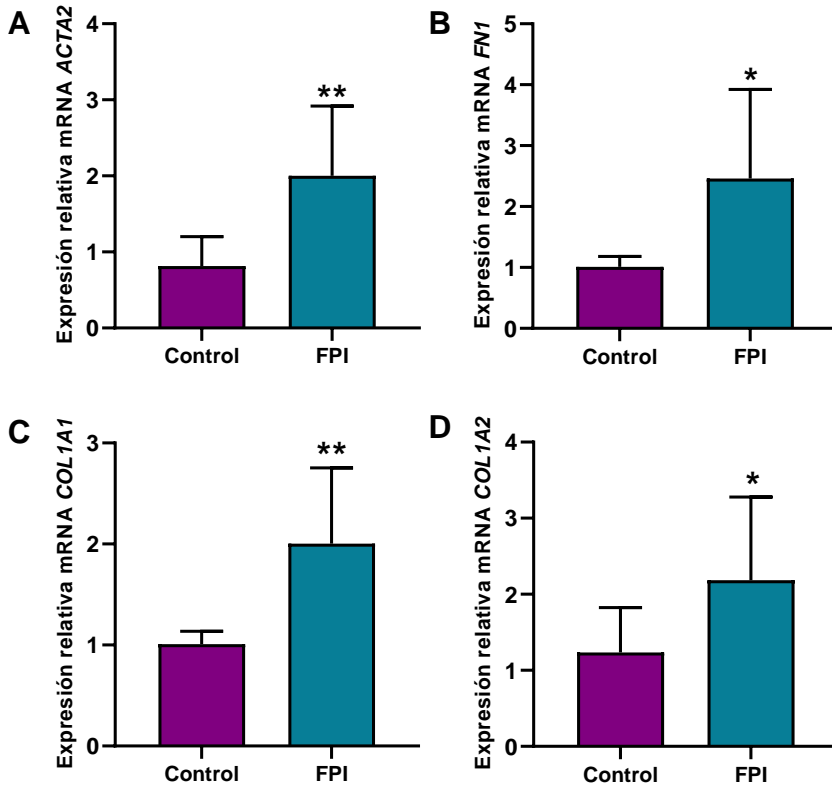
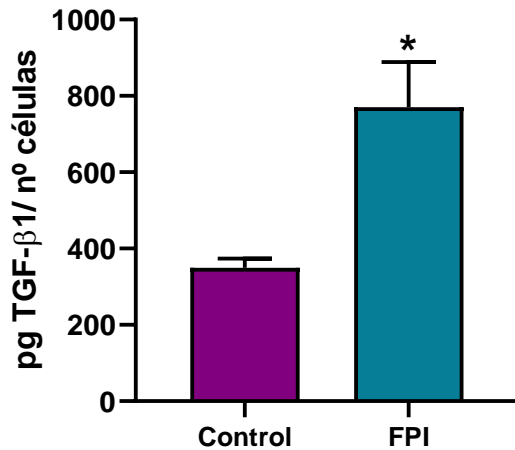


Figura 26: Expresión relativa de diferentes genes implicados en el proceso fibrótico: *ACTA2*, *COL1A1*, *COL1A2* y *FN1*, en cultivos control y procedentes de FPI. Los fibroblastos de ambos grupos (control y fibrótico) se sembraron en placas Petri de 6 cm y cuando alcanzaron una confluencia del 80% se extrajo el RNA y se llevó a cabo la RT-PCR. Se muestran las gráficas que recogen los resultados de *ACTA2* (A), *FN1* (B), *COL1A1* (C) y *COL1A2* (D). N=10 Control y N=10 FPI. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ en comparación con el grupo control.

Aunque los procesos que dirigen la acumulación aberrante de miofibroblastos en la FPI son todavía inciertos, es ampliamente conocido y respaldado que el TGF- β 1 es uno de los principales inductores del proceso FMT y EMT y, además, las células lo producen en mayor medida cuanto más parecido al miofibroblasto y/o mesenquimal es su fenotipo (Lijuan Zhang *et al.* 2020; Willis y Borok 2007; Scotton y Chambers 2007), de modo que se encuentra frecuentemente incrementado en las patologías pulmonares fibróticas (King, Pardo y Selman 2011). Por esta razón, decidimos determinar

la producción de TGF- β 1 liberado al medio extracelular por los fibroblastos pertenecientes a ambos grupos de nuestro estudio.

En la Figura 27 podemos observar que los fibroblastos pertenecientes al grupo de pacientes fibróticos presentan mayor concentración de TGF- β 1 en el medio de cultivo respecto a los controles, lo que se correlaciona con una mayor predisposición de dichas células a sufrir la FMT y a sobreexpresar aquellos genes con función fibrótica.



ez

Figura 27: Niveles de TGF- β 1 extracelular. Los fibroblastos de ambos grupos (control y FPI) se sembraron en placas de 6 pocillos. Tras 24h en condiciones estándar, el medio de cultivo fue sustituido por medio sin suero suplementado con BSA al 4%, y tras 72h se recogieron los sobrenadantes para medir la secreción de TGF- β 1. N=4 Control y N=4 FPI. *p<0,05 en comparación con el grupo control.

1.1. EVOLUCIÓN DE LA SENESCENCIA DE LOS FIBROBLASTOS CON EL NÚMERO DE PASES

A nivel *in vitro*, cada vez que las células se tripsinizan y se levantan de la placa de cultivo se considera que han sufrido un pase. Cada pase que sufren los fibroblastos, al tratarse de células que no son inmortales, es relevante porque puede determinar la edad celular de las mismas. Un número elevado de pases (específicos para cada tipo celular) puede conducir a la muerte celular por senescencia.

La acumulación del daño celular por senescencia estimula la actividad de los inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina p16 y/o p53-p21, los cuales antagonizan la quinasa dependiente de ciclina y bloquean el ciclo celular (Van Deursen 2014). Se han establecido unos marcadores de senescencia característicos tanto para las células epiteliales como para los fibroblastos presentes en el tejido pulmonar de pacientes que han desarrollado FPI, estos son: la p16, la p21 y la actividad β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -gal) (Lomas *et al.* 2012). Con el objetivo de profundizar en la relación existente entre el proceso fibrótico y la senescencia, se analizaron por RT-PCR la expresión de los genes *ACTA2*, *COL1A1*, *p21* y *p16* en RNA extraído de fibroblastos con diferentes pases, empleándose la expresión de *β -actina* en estas mismas células como gen para normalizar los resultados obtenidos. Para ello, cultivos de fibroblastos control y fibróticos se sembraron en placa Petri de 6 cm a pase 4, 6, 9 y 12 para posteriormente extraer el RNA. La Figura 28 nos muestra que tanto en los fibroblastos fibróticos como en los controles se observa un incremento progresivo de los marcadores fibróticos (*ACTA2* y *COL1A1*) y de senescencia (*p21* y *p16*) a medida que aumentan los pases.

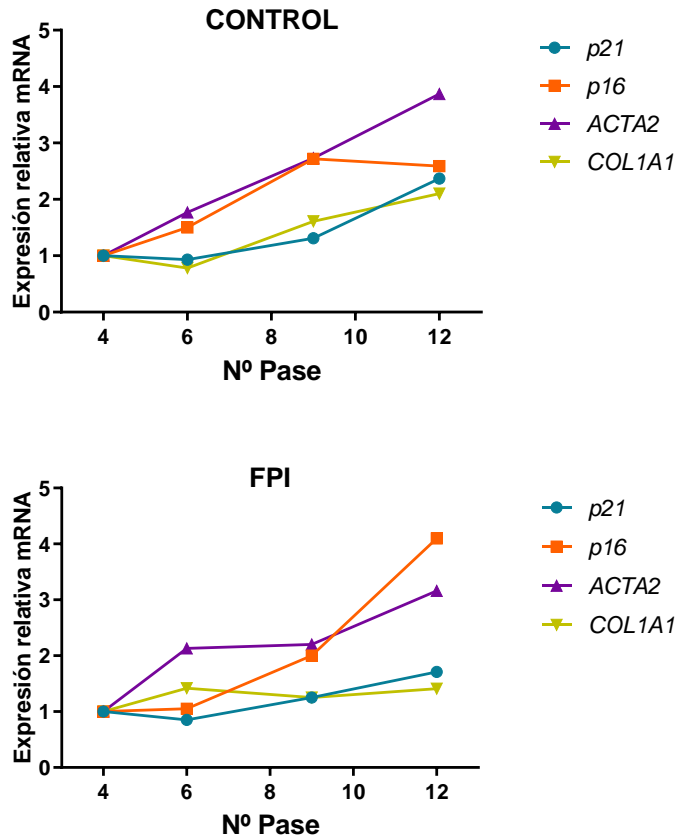


Figura 28: Expresión relativa de *p21*, *p16*, *ACTA2* y *COL1A1* en fibroblastos control y fibróticos a diferentes pases. Los fibroblastos se sembraron a pase 4, 6, 9 y 12 en placas Petri de 6 cm y cuando alcanzaron el 80% de confluencia se extrajo el ARN para realizar posteriormente la RT-PCR. Los valores de cada gen obtenidos están normalizados a la β -actina y relativizados al Pase 4 de cada paciente. N=3 Control y N=3 FPI.

A continuación, se empleó el kit *Senescence Cells Histochemical Staining Kit* para la detección de fibroblastos senescentes a través de la determinación de la actividad β -galactosidasa asociada a la senescencia en cultivos de fibroblastos control y fibróticos en pase 4 y en pase 12. La Figura 29 muestra que los cultivos a pase 12 tienen más actividad β -galactosidasa por presentar más coloración azul respecto los mismos cultivos a pase 4, ya que presentan más células senescentes respecto a los cultivos con pase más corto.

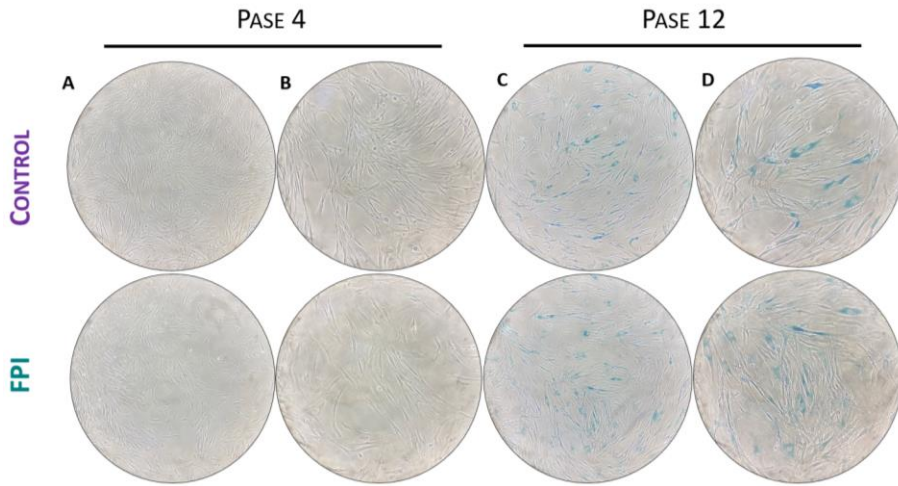


Figura 29: Imágenes representativas de la detección cualitativa de la actividad de la β -galactosidasa por tinción con X-gal de fibroblastos control y fibróticos a pase 4 y pase 12. Las células a pase 4 y pase 12 se sembraron en placas de 6 pocillos y cuando alcanzaron el 80% de confluencia se inició el protocolo especificado por el fabricante. A y C: 100x; B y D: 200x. Estos resultados son representativos de una N=3 pacientes por grupo.

1.2. LOS FIBROBLASTOS FIBRÓTICOS PRESENTAN UN FENOTIPO SENESCENTE ELEVADO RESPECTO A LOS FIBROBLASTOS CONTROL

Está ampliamente descrito que en el contexto de la FPI, tanto las AECs como los fibroblastos pueden estar sometidos a procesos de senescencia, de modo que la acumulación de estas células senescentes favorece el progreso de la FPI (Schafer *et al.* 2017; Alder *et al.* 2008). Durante el proceso de senescencia las células pierden la capacidad para dividirse (arresto de la división celular), se producen cambios en su apariencia física, morfología y forma, así como en su patrón de expresión génica. Entre los factores que la producen se encuentran el acortamiento de los telómeros, el estrés oxidativo, el daño al ADN y la inestabilidad del proteoma.

Con la finalidad de caracterizar de modo más detallado las poblaciones de fibroblastos que habíamos aislado, decidimos evaluar el grado de senescencia de dichas poblaciones. Para ello, se determinaron por RT-PCR los niveles de expresión del gen *p16* y *p21* y se empleó *β -actina* para obtener una

cuantificación relativa normalizada de los genes en cuestión. La Figura 30 muestra que tanto la expresión de *p16* como la de *p21* están significativamente aumentadas en los fibroblastos procedentes de pacientes fibróticos respecto a los fibroblastos control, lo que se corresponde con un fenotipo senescente en los fibroblastos fibróticos.

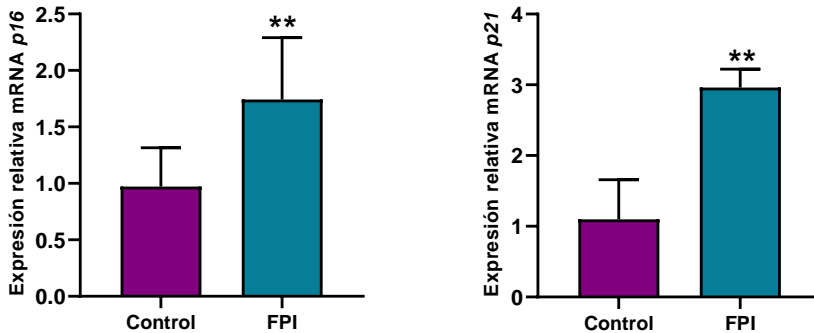


Figura 30: Expresión relativa de mRNA de *p16* y *p21* en fibroblastos controles y fibróticos. Las células se sembraron en placa Petri de 6 cm y cuando alcanzaron una confluencia del 80% se extrajo su RNA para realizar posteriormente la RT-PCR. Los valores de cada gen están normalizados con los valores de β -actina del mismo cultivo y a su vez relativizados a la media de los controles. N=10 Control y N=10 FPI. ** $p < 0,01$ respecto al grupo control.

También se empleó el kit *Senescence Cells Histochemical Staining Kit* para la detección de fibroblastos senescentes a través de la determinación de la actividad β -galactosidasa asociada a la senescencia. La Figura 31 muestra que los fibroblastos procedentes de pacientes que han sufrido FPI presentan mayor actividad β -galactosidasa respecto a los controles, ya que aparecen más teñidos con la tinción azul característica de dicha enzima. En cambio, en los controles la tinción es prácticamente inexistente.

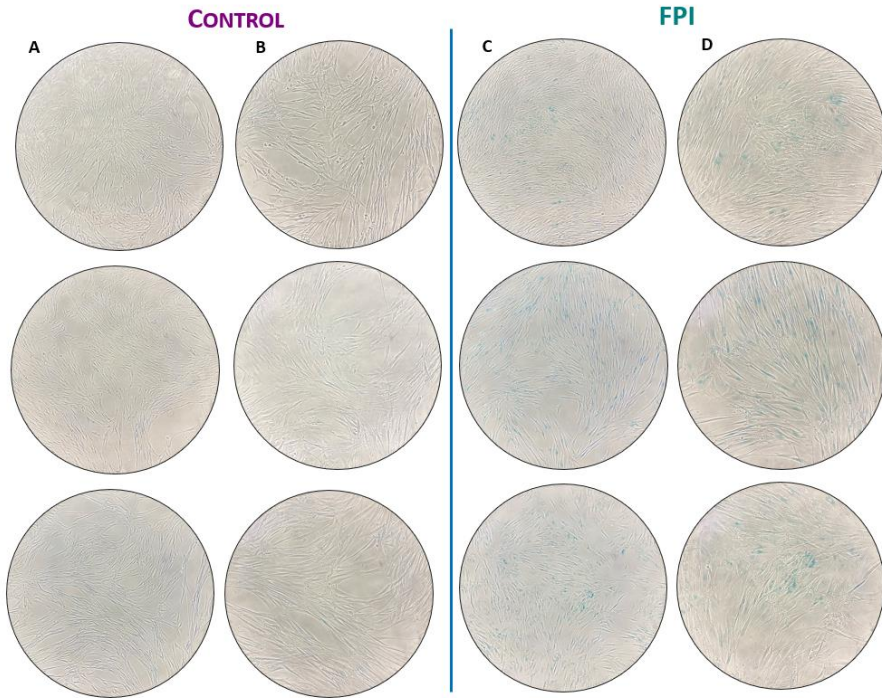


Figura 31: Imágenes representativas de la detección cualitativa de la actividad de la β -galactosidasa por tinción con X-gal de fibroblastos control y fibróticos. Las células en fase 6 se sembraron en placas de 6 pocillos y cuando alcanzaron el 80% de confluencia se inició el protocolo especificado por el fabricante. En la parte de la izquierda, la tinción con X-gal de fibroblastos procedentes de pacientes control (A: 100x; B: 200x) es prácticamente inexistente respecto a las imágenes de la derecha, donde los fibroblastos procedentes de pacientes con FPI aparecen teñidos de azul. (C: 100x; D: 200x). N=7 Control y N=7 FPI.

2. EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN DE LAS POBLACIONES DE FIBROBLASTOS POR EL TGF- β 1 Y LA IL-1 β COMO MODULADORES DE LA FMT

Considerando que el TGF- β 1 es la citoquina conocida más potente para producir la activación de los fibroblastos y favorecer su transformación a miofibroblasto, para simular *in vitro* el microambiente fibrótico, cultivamos los fibroblastos en medio completo suplementado con una concentración de 5 ng/ml de TGF- β 1. Esta concentración es suficiente para inducir la EMT y la activación de fibroblastos y su transformación a miofibroblastos (FMT). La finalidad de esta estimulación con TGF- β 1 era evaluar si nuestras poblaciones de fibroblastos eran sensibles a sufrir FMT y comparar la estimulación diferencial del TGF- β 1 de los fibroblastos procedentes de pacientes con FPI respecto a fibroblastos control.

Con este objetivo, nuestras poblaciones de fibroblastos se incubaron con una concentración de 5 ng/ml de TGF- β 1 durante 72 horas. Tras la extracción de proteínas, se determinaron los niveles de expresión proteica de α -SMA y la FN1 como proteínas implicadas en la FMT y características del fenotipo miofibroblasto. Los resultados expuestos en la Figura 32 muestran un aumento significativo de la expresión de ambas proteínas en las poblaciones de fibroblastos estimuladas con TGF- β 1 respecto a la condición control. Para el estudio del proceso EMT, se determinaron los niveles de proteínas características del fenotipo mesenquimal como SNAI1 (factor de transcripción que promueve la represión de E-cadherina y la activación, a su vez, de otros genes mesenquimales), la vimentina (VIM) y la N-cadherina (CDH2). La Figura 32 muestra un incremento significativo de las proteínas mesenquimales en los fibroblastos tratados con TGF- β 1 respecto a los mismos en su condición basal. Además, los incrementos observados en las proteínas características del fenotipo miofibroblasto y mesenquimal se observan tanto en fibroblastos controles (Figura 32 panel A y B) como fibróticos (Figura 32 panel C y D). En el caso de la vimentina, no se observó cambio en los fibroblastos que fueron tratados con TGF- β 1. Este hecho podría deberse a que dicha proteína es constitutiva de los fibroblastos, por lo que, para producirse un cambio en la expresión de esta, se necesita una inducción más potente o de mayor duración. Se empleó como proteína de referencia para normalizar los resultados la β -actina.

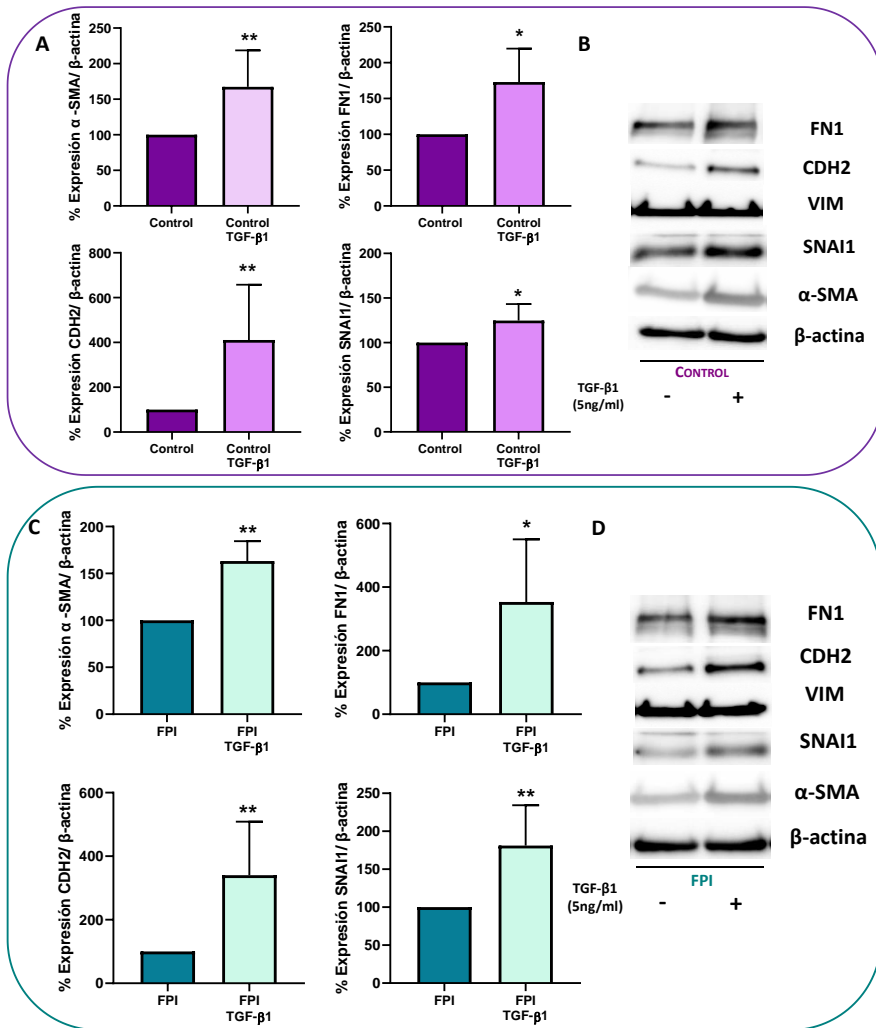


Figura 32: Inducción de la EMT y la FMT en fibroblastos control y fibróticos tratados con TGF-β1. Western Blot. Los fibroblastos se sembraron en placas Petri de 10 cm y a las 24 horas se les refrescó el medio con y sin TGF-β1 (5 ng/ml). Tras 72 horas de incubación se lisaron y se midieron las proteínas α-SMA, FN1, CDH2, SNAI1 y vimentina por *Western Blot*. Las expresiones de dichas proteínas fueron normalizadas con la expresión de la proteína constitutiva β-actina. Densitometrías de los resultados obtenidos en los fibroblastos del grupo control (A) y FPI (C). Imágenes representativas de los niveles de expresión de dichas proteínas en fibroblastos control (B) y FPI (D). Los resultados se muestran como % de expresión relativa al control (no tratado). N=8 controles y N=8 FPI. * p<0,05 y **p<0,01 comparado a las respectivas células no tratadas.

El incremento en la síntesis de las fibras de α -SMA en los fibroblastos tras la inducción mediante TGF- β 1 (5 ng/ml) también se determinó mediante inmunofluorescencia. Tras sembrarse las células, se incubaron con y sin TGF- β 1 durante 72 horas. Como muestra la Figura 33, los cultivos incubados con el factor transformante aparecen enriquecidos en miofibroblastos ya que han visto incrementada de modo muy significativo la expresión de α -SMA. A su vez, también se observa en la Figura 33 que los fibroblastos FPI presentan un aumento significativo de los niveles de expresión de α -SMA respecto a los controles, lo que apoyaría los resultados mostrados anteriormente (Figura 25).

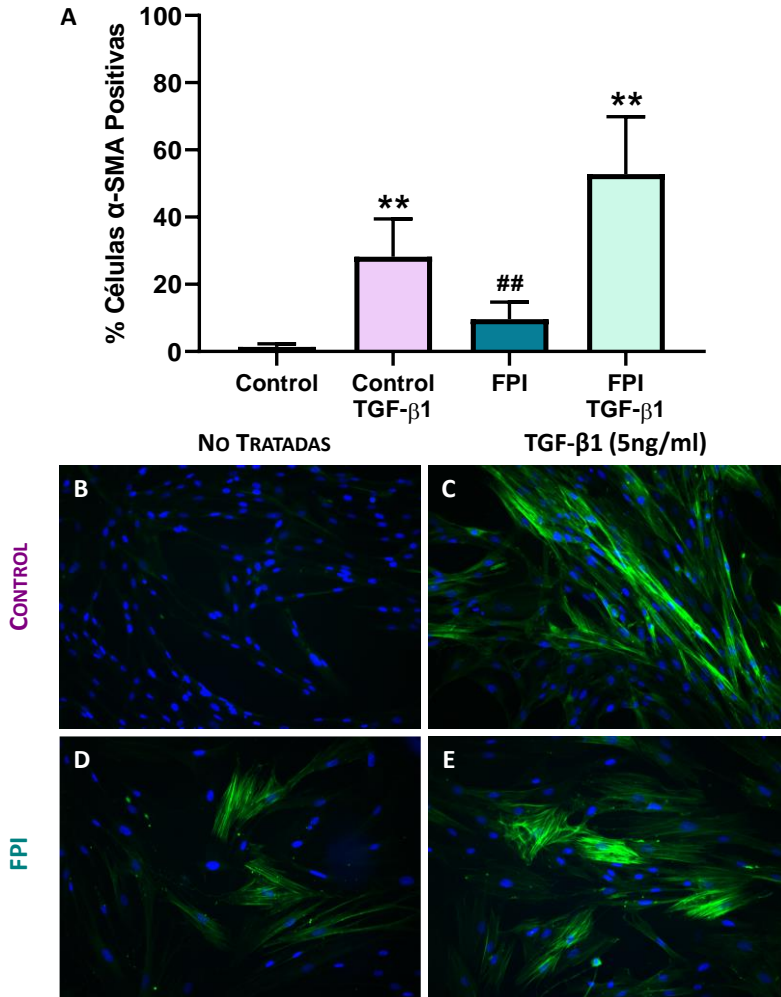


Figura 33: Inmunofluorescencia representativa de la expresión de α -SMA en cultivos control y con FPI tras ser incubados en presencia y ausencia de TGF- β 1. A. Gráfica que representa el porcentaje de células α -SMA positivas respecto al total. Las células se sembraron en cubreobjetos en placas de 24 pocillos, tras 24 horas fueron incubadas durante 72 horas con (B y D) y sin TGF- β 1 (C y E) con una concentración de 5 ng/ml. A continuación, se fijaron con paraformaldehído al 4% y se llevó a cabo una inmunofluorescencia para marcar los miofibroblastos, es decir, las células que son positivas para α -SMA con su anticuerpo fluorescente correspondiente (color verde). Los núcleos se tiñeron con Hoechst-33342 (color azul). Las imágenes presentan un aumento de 200x. El experimento es representativo de una N=8 tanto para el grupo control como para FPI. ** $p < 0,01$ respecto a las células no tratadas del mismo grupo y ## $p < 0,01$ respecto al control no tratado.

Posteriormente, se determinaron los niveles de mRNA de genes característicos del proceso fibrótico como *COL1A1*, *COL1A2*, *ACTA2* y *FN1*, con la finalidad de evaluar si el TGF- β 1 también era capaz de producir cambios a nivel de mensajero de dichas proteínas. Para obtener una cuantificación relativa normalizada de los genes en cuestión, se empleó como referencia la expresión de β -actina. Como se puede observar en la Figura 34, en aquellos fibroblastos que han sido tratados con TGF- β 1 se produce un incremento muy significativo de la expresión de estos genes respecto a la condición control y, una vez más, se puede observar tanto en el grupo de fibroblastos control como en los fibróticos. Estos resultados corroboran que el TGF- β 1 es un potente inductor de la FMT, así como del proceso fibrótico y que nuestras poblaciones aisladas son sensibles a dicho agente profibrótico, lo que nos proporciona un modelo óptimo *in vitro* de estimulación del proceso fibrótico.

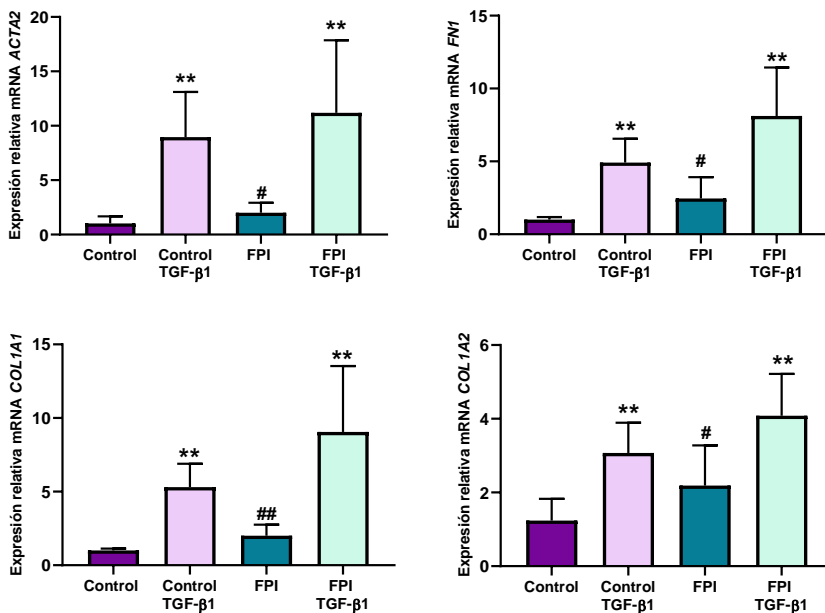


Figura 34: Inducción de la EMT y la FMT en fibroblastos control y fibróticos tratados con TGF- β 1. RT-PCR. Las células se sembraron en placas Petri de 6 cm, a las 24 horas se les refrescó el medio con y sin TGF- β 1 (5 ng/ml). Tras 72 horas de incubación se extrajo el RNA y se llevó a cabo la RT-PCR para medir la expresión de los genes *ACTA2*, *FN1*, *COL1A1* y *COL1A2*. Los resultados que se muestran están relativizados todos al control. N=10 tanto para los controles como para FPI. **p<0,01, respecto a los fibroblastos de cada grupo sin tratar; y #p<0,05 y ##p<0,01 respecto al control.

La citoquina proinflamatoria IL-1 β aparece aumentada en respuestas tempranas frente al daño tisular y compromete de manera transitoria el microambiente mecánico. Sin embargo, se ha descrito como una molécula con poder antifibrótico en fases tardías de procesos con desarrollo fibrótico. Se ha demostrado que la IL-1 β reduce significativamente la rigidez y dureza de los fibroblastos a causa de la reducción de los filamentos de actina (F-actina) y α -SMA (Gabasa *et al.* 2020). En relación con estas evidencias y con la finalidad de generar un ambiente antifibrótico, incubamos las diferentes poblaciones de fibroblastos con medio suplementado con una concentración de 10 ng/ml de IL-1 β durante 72 horas, descrita por la bibliografía como una concentración suficiente para producir un cambio fenotípico en este tipo celular.

La IL-1 β se emplea habitualmente como estímulo de la expresión de la enzima inducible ciclooxigenasa-2 *in vitro* (Roca-Ferrer *et al.* 2011), ya que es capaz de incrementar el metabolismo del ácido araquidónico en diversos tipos celulares, entre los que se encuentran los fibroblastos, las células endoteliales, los hepatocitos y osteoclastos (Hoffman y Wanderer 2010). En nuestro estudio, se determinaron los niveles de expresión proteica de COX-2 como control positivo para evaluar la efectividad del tratamiento de los fibroblastos con IL-1 β , y se compararon respecto a los fibroblastos control. Como se puede observar en el panel A de la Figura 35 y en el panel D de la Figura 36, los niveles de COX-2 sufren un aumento muy significativo en aquellos fibroblastos control y fibróticos que han sido tratados con IL-1 β respecto a los controles, en los cuales la detección de esta enzima es prácticamente inexistente. Además, este aumento en la expresión de COX-2 tras el tratamiento con IL-1 β es mayor en los fibroblastos control respecto a los fibroblastos de FPI.

Una vez comprobada la correcta inducción de COX-2 por la IL-1 β , los extractos proteicos se utilizaron para determinar la expresión de α -SMA y FN1 (marcadores fibróticos), así como SNAI1 y CDH2 (marcadores mesenquimales). Como se observa en la Figura 35, correspondiente a la estimulación con IL-1 β de los fibroblastos control, los niveles de dichas proteínas no presentan cambios significativos respecto al control (α -SMA y FN1), o presentan una ligera tendencia a incrementarse como en el caso de SNAI1 y CDH2.

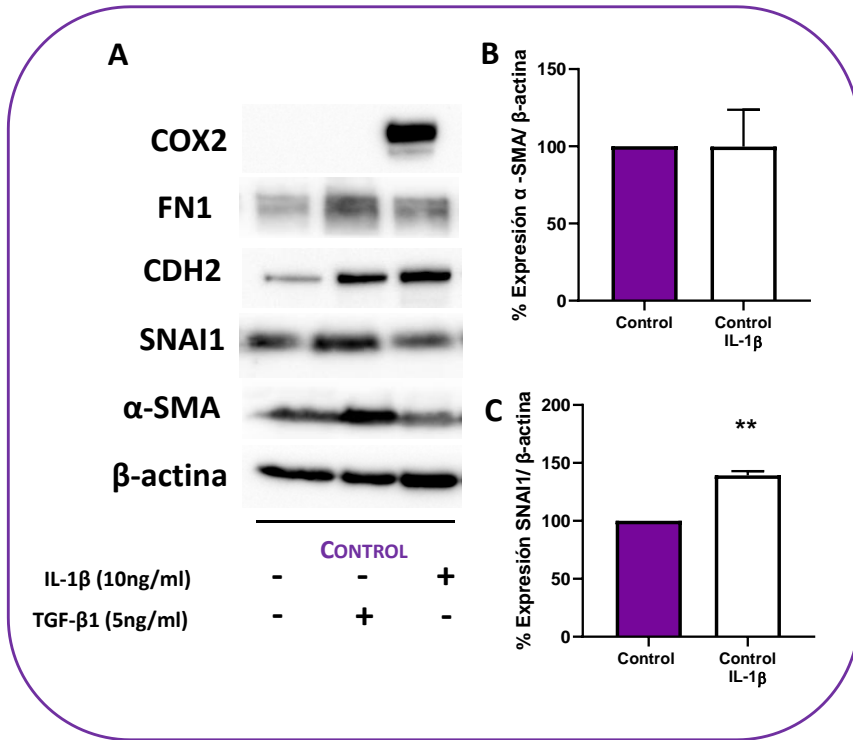


Figura 35: Tratamiento de los fibroblastos control en presencia o ausencia de la citoquina proinflamatoria IL-1 β . Los fibroblastos control se sembraron en placas Petri de 10 cm y a las 24 horas se les refrescó el medio con y sin TGF- β 1 (5 ng/ml); o bien con y sin IL-1 β (10 ng/ml). Tras 72 horas de incubación se lisaron y se midieron las proteínas α -SMA, FN1, CDH2, SNAI1 y COX-2 por *Western Blot*. Las expresiones de dichas proteínas fueron normalizadas con la expresión de la proteína constitutiva β -actina. A. Imagen representativa de los niveles de expresión de dichas proteínas en los fibroblastos control. Gráficas que plasman los resultados obtenidos en los fibroblastos del grupo control para α -SMA (B) y SNAI1 (C). N=8. **p<0.01 comparado a las respectivas células no tratadas.

Sin embargo, el tratamiento con IL-1 β de los fibroblastos procedentes de pacientes con FPI produjo una disminución significativa en la expresión de las proteínas fibróticas α -SMA (Figura 36 A) y FN1 (Figura 36 B), así como del factor de transcripción mesenquimal SNAI1 (Figura 36 C). Los niveles de expresión de CDH2 no se vieron afectados después del tratamiento con IL-1 β .

Tanto en el panel A de la Figura 35 como el panel D de la Figura 36 aparecen imágenes representativas de los niveles de las proteínas mencionadas anteriormente después de la estimulación de fibroblastos control y fibróticos respectivamente con TGF- β 1 y con IL-1 β , con la intención de

mostrar en conjunto el efecto fibrótico o antifibrótico de cada una de estas moléculas descrito con anterioridad.

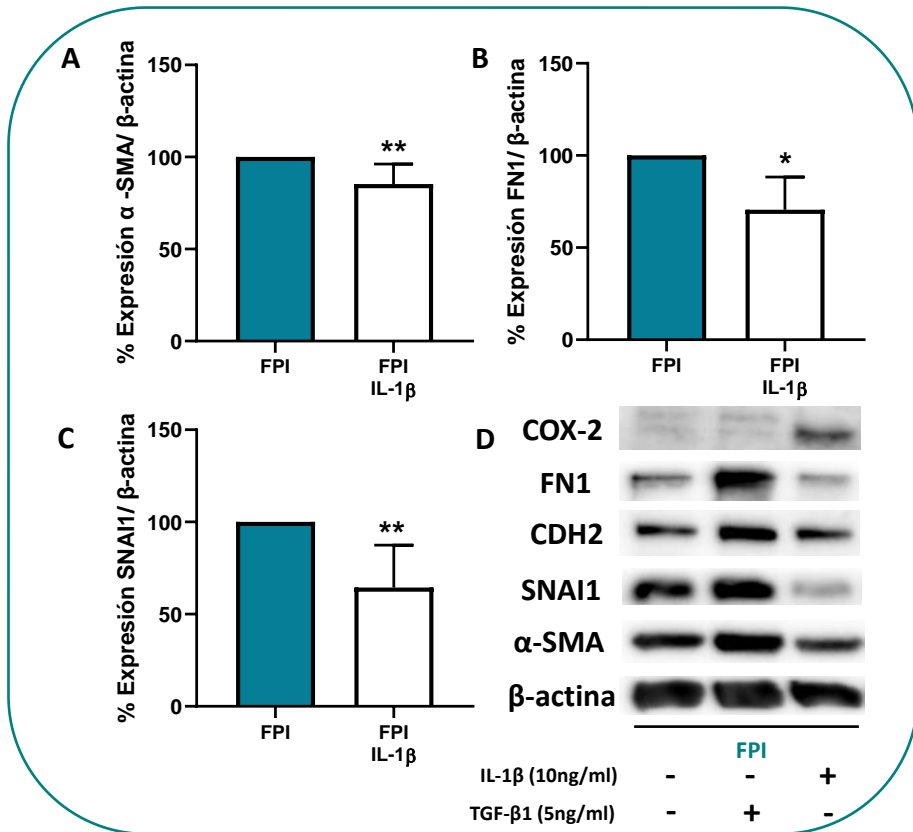


Figura 36: Tratamiento de los fibroblastos procedentes de pacientes con FPI con la citoquina proinflamatoria IL-1 β . Los fibroblastos control se sembraron en placas Petri de 10 cm y a las 24 horas se les refrescó el medio con y sin TGF- β 1 (5 ng/ml); o bien con y sin IL-1 β (10 ng/ml). Tras 72 horas de incubación se lisaron y se midieron las proteínas α -SMA, FN1, CDH2, SNAI1 y COX-2 por *Western Blot*. Las expresiones de dichas proteínas fueron normalizadas con la expresión de la proteína constitutiva β -actina. (D) Imagen representativa de los niveles de expresión de dichas proteínas en los fibroblastos fibróticos. Gráficas que plasman los resultados obtenidos en los fibroblastos del grupo fibrótico para α -SMA (A), FN1 (B) SNAI1 (C). N=8. ** p <0,01 comparado a las respectivas células no tratadas.

3. LA NNMT ESTÁ INCREMENTADA EN LOS FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON FPI RESPECTO A FIBROBLASTOS DE PACIENTES CONTROL

La NNMT es una enzima metabólica que transfiere un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina (SAM) a la nicotinamida para generar S-adenosilhomocisteína (SAH) y el producto inerte metabólicamente 1-metilnicotinamida (1-MNA). Muchos estudios la relacionan con el control del metabolismo en el hígado y en el tejido graso, la proliferación y metástasis de algunos modelos celulares tumorales y la regulación del epigenoma en modelos experimentales de cáncer y desarrollo embrionario (Ulanovskaya, Zuhl y Cravatt 2013; Emanuelli *et al.* 2010; Hong *et al.* 2015). En este contexto, nuestro grupo demostró la implicación de dicha enzima en la activación del proceso EMT en modelos de células epiteliales tumorales de cáncer de pulmón no microcítico y su implicación en la resistencia a los inhibidores de tirosinquinasa.

Con estos antecedentes y por las similitudes que comparten los procesos EMT y FMT, así como la relación directa que existe entre ambos dentro del contexto de desarrollo fibrótico, elegimos la NNMT como un posible candidato a ser evaluado en nuestras poblaciones de fibroblastos fibróticos y controles. El primer paso consistió en determinar su actividad enzimática mediante la detección de la 1-metilquinolina (1-MQ), tras la metilación de la quinolina. Esta reacción está catalizada por la NNMT que utiliza a la SAM como dador de metilos, que se convierte en SAH. La Figura 37 muestra que los fibroblastos fibróticos presentan mayor actividad enzimática de NNMT respecto a los fibroblastos control, ya que se detectó una concentración mayor de 1-MQ en el medio de reacción.

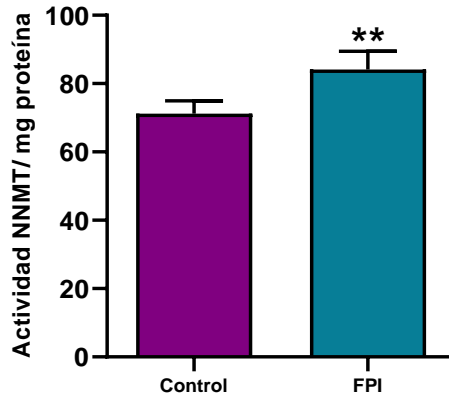


Figura 37: Medida de la actividad NNMT en fibroblastos control y fibróticos. Las células se sembraron en un frasco T150 para obtener alrededor de 10^7 células para llevar a cabo el experimento. Previa a la lisis celular, se ajustaron el número de células en todos los cultivos. Tras la medida de la absorbancia de 1-MQ, los resultados se relativizaron a la media de los controles y se normalizaron a los mg de proteínas de cada uno de los extractos. Los resultados se expresan en % de actividad. N=8 controles y N=7 FPI. ** $p < 0.01$ respecto a los controles.

A continuación, se evaluaron los niveles basales de dicha enzima, tanto mediante su determinación proteica como su expresión a nivel de mensajero. Como se puede observar en la Figura 38, existe una diferencia significativa en la expresión de NNMT, de modo que los fibroblastos fibróticos presentan una expresión incrementada de NNMT respecto a los fibroblastos control (panel A y B). Del mismo modo, también se observó un incremento significativo de la expresión del gen *NNMT* en los fibroblastos fibróticos respecto a los controles (panel C).

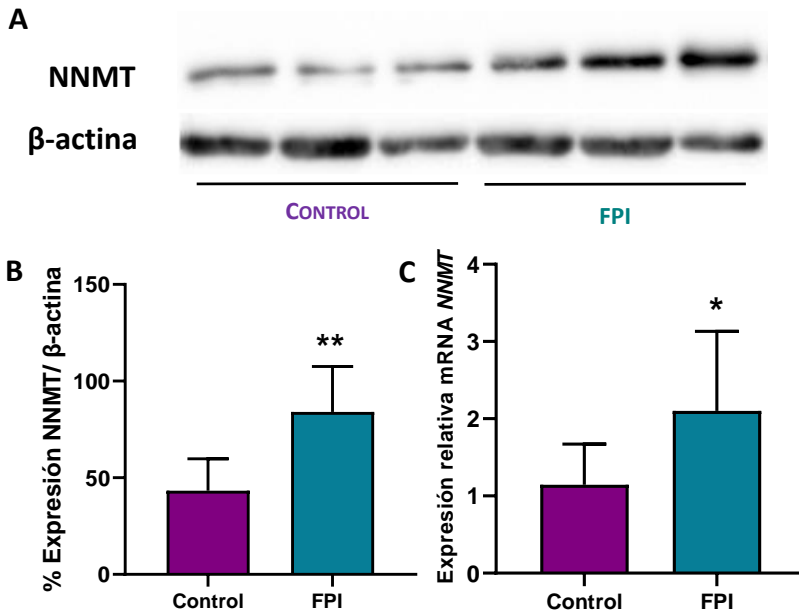


Figura 38: Expresión de NNMT en las poblaciones de fibroblastos control y fibróticos. Los extractos proteicos de los fibroblastos fueron analizados mediante *Western Blot* e incubados con el anticuerpo específico para NNMT, empleando la β -actina como patrón de carga. (A) Imagen representativa de los niveles proteicos de NNMT. (B) Densitometría que plasma los resultados de expresión proteica de NNMT relativizados a la media de los controles respecto a la β -actina. (C) Gráfica representativa de los resultados obtenidos de los niveles de mRNA de NNMT. Para medir la expresión del gen NNMT, se extrajo el ARN y se llevó a cabo la RT-PCR, tomando como gen de referencia la β -actina. N=12 Control; N=10 FPI. donde * p <0,05 y ** p <0,01 comparado a las respectivas células no tratadas.

Además, con la intención de determinar la localización celular de NNMT, se llevó a cabo una inmunofluorescencia de los fibroblastos control y fibróticos. En el panel B de la Figura 39 se observa que la expresión de NNMT está localizada en el citoplasma de los fibroblastos y que está incrementada en los fibroblastos fibróticos respecto los controles, ya que se observa mayor coloración roja.

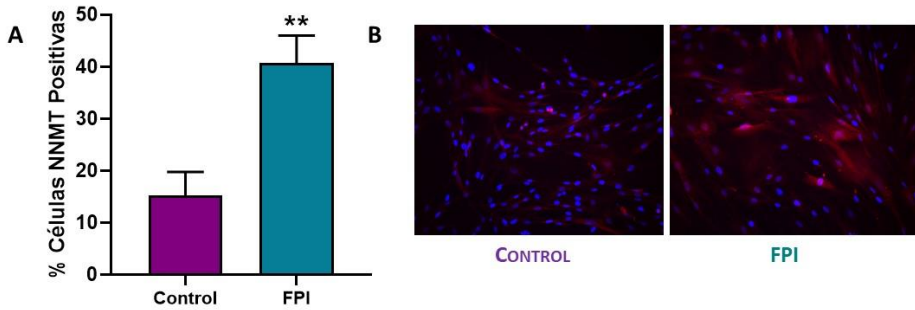


Figura 39: Inmunofluorescencia representativa de la expresión de NNMT en cultivos control y con FPI. Los fibroblastos control y fibróticos se sembraron en cubreobjetos en placas de 24 pocillos y tras 48 horas se fijaron con paraformaldehído al 4%. (A) Gráfica que expresa el porcentaje de células positivas a NNMT en los fibroblastos fibróticos respecto al control. (B) Se observan imágenes representativas en las que los núcleos teñidos con Hoechst-33342 aparecen en azul y NNMT en rojo. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Leica DM4500B (200x). N=12 Control; N=10 FPI. ** $p < 0,01$ comparado a los controles.

4. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NNMT MEDIANTE TGF- β 1 Y DISMINUCIÓN DE NNMT MEDIANTE IL-1 β

El siguiente paso consistió en evaluar la expresión de NNMT en el modelo profibrótico *in vitro* mediante la incubación con TGF- β 1 y en el modelo antifibrótico mediante la incubación de IL-1 β , en fibroblastos control y fibróticos. Con este propósito, poblaciones de fibroblastos control y fibróticos fueron incubados en presencia y ausencia de TGF- β 1 (5 ng/ml, 72 horas) y de IL-1 β (10 ng/ml, 72 horas). Tras 72 horas de incubación, las células se lisaron y los extractos proteicos fueron empleados para determinar la expresión proteica de NNMT mediante *Western Blot*. Como se observa en la Figura 40, el TGF- β 1 es capaz de inducir significativamente la expresión de NNMT en fibroblastos control y fibróticos, por su poder profibrótico. Sin embargo, la IL-1 β consigue disminuir de manera significativa los niveles de NNMT en los fibroblastos fibróticos, gracias a su poder antifibrótico.

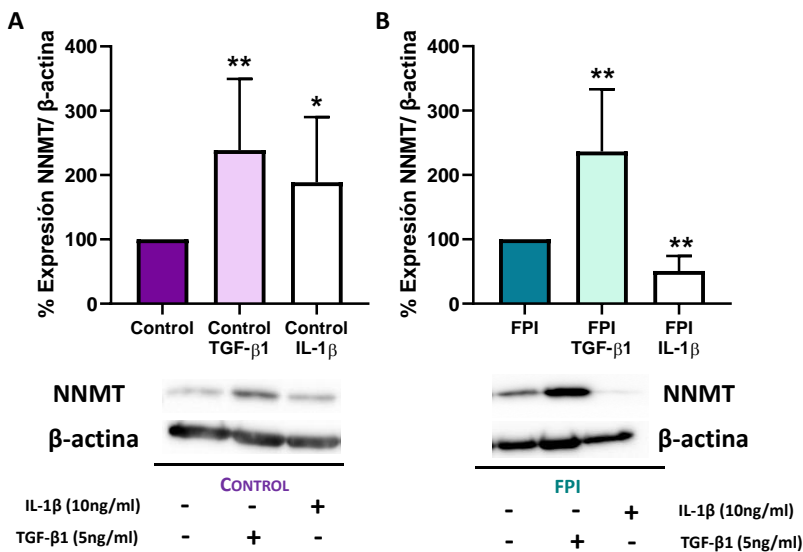


Figura 40: Expresión de la NNMT en fibroblastos control y fibróticos cultivados en presencia o ausencia de TGF- β 1 o IL-1 β . Las células se sembraron en placas de 10 cm con medio normal y a las 24 horas se les renovó el medio con o sin TGF- β 1 (5 ng/ml) o IL-1 β (10 ng/ml). Tras 72 horas de tratamiento, se lisaron las células y los extractos proteicos se emplearon para determinar la expresión de la proteína NNMT por *Western Blot*. Se muestran las densitometrías y las imágenes representativas de los resultados obtenidos en los fibroblastos control (A) y fibroblastos fibróticos (B). N=10 Controles y N=8 FPI. * p <0,05, ** p <0,01 respecto al control sin tratar.

Dado la importancia de la proteína α -SMA a la hora de determinar el fenotipo miofibroblasto y que sus niveles de expresión se veían aumentados con la inducción con TGF- β 1, decidimos analizar mediante anticuerpos fluorescentes los niveles, localización y posible coexpresión de dicha proteína del citoesqueleto con la NNMT. Para ello, poblaciones de fibroblastos control y fibroblastos fibróticos, se incubaron con y sin TGF- β 1 o con y sin IL-1 β . Como se puede observar en la Figura 41, el tratamiento con TGF- β 1 de los fibroblastos control, produce un aumento significativo de los niveles de NNMT (más células rojas y más intensas) y α -SMA (aparición de nuevas fibras marcadas en verde). Además, al combinarlos en la imagen, ambas tinciones coinciden en la mayoría de los miofibroblastos nuevos, con una tasa de coexpresión del 86%.

Por lo que respecta a los fibroblastos fibróticos, el tratamiento con TGF- β 1 también produjo un incremento significativo de la expresión tanto de α -SMA (aparición de nuevas fibras verdes) como de NNMT (color rojo), que de nuevo coincidieron. El nivel de coexpresión de ambas fue del 87,2% (Figura 42). Esto significaría que, tanto para los fibroblastos control como los fibróticos, los miofibroblastos generados gracias a la inducción de la FMT por el TGF- β 1, se caracterizarían por una expresión combinada de α -SMA (marcador fibrótico por excelencia descrito) y NNMT y lo posiciona como un nuevo posible marcador fibrótico.

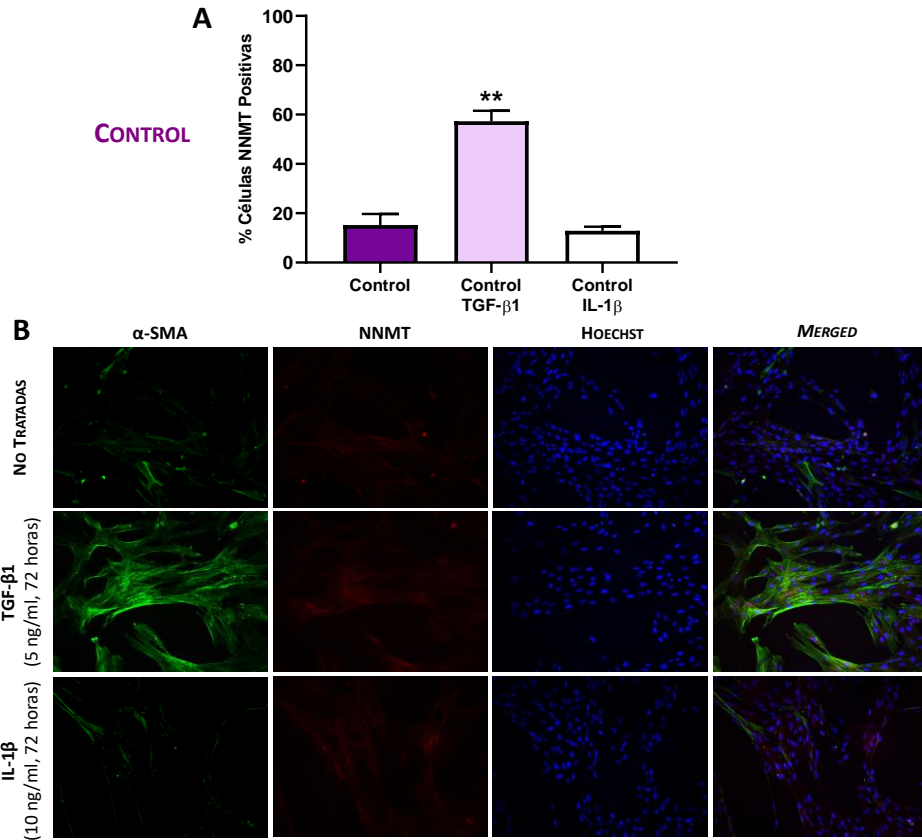


Figura 41: Inmunofluorescencia representativa de la expresión de α -SMA y NNMT en fibroblastos control tras ser incubados en presencia y ausencia de TGF- β 1 o IL-1 β . Las células se sembraron en cubreobjetos en placas de 24 pocillos, tras 24 horas fueron incubadas durante 72 horas con y sin TGF- β 1 (5 ng/ml) o con y sin IL-1 β (10 ng/ml). A continuación, se fijaron con paraformaldehído al 4%. (A) Gráfica que expresa el porcentaje de células positivas a NNMT en los fibroblastos incubados con TGF- β 1 o IL-1 β respecto al control. (B) Se observan imágenes representativas en los que los núcleos teñidos con Hoechst-33342 aparecen en azul, NNMT en rojo y α -SMA en verde. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Leica DM4500B (200x). El experimento es representativo de una N=8. ** $p < 0,01$

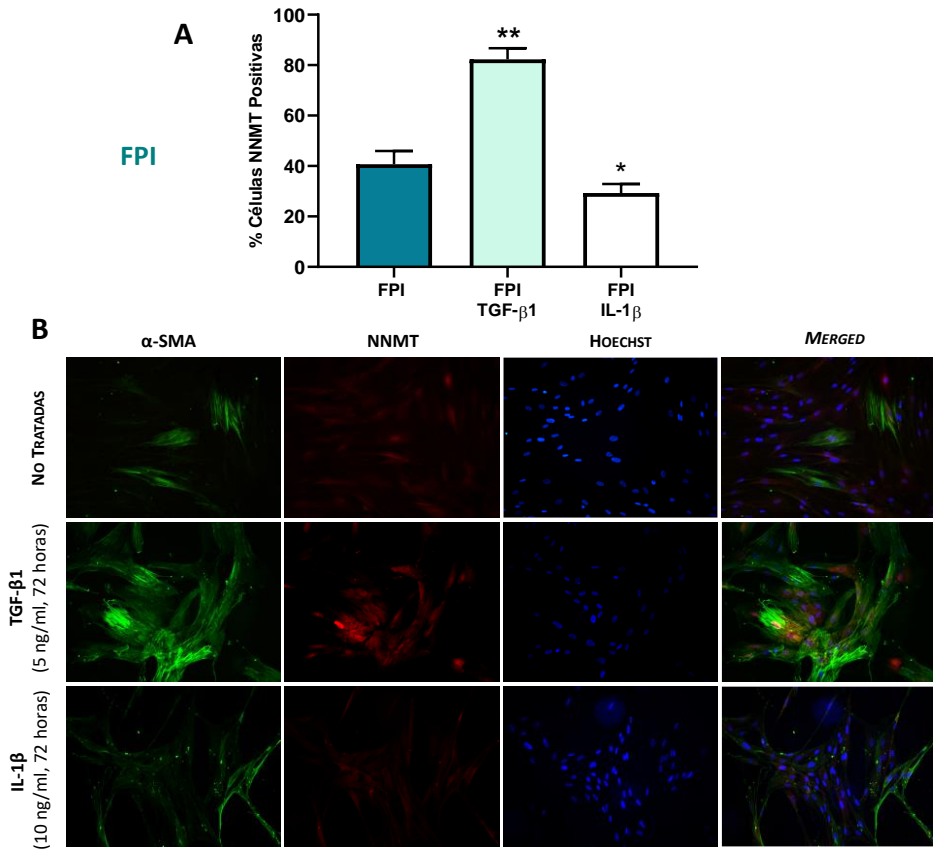


Figura 42: Inmunofluorescencia representativa de la expresión de α -SMA y NNMT en fibroblastos fibróticos tras ser incubados en presencia y ausencia de TGF- β 1 o IL-1 β . Las células se sembraron en cubreobjetos en placas de 24 pocillos, tras 24 horas fueron incubadas durante 72 horas con y sin TGF- β 1 (5 ng/ml) o con y sin IL-1 β (10 ng/ml). A continuación, se fijaron con paraformaldehído al 4%. (A) Gráfica que expresa el porcentaje de células positivas a NNMT en los fibroblastos incubados con TGF- β 1 o IL-1 β respecto al control. (B) Se observan imágenes representativas en los que los núcleos teñidos con Hoechst-33342 aparecen en azul, NNMT en rojo y α -SMA en verde. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Leica DM4500B (200x). El experimento es representativo de una N=8. * p <0,05 y ** p <0,01

El tratamiento con IL-1 β produce una ligera disminución de la tinción de NNMT en los fibroblastos control (Figura 41). En el caso de los fibroblastos fibróticos, el tratamiento con IL-1 β produce una disminución significativa de los niveles de NNMT respecto a la condición basal de estas mismas células (Figura 42).

5. PAPEL DE LA NNMT EN LOS FIBROBLASTOS ASOCIADOS A FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

La confirmación de que NNMT estaba elevada en los fibroblastos obtenidos de pacientes con FPI respecto a los fibroblastos obtenidos de pacientes control, reforzaba nuestra hipótesis de que esta proteína enzimática podría ser un marcador diferencial de estos fibroblastos fibróticos.

El siguiente paso consistió en investigar el papel que podría tener la NNMT en el desarrollo del proceso fibrótico asociado a la FPI en la modulación de marcadores del fenotipo miofibroblasto, fenotipo mesenquimal, la senescencia y el metabolismo celular. Para ello, se silenció y se sobreexpresó la NNMT en poblaciones de fibroblastos fibróticos con ayuda de partículas lentivirales, con la finalidad de evaluar que efecto podría tener en los fibroblastos silenciados y sobreexpresados.

5.1. ESTUDIO DEL SILENCIAMIENTO DE LA NNMT EN LOS FIBROBLASTOS ASOCIADOS A LA FPI

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación nos demostraban que la secuencia de silenciamiento de NNMT mediante transducción génica con partículas lentivirales con mayor eficacia de represión de NNMT comparada con la infección control (shNT) era la secuencia #227 shNNMT. Así que esta fue la secuencia que se empleó para silenciar NNMT en las poblaciones de fibroblastos de FPI.

Se consiguió reprimir la NNMT en un total de 8 poblaciones de fibroblastos fibróticos. Estas poblaciones pasarán a ser denominadas shNNMT y sus controles de silenciamiento shNT en el resto del trabajo. Tras el silenciamiento, se determinaron los niveles de expresión proteica de NNMT de dichas poblaciones para evaluar la eficacia de la inhibición. En la Figura 43 observamos que se produce una disminución significativa de los niveles de la proteína NNMT en los fibroblastos shNNMT respecto a los shNT. En concreto, el porcentaje de inhibición medio de las 8 parejas está en torno al 70%.

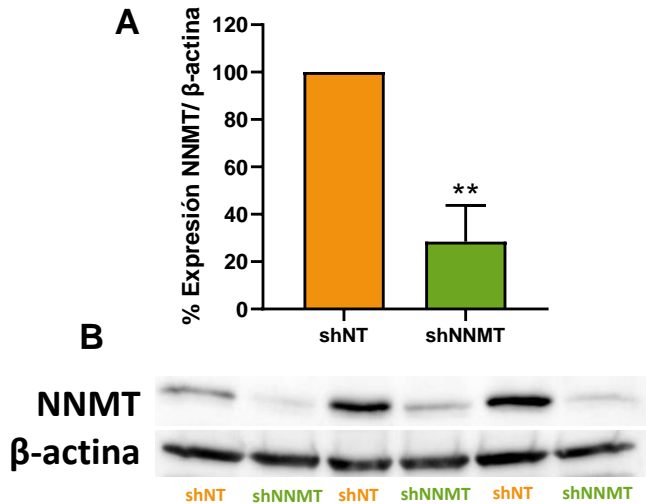


Figura 43: Silenciamiento de NNMT en fibroblastos FPI mediante la infección lentiviral de partículas shRNA medido por *Western Blot*. Los extractos proteicos de los fibroblastos shNT y shNNMT fueron empleados para medir la expresión de NNMT por *Western Blot*. (A) Densitometría de la expresión de NNMT como % respecto a la β -actina. (B) Imagen representativa de un *Western Blot* de NNMT y β -actina. Los resultados se muestran como expresión relativa a shNT. N=8 shNT y N=8 shNNMT. ** $p < 0,01$ comparado al shNT.

A continuación, se comprobó la eficacia de la represión de NNMT midiendo los niveles de expresión de mRNA de *NNMT*. Como se observa en la Figura 44 A, los niveles de expresión génica de *NNMT* en los fibroblastos shNNMT estaban significativamente disminuidos (50%) respecto a su control shNT. Además, estudios de inmunofluorescencia también demostraron que las poblaciones de fibroblastos shNNMT presentan una expresión reducida significativa de NNMT respecto a sus controles shNT, en la que se consigue disminuir aproximadamente un 80% el total de células positivas a NNMT en los fibroblastos shNNMT respecto a los shNT (Figura 44 C).

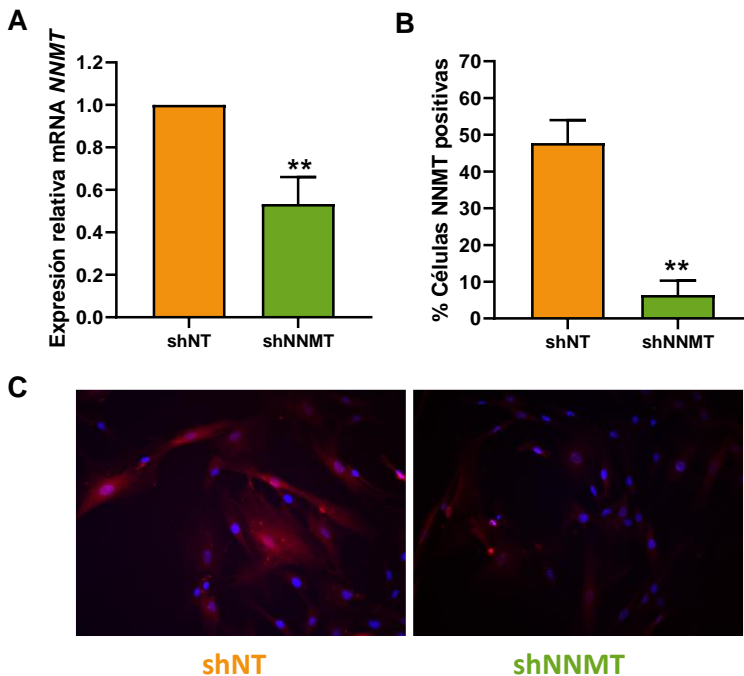


Figura 44: Silenciamiento de NNMT en fibroblastos FPI mediante la infección lentiviral de partículas shRNA medido por RT-PCR e inmunofluorescencia. Las células se sembraron en placas de 6 cm y cuando habían alcanzado el 80% de confluencia se extrajo el RNA y se procedió a realizar la RT-PCR de *NNMT*. (A) Expresión de mRNA de *NNMT* medido por RT-PCR normalizado a la expresión de β -actina. Por otro lado, las células se sembraron en cubreobjetos en placa de 24 pocillos y cuando habían alcanzado la subconfluencia se fijaron y se procedió a la detección de NNMT mediante anticuerpos fluorescentes específicos. (B) Gráfica que plasma el % de células NNMT positivas respecto al total de células. (C) Imágenes representativas de la expresión de NNMT medidas por inmunofluorescencia, se muestra NNMT en rojo y los núcleos teñidos con Hoechst 3342 en azul. Los resultados se muestran como expresión relativa al control (shNT). N=8 shNT y N=8 shNNMT. ** $p < 0,01$ comparado al grupo shNT.

Al tratarse la NNMT de una proteína enzimática, otro de los propósitos fue determinar si la represión de NNMT tenía también un efecto a nivel de la actividad de dicha proteína. La Figura 45 muestra que la actividad NNMT está significativamente disminuida en los fibroblastos shNNMT respecto a los shNT, de modo que el silenciamiento de NNMT tiene un efecto directo en su actividad y las células no son capaces de compensar ese déficit.

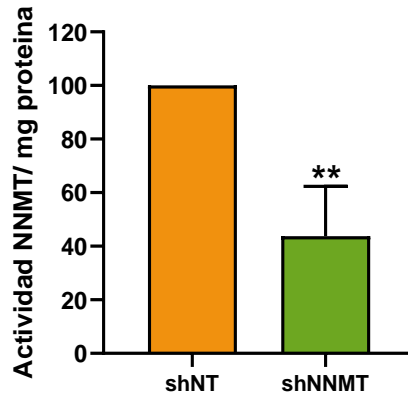


Figura 45: Medida de la actividad NNMT en fibroblastos shNT y shNNMT. Las células se sembraron en un frasco T150 para obtener alrededor de 10^7 células para llevar a cabo el experimento. Previa a la lisis celular, se ajustaron el número de células en todos los cultivos. Tras la medida de la absorbancia de 1-MQ, los resultados se relativizaron a la media de los controles y se normalizaron a los mg de proteínas de cada uno de los extractos. Los resultados se expresan en % de actividad y se muestran como expresión relativa a su shNT. N=8 shNT y N=8 shNNMT ** $p < 0,01$ comparado al shNT.

5.1.1. EL SILENCIAMIENTO DE NNMT EN FIBROBLASTOS FPI PRODUCE UNA DISMINUCIÓN DE LOS MARCADORES FIBRÓTICOS Y DE EMT

Una vez obtenidas las poblaciones de fibroblastos silenciados, el siguiente paso consistió en evaluar qué impacto podría tener la represión de NNMT en la expresión de los marcadores característicos del proceso fibrótico y EMT.

Como se observa en la Figura 46, el silenciamiento de NNMT produjo una disminución significativa de la expresión proteica de α -SMA (marcador de miofibroblastos), vimentina y SNAI1 (marcadores mesenquimales) y FAP (proteína activadora de fibroblastos).

Estos resultados indican que la represión de la NNMT es capaz de reducir los niveles de marcadores fibróticos y mesenquimales y que, por tanto, es capaz de revertir el proceso FMT y EMT asociado a fibroblastos fibróticos de FPI.

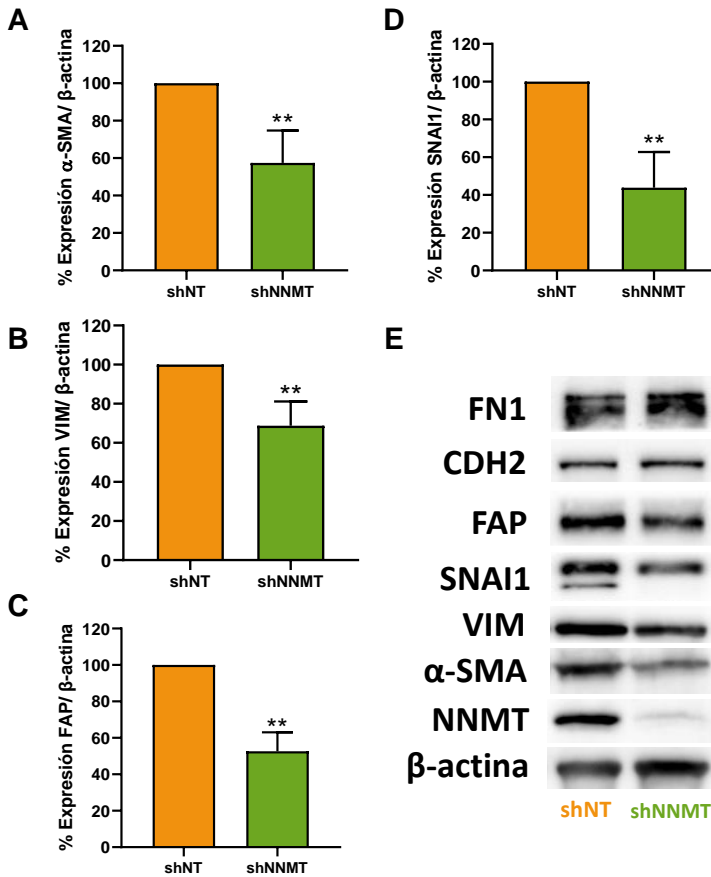


Figura 46: Disminución de los marcadores fibróticos y EMT en fibroblastos FPI con la NNMT silenciada. *Western Blot*. Los extractos proteicos de los fibroblastos shNT y shNNMT fueron empleados para medir la expresión de diversos marcadores fibróticos y mesenquimales mediante *Western Blot*. Se observan las densitometrías de α -SMA (A), Vimentina (B), FAP (C) y SNAI1 (D) expresadas como % de expresión normalizadas a la β -actina. (E) Imágenes representativas de un *Western Blot* de los diferentes marcadores y la β -actina. Los resultados se muestran como expresión relativa a shNT. N=8 shNT y N=8 shNNMT. ** $p < 0,01$ comparado al shNT.

Resultados similares a los anteriores se obtuvieron al medir los niveles de expresión génica de *ACTA2* por RT-PCR. Como muestra la Figura 47, los fibroblastos shNNMT presentan un descenso significativo de la expresión del gen *ACTA2* respecto a los fibroblastos shNT.

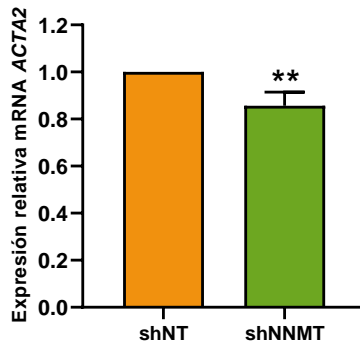


Figura 47: Disminución del gen *ACTA2* en fibroblastos shNNMT respecto a los shNT. RT-PCR. Las células se sembraron en placas de 6 cm y cuando habían alcanzado el 80% de confluencia se extrajo el RNA y se procedió a realizar la RT-PCR de *ACTA2*. Se observa la expresión relativa mRNA de este gen medido por RT-PCR normalizado a la expresión de β -actina. Los resultados se muestran como expresión relativa al control (shNT). N=8 shNT y N=8 shNNMT. **p<0,01 comparado al grupo shNT.

Dada la importancia de la proteína de la actina del músculo liso (α -SMA) en el proceso fibrótico y como marcador por excelencia de los miofibroblastos, decidimos estudiar mediante anticuerpos fluorescentes y microscopía la expresión de dicha proteína en los fibroblastos que tenían silenciada NNMT y, al mismo tiempo, si existía una relación de coexpresión entre ambas proteínas. La Figura 48, muestra que los niveles de α -SMA y NNMT están disminuidos significativamente en los fibroblastos shNNMT respecto a los shNT y, a su vez, que hay una disminución significativa en la coexpresión de ambas proteínas en los fibroblastos shNNMT, también porque los niveles de NNMT han descendido bruscamente en estos fibroblastos. Esto podría indicar que además de que la NNMT juega un papel clave en la reversión del fenotipo miofibroblasto y mesenquimal (al menos de forma parcial), está estrechamente relacionada con la expresión de α -SMA en el proceso FMT que sufren los fibroblastos asociados a la fibrosis.

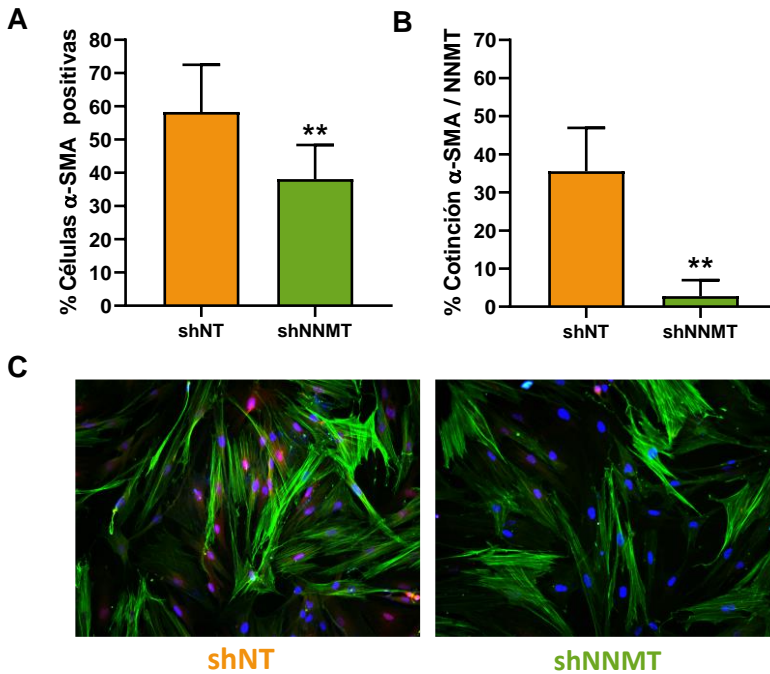


Figura 48: Inmunofluorescencia representativa de la expresión de α -SMA y NNMT en fibroblastos shNT y shNNMT. Las células se sembraron en cubreobjetos en placa de 24 pocillos y cuando habían alcanzado la subconfluencia se fijaron y se procedió a la detección de α -SMA y NNMT mediante anticuerpos fluorescentes específicos. (A) Gráfica que plasma el % de células α -SMA positivas respecto al total de células. (B) Gráfica que plasma el % de cotinición de α -SMA/NNMT de los fibroblastos shNNMT respecto a los shNT. (C) Imágenes representativas de la expresión de α -SMA (verde) y NNMT (rojo) medidas por inmunofluorescencia, los núcleos aparecen teñidos con Hoechst 3342 en azul. Los resultados se muestran como expresión relativa al control (shNT). N=8 shNT y N=8 shNNMT. ** $p < 0,01$ comparado al grupo shNT.

5.1.2. EL SILENCIAMIENTO DE NNMT EN FIBROBLASTOS FPI PRODUCE UNA DISMINUCIÓN DE LOS MARCADORES DE SENESCENCIA

Está ampliamente descrito que los fibroblastos fibróticos son células más senescentes que los fibroblastos control y en este trabajo se ha demostrado previamente que NNMT podría estar directamente implicada con el desarrollo del proceso fibrótico y la adquisición del fenotipo miofibroblasto. Con estas premisas, nos propusimos determinar si se producía algún cambio en el marco de la senescencia tras la represión de NNMT en poblaciones de fibroblastos.

La Figura 49 muestra que el silenciamiento de NNMT en los fibroblastos fibróticos (shNNMT) produce una disminución significativa de los niveles de expresión génica de *p16* y de *p21* respecto a los shNT.

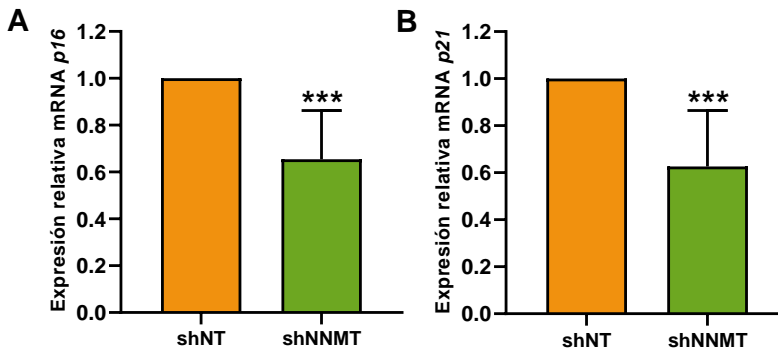


Figura 49: Expresión relativa de mRNA de *p16* y *p21* en fibroblastos shNT y shNNMT. Las células se sembraron en placa Petri de 6 cm y cuando alcanzaron una confluencia del 80% se extrajo su RNA para realizar posteriormente la RT-PCR de *p16* y *p21*. Los resultados se muestran como expresión de mRNA de *p16* (A) y *p21* (B) normalizada a la expresión de β -actina y relativizada a shNT. N=6 shNT y N=6 shNNMT. **p<0,01

Además, al realizar la detección cualitativa de la actividad β -galactosidasa, la tinción característica azulada de X-galactosidasa se mostró más incrementada en los cultivos de fibroblastos control (shNT) respecto a los cultivos de fibroblastos shNNMT. Este resultado corroboraría que los fibroblastos shNNMT presentan una senescencia reducida respecto a los fibroblastos shNT (Figura 50).

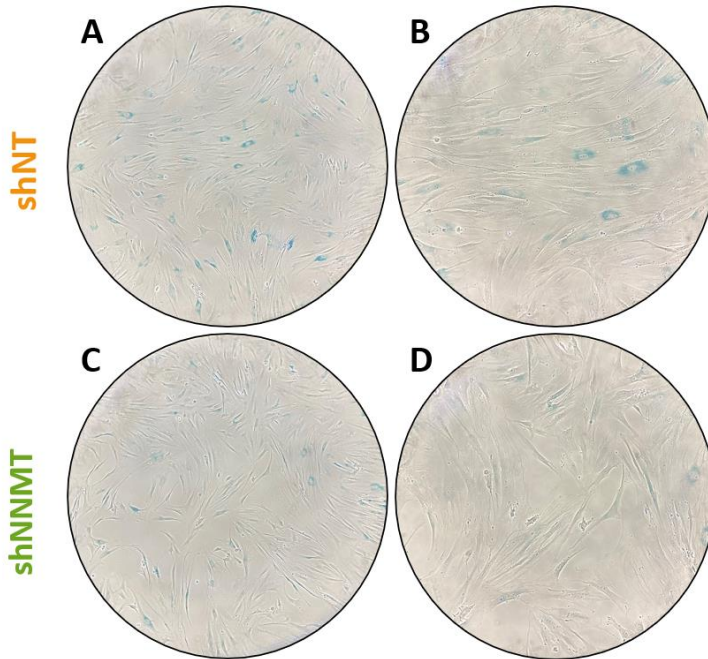


Figura 50: Imágenes representativas de la detección cualitativa de la actividad de la β -galactosidasa por tinción con X-gal de fibroblastos shNT y shNNMT. Los fibroblastos se sembraron en placas de 6 pocillos y cuando alcanzaron el 80% de confluencia se inició el protocolo especificado por el fabricante. A y C: 100x; B y D: 200x. Estos resultados son representativos de un estudio con 4 pacientes por grupo.

5.1.3. CIERRE DEL ÁREA DE CORTE A 24H Y 48H POR POBLACIONES DE FIBROBLASTOS SHNT Y SHNNMT.

A continuación, con el fin de estudiar la funcionalidad de los fibroblastos con la NNMT silenciada respecto a los controles, se midió la capacidad de cierre de una herida *in vitro*, un parámetro muy utilizado para evaluar la capacidad de migración y proliferación de un cultivo celular. Con este objetivo, se sembraron los fibroblastos en placas de 6 pocillos. Una vez habían alcanzado un 90% de confluencia, se incubaron durante 24 horas con medio 1% de SBF. Posteriormente, se realizó un corte en la monocapa celular con una punta de pipeta y después de cambiar el medio con o sin mitomicina C (1,5 µg/ml) se fotografió el cultivo a tiempo 0 y a intervalos regulares para seguir la evolución de la herida (24 y 48 horas). Se midió el área de la herida a 0, 24 y 48h mediante el programa de análisis de imagen *ImageJ* y se calculó el área de cierre durante estos intervalos con la diferencia entre la herida inicial (0h) y las 24 y 48h. (Figura 52).

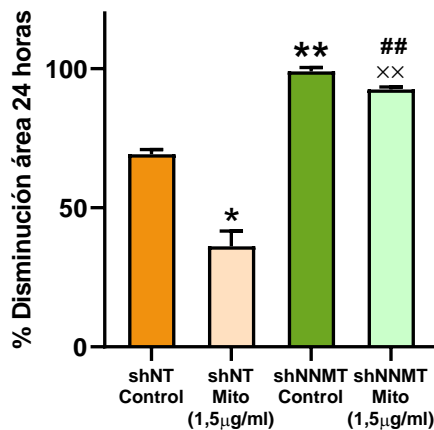


Figura 51: Área cerrada por fibroblastos shNT y shNNMT en presencia o ausencia de Mitomicina C a 24 horas. Se realizó un corte en la monocapa celular y se fotografiaron los cultivos a tiempo 0h. Se incubaron con y sin mitomicina C (5 µg/ml) durante 24h y 48h y se fotografiaron de nuevo. Se midió la diferencia de área con el programa *Image J*. Se observa la gráfica que presenta los resultados como área cerrada por las células durante 24h. N=3 shNT y N=3 shNNMT. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto a shNT Control; ## $p < 0,01$ respecto a shNT Mito 1,5 µg/ml y xx $p < 0,01$ respecto a shNNMT Control.

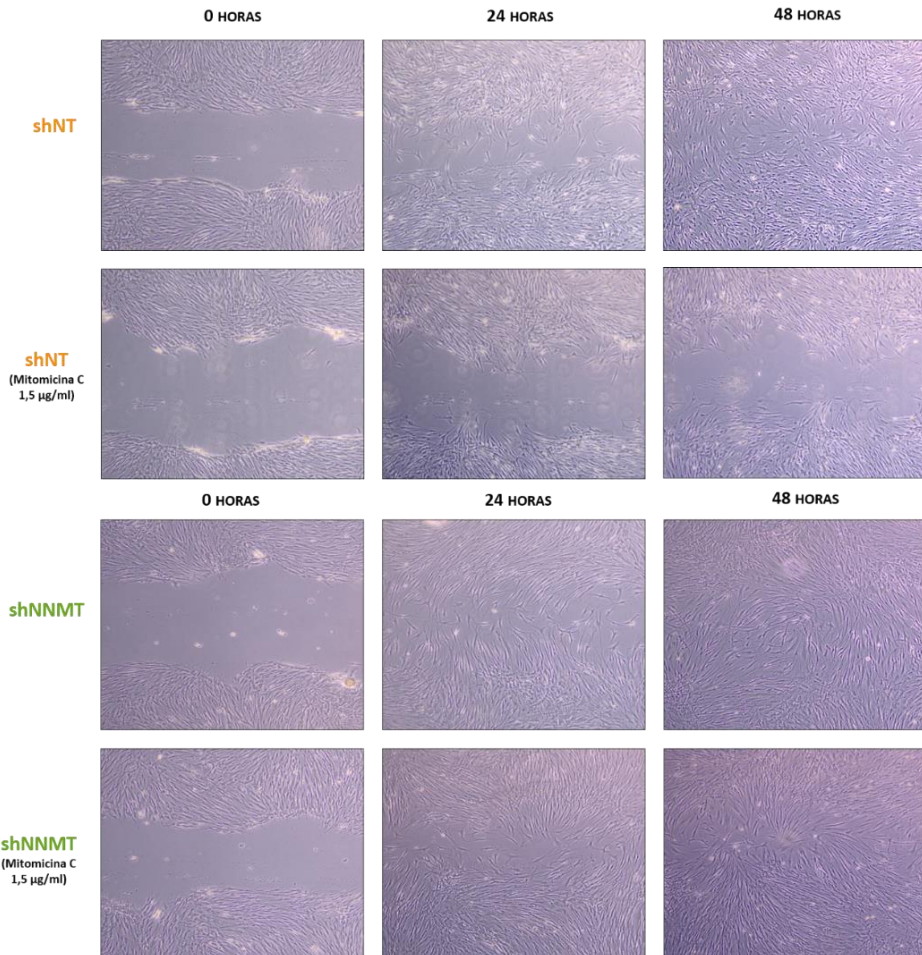


Figura 52: Área cerrada por fibroblastos shNT y shNNMT en presencia o ausencia de Mitomicina C a 24 y 48 horas. Se realizó un corte en la monocapa celular y se fotografiaron los cultivos a tiempo 0h. Se incubaron con y sin mitomicina C (5 µg/ml) durante 24h y 48h y se fotografiaron de nuevo. Imágenes representativas de campo claro del cierre de una herida *in vitro* a 0, 24 y 48h (x50). N=3 shNT y N=3 shNNMT

En la Figura 52, se observa que el área cerrada por los fibroblastos shNT es significativamente inferior a la cerrada por los fibroblastos shNNMT control 24 horas después de realizar la herida en el cultivo. Por tanto, los cultivos que tienen reprimida NNMT y que, en principio, serían menos ricos en miofibroblastos, presentaron una capacidad de cierre de la herida *in vitro* aumentada.

La mitomicina C disminuyó el área cerrada en todas las condiciones. Este hecho indica que la inhibición de la proliferación disminuye la capacidad de cierre de una herida *in vitro* de fibroblastos shNT y shNNMT en comparación a los no tratados. Sin embargo, a pesar del tratamiento con mitomicina C, los fibroblastos shNNMT continuaron presentando un aumento significativo de la capacidad de cierre de la herida respecto a los shNT en las mismas condiciones.

A las 48 horas, algunas de las diferencias existentes a 24 horas se fueron perdiendo, ya que exceptuando a la población de fibroblastos shNT tratados con mitomicina C que consiguió cerrar un 61,59% la herida, todos fueron capaces de cerrar por completo la herida (100%). De este modo, podría afirmarse que, a las 48 horas, los fibroblastos shNNMT tratados con mitomicina son capaces de cerrar un 48,41% más la herida respecto a los shNT en las mismas condiciones.

5.1.4. EFECTO DEL TGF- β 1 COMO INDUCTOR DE LA FIBROSIS Y LA IL-1 β EN FIBROBLASTOS CON LA NNMT SILENCIADA.

Los fibroblastos shNT y shNNMT se cultivaron en presencia y ausencia de TGF- β 1 (5 ng/ml, 72horas) e IL-1 β (10 ng/ml, 72 horas). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 53. El TGF- β 1 es capaz de inducir la expresión de los siguientes marcadores: α -SMA, fibronectina (FN1), N-cadherina (CDH2), FAP, SNAI1, y NNMT; en los fibroblastos shNT y shNNMT. Por su parte, la IL-1 β disminuye ligeramente el α -SMA y la NNMT en los fibroblastos shNT y shNNMT, y SNA1 en los fibroblastos shNNMT.

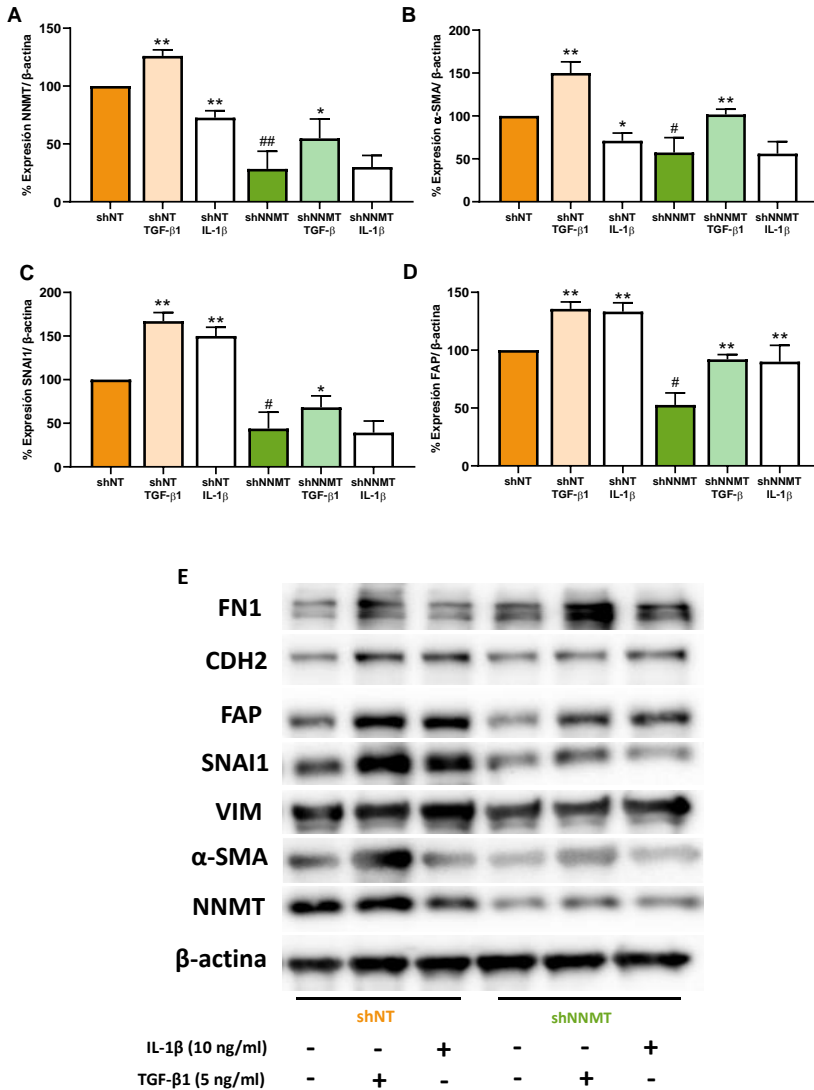


Figura 53: Expresión de diferentes marcadores fibróticos, mesenquimales y NNMT en fibroblastos shNT y shNNMT cultivados en presencia o ausencia de TGF-β1 o IL-1β. Las células se sembraron en placas de 10 cm con medio normal y a las 24 horas se les renovó el medio con o sin TGF-β1 (5 ng/ml) o IL-1β (10 ng/ml). Tras 72 horas de tratamiento se lisaron las células y los extractos proteicos se emplearon para determinar la expresión de las diferentes proteínas por *Western Blot*. Densitometrías de (A) NNMT, (B) α-SMA, (C) SNAI1 y (D) FAP. (E) Imágenes representativas de una N=4 shNT y N=4 shNNMT. *p<0,05 y ** p<0,01 respecto a su condición basal.

5.2. ESTUDIO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LA NNMT EN LOS FIBROBLASTOS ASOCIADOS A LA FPI

Tras los resultados obtenidos del silenciamiento de NNMT en fibroblastos, el siguiente propósito se centró en observar que repercusión podría tener la sobreexpresión de dicha proteína en estos fibroblastos fibróticos. Con este objetivo, se consiguió sobreexpresar la NNMT en un total de 4 poblaciones de fibroblastos fibróticos mediante el uso de partículas lentivirales. Las poblaciones de fibroblastos con la NNMT sobreexpresada pasarán a llamarse NNMT y sus controles de sobreexpresión Flag.

Tras la sobreexpresión, el primer paso consistió en evaluar la eficacia de esta mediante la determinación de los niveles de expresión proteica de NNMT en las poblaciones de fibroblastos NNMT respecto a las Flag. La Figura 54 muestra que se produjo un incremento muy significativo en la expresión de NNMT en los fibroblastos con la NNMT sobreexpresada respecto a los controles. Más concretamente el porcentaje de sobreexpresión medio de las 4 parejas fue del 500% aproximadamente. En la imagen representativa del *Western Blot* se puede observar que en las condiciones de sobreexpresión de NNMT aparece una doble banda a los 29 kDa que se corresponde con NNMT. Más concretamente, la banda inferior y menos intensa es la NNMT endógena, mientras que la banda superior y más intensa se corresponde con la NNMT resultado de la sobreexpresión con el vector lentiviral (NNMT pExp)(Hong, Zhai y Pissios 2018).

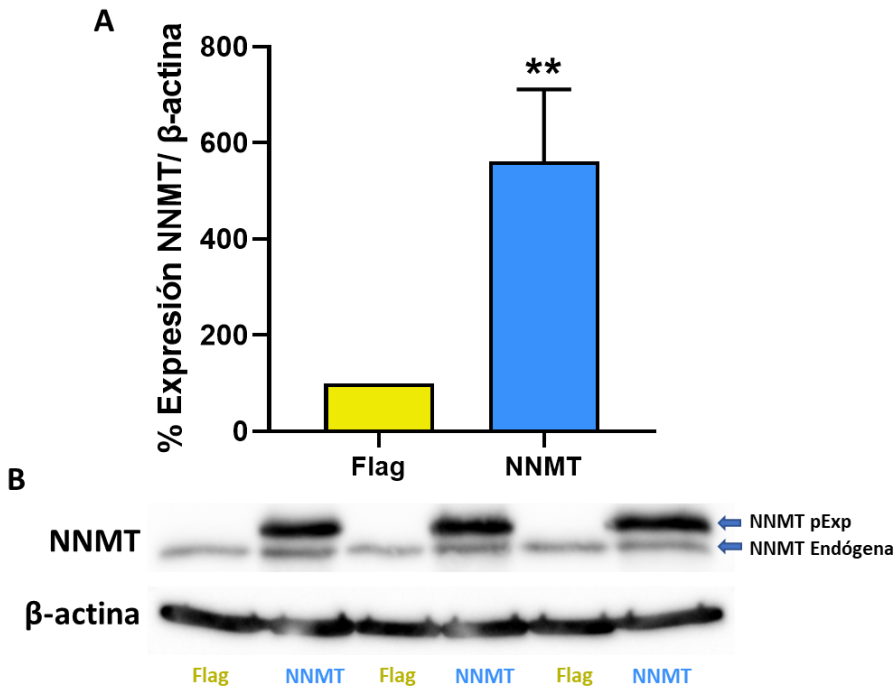


Figura 54: Sobreexpresión de NNMT en fibroblastos FPI mediante la infección lentiviral de partículas pExprNA. *Western Blot*. Los extractos proteicos de los fibroblastos Flag y NNMT fueron empleados para medir la expresión proteica de NNMT por *Western Blot*. (A) Densitometría de la expresión de NNMT como % respecto a la β-actina. (B) Imagen representativa de un *Western Blot* de NNMT y β-actina. Los resultados se muestran como expresión relativa a Flag. N=4 Flag y N=4 NNMT. **p<0,01 comparado al Flag.

Además, la eficacia de la sobreexpresión de NNMT se corroboró determinando los niveles de expresión génica de *NNMT*. El panel A de la Figura 55 muestra que los niveles de NNMT están significativamente elevados en los fibroblastos NNMT respecto a los fibroblastos Flag. También se corroboró la sobreexpresión de NNMT utilizando la técnica de inmunofluorescencia mediante tinción específica con anticuerpos anti-NNMT. Los resultados nos muestran que la infección con lentivirus produce una gran intensidad de marcaje de NNMT en las células sobreexpresadas respecto a los controles. En estos cultivos, casi la totalidad de los fibroblastos presentes son NNMT positivos (Figura 55 panel C).

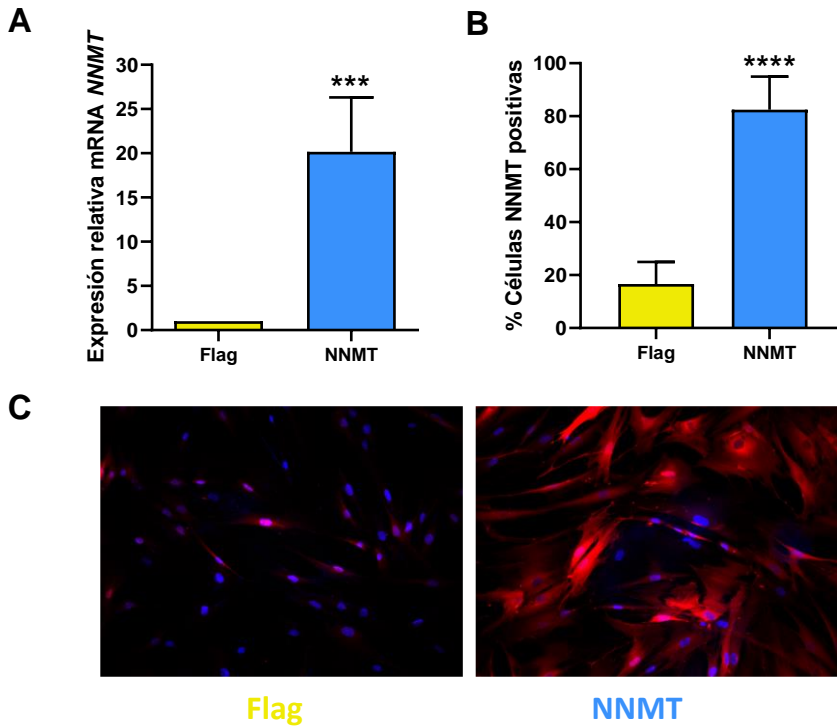


Figura 55: Sobreexpresión de NNMT en fibroblastos FPI mediante la infección lentiviral de partículas pExprNA. PCR e inmunofluorescencia. Las células se sembraron en placas de 6 cm y cuando habían alcanzado el 80% de confluencia se extrajo el RNA y se procedió a realizar la RT-PCR de *NNMT*. A. mRNA de *NNMT* medido por RT-PCR normalizado por la expresión de β -actina. Por otro lado, las células se sembraron en cubreobjetos en placa de 24 pocillos y cuando habían alcanzado la subconfluencia se fijaron y se procedió a la detección de NNMT mediante anticuerpos fluorescentes específicos. (B) Gráfica que plasma el % de células NNMT positivas respecto al total de células. (C) Imágenes representativas de la expresión de NNMT medidas por inmunofluorescencia en fibroblastos NNMT y Flag, se muestra NNMT en rojo y los núcleos teñidos con Hoechst 3342 en azul. Los resultados se muestran como expresión relativa al control (Flag). N=4 Flag y N=4 NNMT. **p<0,01 comparado al grupo Flag.

La medida de la actividad NNMT en los fibroblastos sobreexpresados se vio fuertemente incrementada respecto a los fibroblastos control (Figura 56). Lo que daría a entender que la sobreexpresión tiene un efecto directo en la actividad neta de la NNMT.

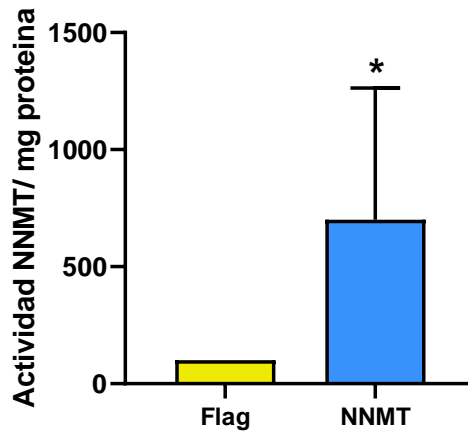


Figura 56: Medida de la actividad NNMT en fibroblastos Flag y NNMT. Las células se sembraron en un frasco T150 para obtener alrededor de 10^7 células para llevar a cabo el experimento. Previa a la lisis celular, se ajustaron el número de células en todos los cultivos. Tras la medida de la absorbancia de 1-MQ, los resultados se relativizaron a la media de los controles y se normalizaron a los mg de proteínas de cada uno de los extractos. Los resultados se expresan en % de actividad y se muestra como expresión relativa a Flag. N=4 Flag y N=4 NNMT * $p < 0,05$ comparado a Flag.

5.2.1. LA SOBREENPRESIÓN DE NNMT EN FIBROBLASTOS FPI PRODUCE UN AUMENTO DE LOS MARCADORES FIBRÓTICOS Y DE EMT

Tras la obtención de las poblaciones de fibroblastos sobreexpresados, se procedió a estudiar el efecto que podría tener la sobreexpresión de NNMT en la expresión de diferentes marcadores característicos del proceso fibrótico y EMT.

La Figura 57 muestra que los fibroblastos NNMT presentan un aumento significativo en la expresión proteica de marcadores fibróticos como el α -SMA y la FN1, marcadores mesenquimales como SNAI1 y CDH2 y FAP, respecto a los fibroblastos Flag.

Estos resultados indican que la sobreexpresión de NNMT es capaz de incrementar los niveles de marcadores fibróticos y mesenquimales o, en otras palabras, que es capaz de inducir el proceso FMT y EMT asociado a fibroblastos fibróticos de FPI.

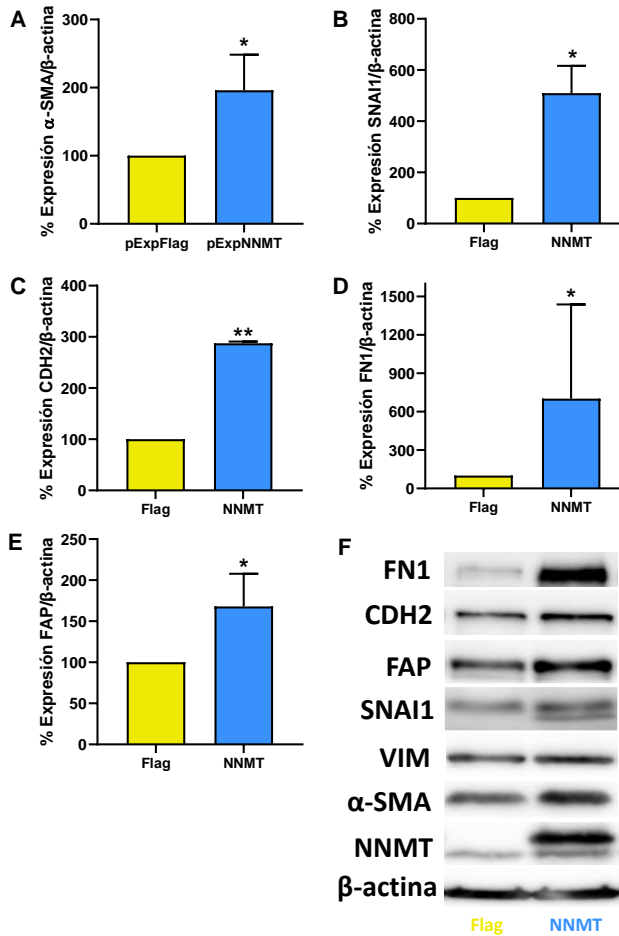


Figura 57: Incremento de los marcadores fibróticos y EMT en fibroblastos FPI con la NNMT sobreexpresada. Western Blot. Los extractos proteicos de los fibroblastos Flag y NNMT fueron empleados para medir la expresión de diversos marcadores fibróticos y mesenquimales mediante *Western Blot*. Se observan las densitometrías de α -SMA (A), SNAI1 (B), CDH2 (C), FN1 (D) y FAP (E) expresadas como % de expresión normalizadas a la β -actina. (F) Imágenes representativas de un *Western Blot* de los diferentes marcadores y la β -actina. Los resultados se muestran como expresión relativa a Flag. N=4 Flag y N=4 NNMT. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ comparado al Flag.

También se determinó la expresión génica de *ACTA2* por RT-PCR. Los resultados obtenidos corroboran un incremento significativo de la expresión del gen *ACTA2* en los fibroblastos NNMT respecto a los Flag (Figura 58).

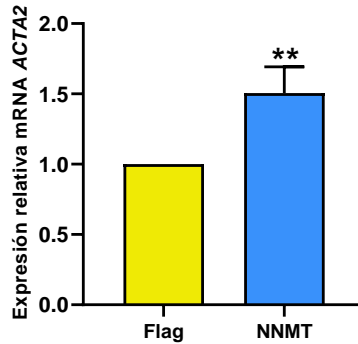


Figura 58: Aumento del gen *ACTA2* en fibroblastos NNMT. RT-PCR. Las células se sembraron en placas de 6 cm y cuando habían alcanzado el 80% de confluencia se extrajo el RNA y se procedió a realizar la RT-PCR de *ACTA2*. Se observa la expresión relativa mRNA de NNMT medido por RT-PCR normalizado por la expresión de β -actina. Los resultados se muestran como expresión relativa al control (Flag). N=4 Flag y N=4 NNMT. **p<0,01 comparado al grupo Flag.

Del mismo modo que en los fibroblastos shNNMT, decidimos estudiar mediante anticuerpos fluorescentes y microscopía la expresión conjunta de α -SMA en los fibroblastos con NNMT sobreexpresada y la posible coexpresión que podría haber de ambas proteínas. La Figura 59 muestra que los niveles de α -SMA y NNMT están aumentados significativamente en los fibroblastos NNMT respecto a los Flag y, a su vez, que hay un aumento en la coexpresión de ambas proteínas en los fibroblastos NNMT. Este resultado sugiere que la NNMT que aparece como producto de la sobreexpresión está asociada al fenotipo miofibroblasto, puesto que hay un mayor número de células α -SMA positivas coexpresando NNMT al mismo tiempo. Por tanto, la NNMT juega un papel clave en la inducción del fenotipo miofibroblasto y mesenquimal, y estaría relacionada directamente con la expresión de α -SMA en el proceso FMT que sufren los fibroblastos asociados a la fibrosis.

5.3. LA SOBREENEXPRESIÓN DE NNMT EN FIBROBLASTOS FPI PRODUCE UN AUMENTO DE LOS MARCADORES DE SENESCENCIA

Tras los resultados obtenidos anteriormente, el siguiente paso se centró en determinar si la sobreexpresión de NNMT era capaz de producir algún efecto en los marcadores de senescencia de los fibroblastos NNMT respecto los Flag.

Al medir por RT-PCR la expresión génica de los marcadores asociados a la senescencia *p16* y *p21* en fibroblastos NNMT, se observó un aumento significativo de los mismos respecto a los fibroblastos Flag (Figura 60).

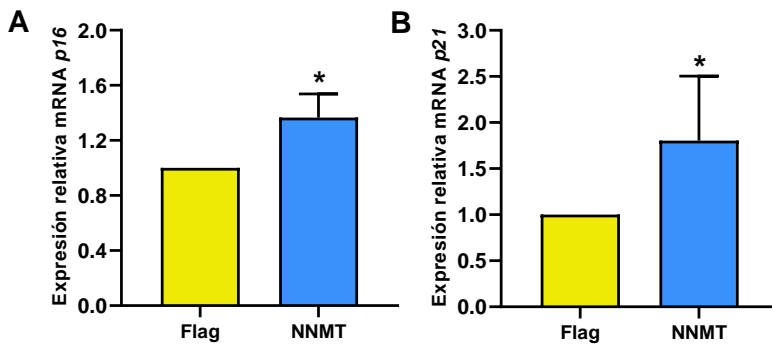


Figura 60: Expresión relativa de mRNA de *p16* y *p21* en fibroblastos Flag y NNMT. Las células se sembraron en placa Petri de 6 cm y cuando alcanzaron una confluencia del 80% se extrajo su RNA para realizar posteriormente la RT-PCR de *p16* y *p21*. Los resultados se muestran como expresión relativa de mRNA de *p16* (A) y *p21* (B) normalizada a la expresión de β -actina. N=4 Flag y N=4 NNMT. * $p < 0,05$

A su vez, la tinción con β -galactosidasa está más incrementada en los cultivos de fibroblastos NNMT con respecto a los cultivos de fibroblastos Flag, lo que corroboraría que los fibroblastos con la NNMT sobreexpresada además de presentar un fenotipo más fibrótico que los controles, son más senescentes respecto a los fibroblastos Flag (Figura 61).

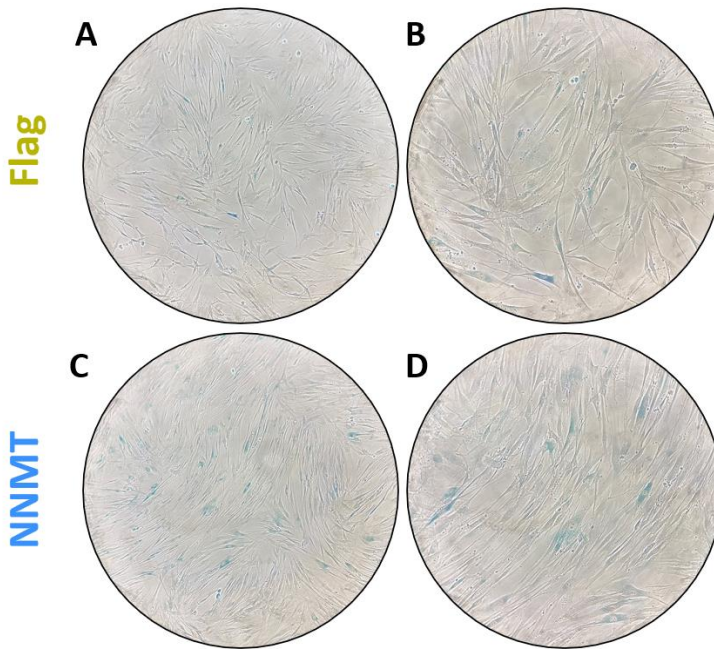


Figura 61: Imágenes representativas de la detección cualitativa de la actividad de la β -galactosidasa por tinción con X-gal de fibroblastos Flag y NNMT. Los fibroblastos se sembraron en placas de 6 pocillos y cuando alcanzaron el 80% de confluencia se inició el protocolo especificado por el fabricante. (A) y (C): 100x; (B) y (D): 200x. Estos resultados son representativos de 4 pacientes por grupo.

5.3.1. CIERRE DEL ÁREA DE CORTE A 24H Y 48H POR POBLACIONES DE FIBROBLASTOS FLAG Y NNMT

Los estudios de caracterización del fenotipo obtenido al sobreexpresar NNMT se completaron con un parámetro funcional de interés: la capacidad de cierre de una herida *in vitro*. Utilizando la técnica de *scratch*, se comparó el área cerrada por los fibroblastos con la NNMT sobreexpresada respecto a los controles.

En la Figura 62 y Figura 63, se observa que esta área cerrada por los fibroblastos NNMT es ligeramente inferior a la cerrada por los fibroblastos Flag control, 24 horas después de realizar la herida en el cultivo. Cuando ambas poblaciones de fibroblastos (Flag y NNMT) son incubadas con mitomicina (1,5 μ g/ml) esta diferencia en la capacidad de cierre de la herida se incrementa, ya que la inhibición de la proliferación permite estudiar la migración de forma

aislada. En consecuencia, los fibroblastos con la NNMT sobreexpresada y tratados con mitomicina C presentan una disminución significativa de la capacidad de cierre de la herida respecto a los fibroblastos control. Es decir, aquellas poblaciones que poseen mayor expresión de NNMT y que, por tanto, serán más ricos en miofibroblastos, presentan una capacidad de migración disminuida respecto al control.

Sin embargo, a las 48h se perdieron las diferencias existentes a 24h entre los fibroblastos Flag y NNMT, ya que todos los cultivos (en presencia y en ausencia de mitomicina), fueron capaces de cerrar por completo la herida.

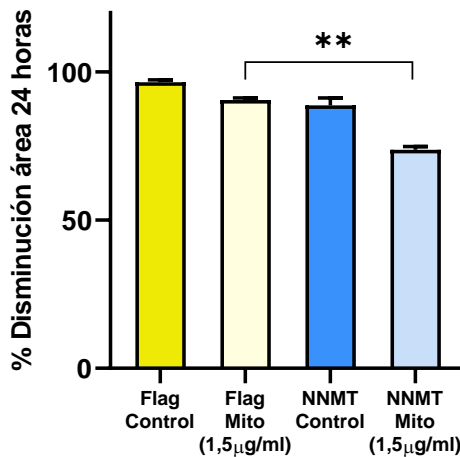


Figura 62: Área cerrada por fibroblastos Flag y NNMT en presencia o ausencia de mitomicina C a 24 y 48 horas. Se realizó un corte en la monocapa celular y se fotografiaron los cultivos a tiempo 0h. Se incubaron con y sin mitomicina C (1,5 µg/ml) durante 24h y 48h y se fotografiaron de nuevo. Se midió la diferencia de área con el programa *Image J*. Gráfica que presenta los resultados como área cerrada por las células durante 24h. N=3 Flag y N=3 NNMT. ** $p < 0,01$ respecto a Flag con mitomicina 1,5 µg/ml

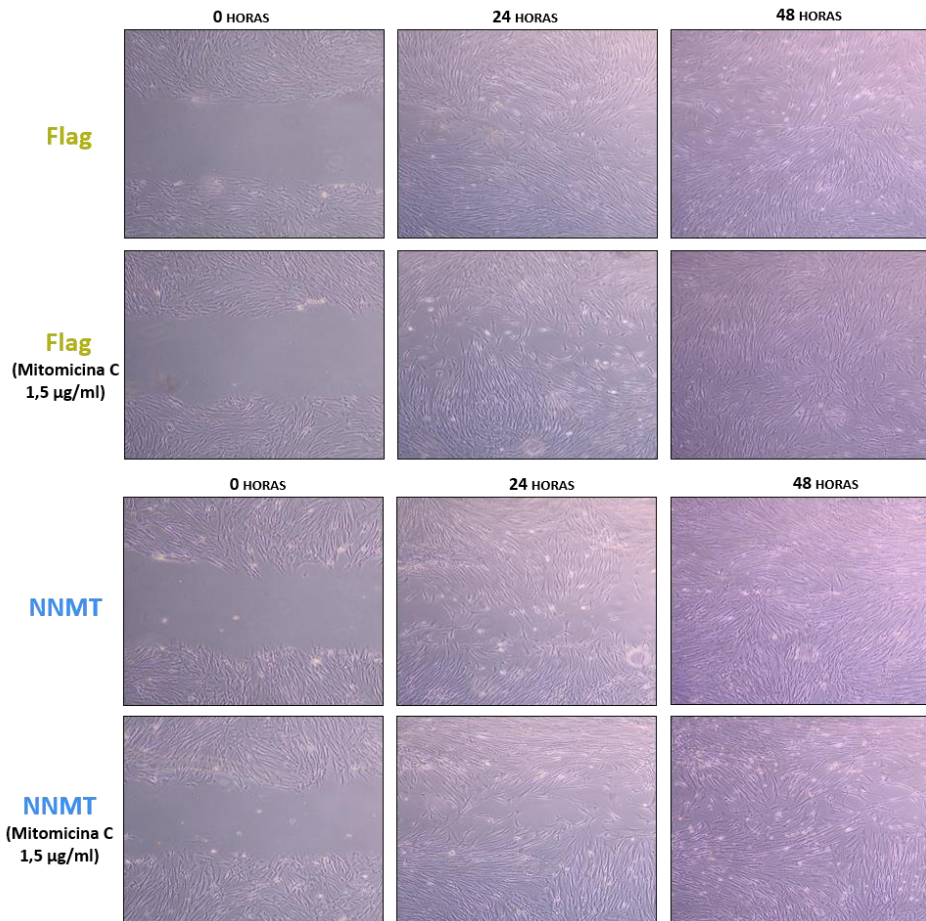


Figura 63: Área cerrada por fibroblastos Flag y NNMT en presencia o ausencia de mitomicina C a 24 y 48 horas. Se realizó un corte en la monocapa celular y se fotografiaron los cultivos a tiempo 0h. Se incubaron con y sin mitomicina C (1,5 µg/ml) durante 24h y 48h y se fotografiaron de nuevo. Imágenes representativas de campo claro del cierre de una herida *in vitro* a 0, 24 y 48h (x50) de Flag y NNMT. N=3 Flag y N=3 NNMT.

5.3.2. EFECTO DEL TGF- β 1 COMO INDUCTOR DE LA FIBROSIS Y LA IL-1 β EN FIBROBLASTOS CON LA NNMT SOBREEXPRESADA.

Los fibroblastos NNMT y Flag se cultivaron en presencia y ausencia de TGF- β 1 (5 ng/ml, 72 horas) e IL-1 β (10 ng/ml, 72 horas). La Figura 64 muestra la tendencia del TGF- β 1 de inducir la expresión de los marcadores NNMT, α -SMA, FAP, SNAI1, fibronectina (FN1) y n-cadherina (CDH2). Esta inducción es significativa en la expresión de α -SMA y SNAI1 de los fibroblastos Flag y de FAP en los fibroblastos NNMT. Por su parte, la IL-1 β disminuye significativamente los niveles de expresión de NNMT en los fibroblastos control, α -SMA en los fibroblastos con la NNMT sobreexpresada y SNAI1 en ambos grupos.

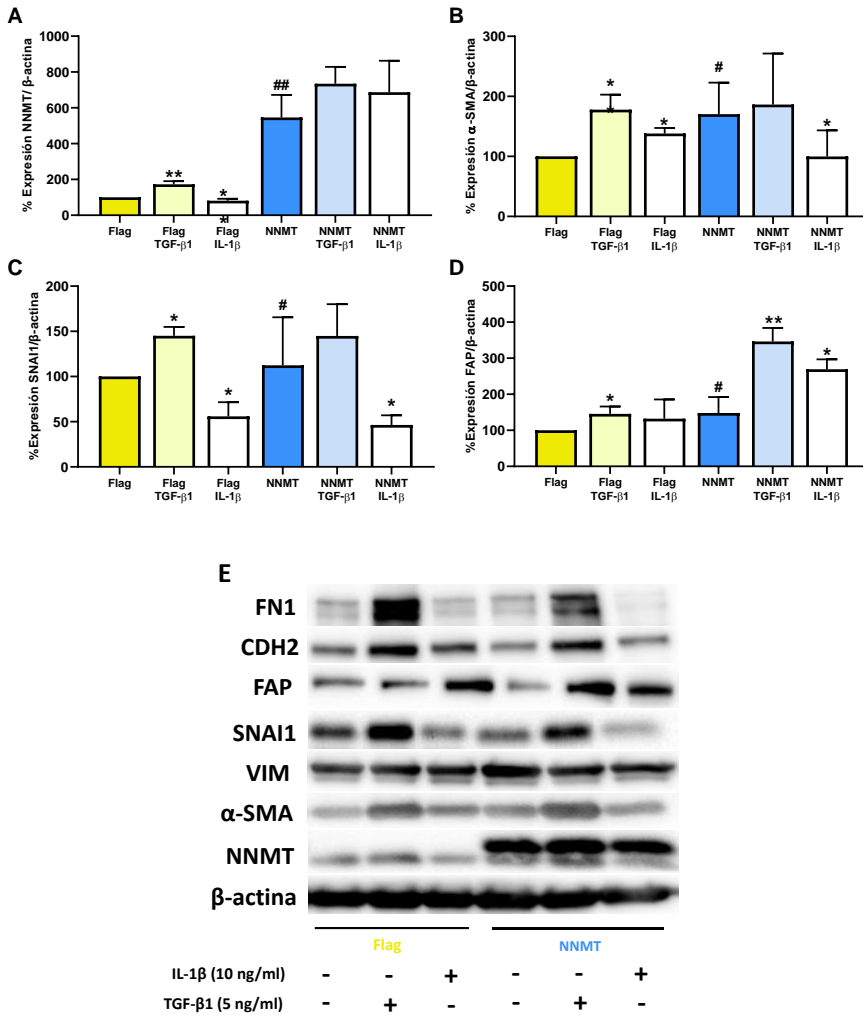


Figura 64: Expresión de diferentes marcadores fibróticos, mesenquimales y NNMT en fibroblastos Flag y NNMT cultivados en presencia o ausencia de TGF-β1 o IL-1β. Las células se sembraron en placas de 10 cm con medio normal y a las 24 horas se les renovó el medio con o sin TGF-β1 (5 ng/ml) o IL-1β (10 ng/ml). Tras 72 horas de tratamiento se lisaron las células y los extractos proteicos se emplearon para determinar la expresión de las diferentes proteínas por *Western Blot*. Se observan las densitometrías de (A) NNMT, (B) α-SMA, (C) SNAI1, (D) FAP. (E) Imagen representativa de una N=4 Flag y N=4 NNMT. *p<0,05 y **p<0,01 respecto a su condición basal y #p<0,05 y ##p<0,01 respecto a Flag.

6. LA ACTIVIDAD NNMT Y LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO CELULAR EN LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

Debido a la actividad enzimática de NNMT, su implicación en diferentes e importantes rutas metabólicas y su importancia en el contexto fibrótico, se estudió la capacidad metiladora de NNMT y los efectos que esto podría suponer en el metabolismo de los fibroblastos de FPI y controles.

La detección de los diferentes metabolitos se llevó a cabo mediante espectrometría de masas. Se midieron las variaciones en los metabolitos implicados en la ruta de la metionina y la ruta de las poliaminas (ruta secundaria) en poblaciones de fibroblastos control respecto a los fibroblastos de FPI y de fibroblastos shNNMT silenciada respecto a fibroblastos shNT.

La Figura 65 muestra que los niveles de 1-MNA y nicotinamida (NAM) están elevados y disminuidos significativa y respectivamente en los fibroblastos FPI respecto a los controles. Esto se debe a que los fibroblastos fibróticos presentan una mayor actividad de NNMT, por tener niveles elevados de esta. Aunque sí que existe una disminución de SAM en los fibroblastos FPI, no se observan cambios significativos en los niveles de SAH. A pesar de que los niveles de 5-MTA están disminuidos en los fibroblastos de FPI respecto a los controles, se observa un incremento significativo de las poliaminas espermina y espermidina en estas poblaciones de fibroblastos fibróticos. Los niveles de NAD⁺ no mostraron cambios evidentes.

Por otro lado, la Figura 66 muestra que los fibroblastos con la NNMT silenciada presentan niveles de 1-MNA disminuidos y niveles de NAM elevados respecto a sus controles. Esto se debe a que al verse la actividad de NNMT reprimida no se produce la metilación de la nicotinamida originando 1-MNA, por lo que esta última no se acumula. Los niveles de SAM no se ven prácticamente alterados, mientras que los niveles de SAH presentan una disminución significativa en los fibroblastos shNNMT. En este caso, los niveles de poliaminas se encuentran incrementados en los fibroblastos shNNMT respecto a sus controles (shNT). Los niveles de 5-MTA y NAD⁺ permanecen prácticamente invariables.

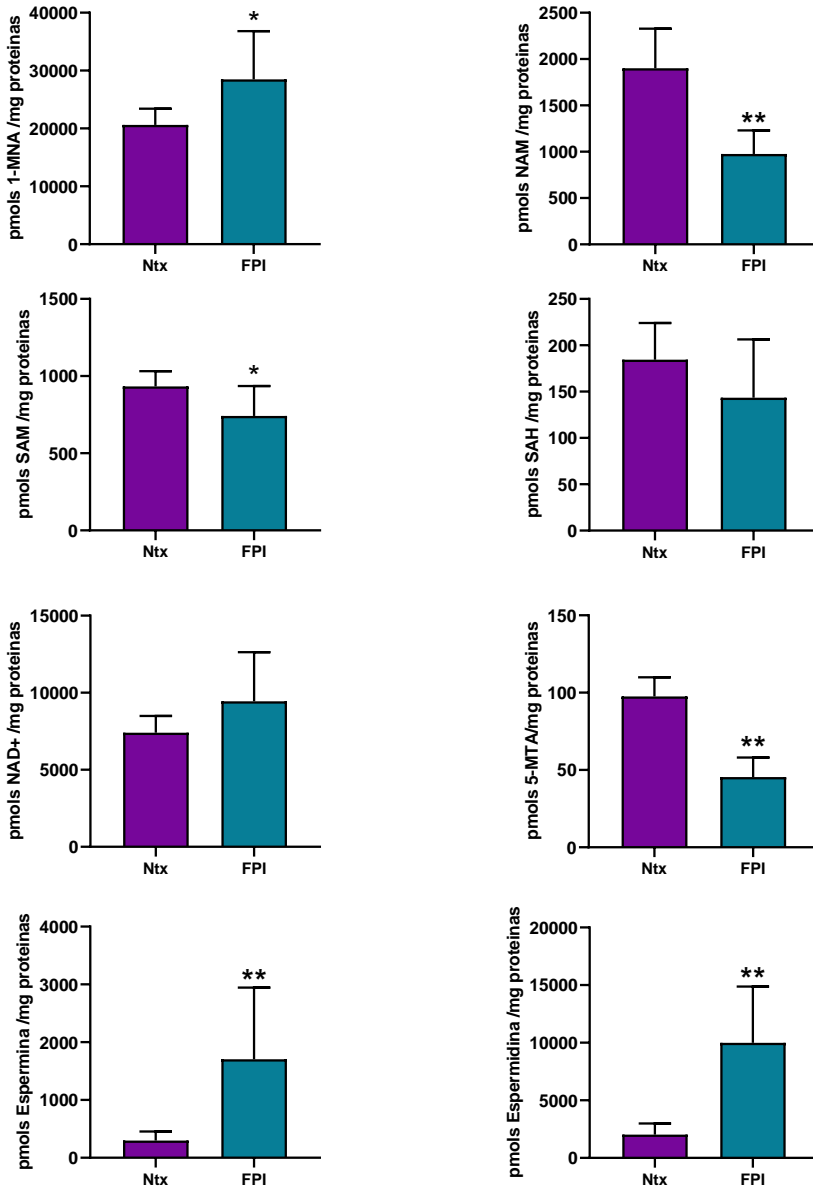


Figura 65: Adaptaciones metabólicas en fibroblastos de FPI y control. Panel de metabolitos medidos por UPLC-MS/MS de los fibroblastos de FPI y control. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ en comparación con el grupo control (N=3)

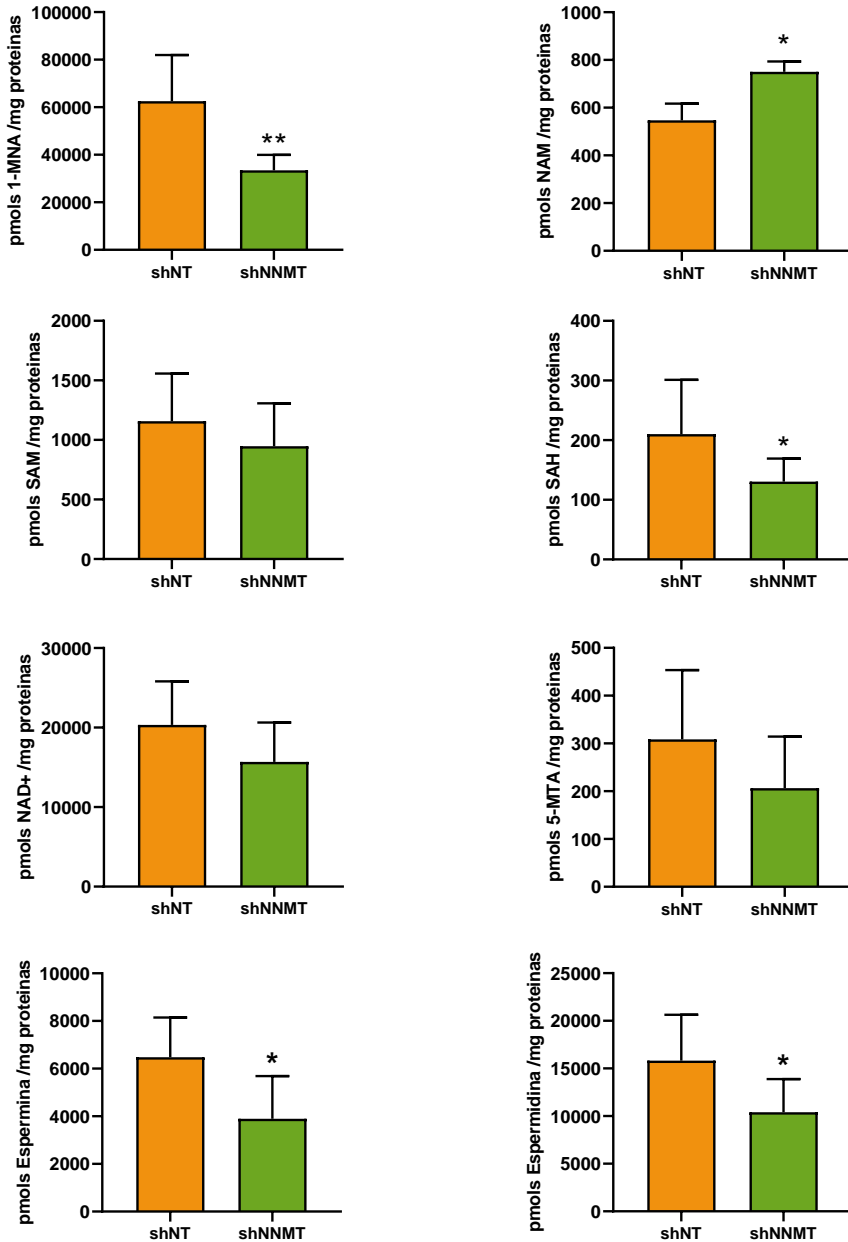


Figura 66: Adaptaciones metabólicas entre fibroblastos shNT y shNNMT. Panel de metabolitos medidos por UPLC-MS/MS de los fibroblastos de shNT y shNNMT. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ en comparación con los fibroblastos shNT (N=3)

7. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS EN MUESTRAS DE PACIENTES CON FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

Para completar este estudio, decidimos determinar los niveles proteicos de NNMT en muestras de tejido pulmonar enfermo. Utilizamos tejido parafinado que provenía de los mismos pacientes de los que habíamos aislado las poblaciones de fibroblastos y miofibroblastos FPI y control (neumotórax). La tinción de NNMT se acompañó de una tinción con hematoxilina/eosina, un tricrómico de Masson y una tinción específica para α -SMA, lo que permitió analizar de manera más objetiva y concreta las zonas con focos fibróticos y proliferación de fibroblastos y miofibroblastos, así como una posible coexpresión de α -SMA/NNMT.

Las microfotografías de la Figura 67 muestran los resultados obtenidos en las tinciones realizadas en los cortes obtenidos de pacientes control (panel A) y fibróticos (panel B). Las imágenes representativas de los controles muestran un pulmón enfisematoso, como consecuencia de las bullas que se forman al producirse un neumotórax. En la tinción del tricrómico se pueden observar haces de colágeno estructural (color azul). En la tinción de α -SMA la positividad se corresponde con las paredes de los vasos y capilares sanguíneos y están ausentes focos de fibroblastos/ miofibroblastos. La tinción de NNMT en los controles es inexistente prácticamente a lo largo de toda la muestra, aunque aparece esporádicamente tiñendo algunas células epiteliales.

Por otro lado, en el panel B de la Figura 67 se muestran imágenes de zonas fibróticas activas presentes en cortes obtenidos de pacientes con FPI. Se puede observar abundante colágeno distribuido por toda la muestra en la tinción del tricrómico de los diferentes pacientes. La positividad del α -SMA no sólo se atribuye a los vasos y capilares sanguíneos, sino que también aparece tiñendo a las células del estroma que, por su morfología, parecen ser focos de fibroblastos-miofibroblasto. Muchas de estas células positivas a α -SMA también tienen positividad en la tinción con NNMT, por lo que se podría afirmar una coexpresión α -SMA/NNMT en dichas poblaciones de fibroblastos-miofibroblastos.

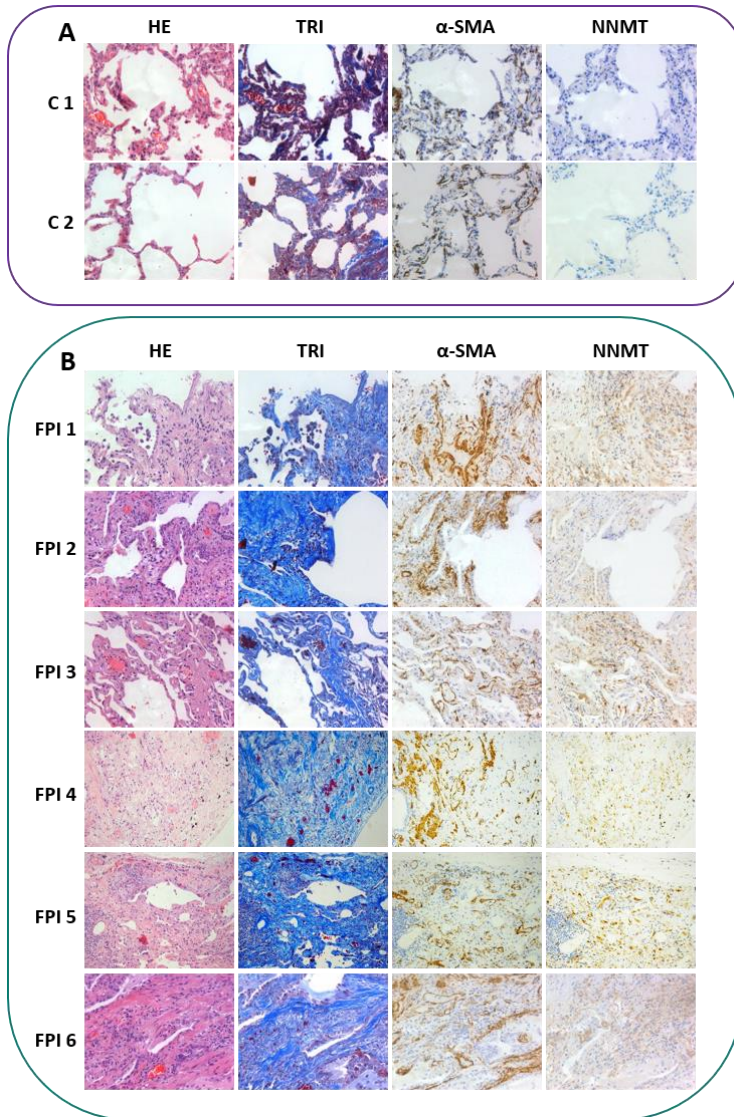


Figura 67: Análisis inmunohistoquímico de Hematoxilina/ eosina, Tricrómico de Masson y tinciones de α -SMA y NNMT en cortes pulmonares procedentes de pacientes con FPI y control. Se obtuvieron cortes a partir de bloques de parafina de las biopsias pulmonares de control (A) y FPI (B). Tras el montaje y desparafinado, se hicieron tinciones seriadas de eosina/hematoxilina y tricrómico de Masson siguiendo los protocolos establecidos. Otros cortes se tiñeron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-NNMT o bien con un anticuerpo monoclonal de ratón anti- α -SMA y se revelaron con un anticuerpo secundario *anti-mouse*-HRP y el cromógeno DAB. HE: tinción de Eosina/hematoxilina; TRI: tricrómico de Masson; α -SMA: tinción específica de α -SMA; NNMT: tinción específica de NNMT.

Tras el proceso de elaboración y análisis de las muestras de los diferentes cortes procedentes de pacientes, se estableció un criterio para la identificación y clasificación de los focos fibróticos, según el grado de madurez o desarrollo de estos. Los rasgos más característicos se recogen en la Tabla 17.

Tabla 17: Clasificación de los focos fibróticos según sus características inmunohistoquímicas.

FIBROSIS REACTIVA	FIBROSIS CICATRIZANTE
<p>Colágeno: menos denso, más laxo. Se visualiza en la tinción del tricrómico de un color azul más claro, pero sigue siendo muy abundante.</p>	<p>Colágeno: más denso, menos laxo. Se visualiza en la tinción del tricrómico de un color azul muy oscuro y es muy abundante</p>
<p>Más celularidad. Presencia de fibroblastos y miofibroblastos en el foco fibrótico</p>	<p>Menos celularidad. Ausencia de fibroblastos y miofibroblastos en el foco fibrótico. Incluso en ocasiones, si la fibrosis es muy avanzada, puede ser una región sin células prácticamente.</p>
<p>Cotinción: Se encuentra frecuente y evidente cotinción α-SMA/NNMT. Hay FMT y las células presentes son más activas</p>	<p>Cotinción: la tinción de α-SMA y NNMT es prácticamente inexistente a nivel de fibroblastos y miofibroblastos, porque no están presentes. Se trata de un tejido cicatrizante afuncional del pulmón (pulmón colapsado)</p>

Las microfotografías de la Figura 68 muestran tinciones de hematoxilina/ eosina, tricrómico de Masson, tinción de α -SMA y tinción de NNMT de una zona de fibrosis reactiva (parte superior) y una zona de fibrosis más avanzada (parte inferior). Más concretamente el patrón que se observa en la fibrosis reactiva se corresponde con una bronquiolitis obliterante, patrón generalmente asociado a la Neumonía Intersticial Usual (NIU), que determina que el paciente se diagnostique como FPI. Se caracteriza por la presencia de yemas fibrosas con gran cantidad de fibroblastos y miofibroblastos activos que mayoritariamente presentan una cotinción para α -SMA y NNMT, rodeados por abundante colágeno de color azul. Por otro lado, en las imágenes representativas de la fibrosis cicatrizante, han desaparecido las estructuras alveolares y aparecen principalmente los bronquios terminales únicamente. Se

observan quistes llenos de estroma fibroso, como si se tratara de una cicatriz. La tinción de α -SMA se corresponde con músculo liso que aparece formando haces muy maduros y músculo liso estructural de las paredes de las estructuras bronco-alveolares. La tinción de NNMT es negativa, resultado que podría atribuirse al hecho de que es una fibrosis en estadio muy avanzado de modo que ya no quedan estructuras fibroblásticas y miofibroblásticas. Es un pulmón no funcional en el que resulta imposible el intercambio de gases.

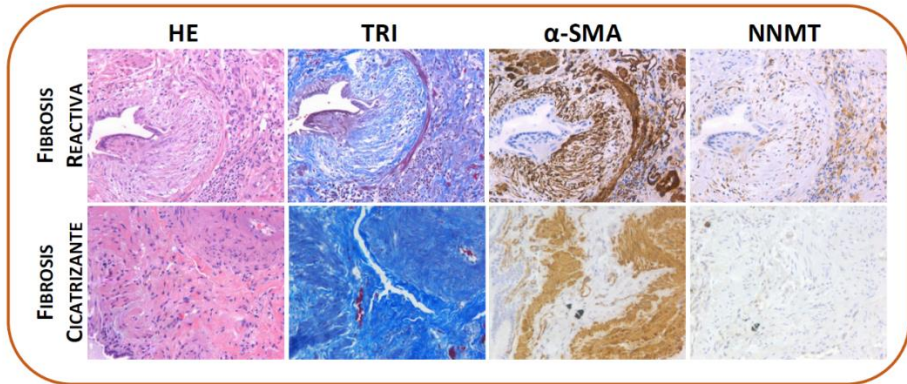


Figura 68: Análisis inmunohistoquímico de hematoxilina/eosina, tricrómico de Masson y tinciones de α -SMA y NNMT en cortes pulmonares de pacientes con FPI. Se obtuvieron cortes a partir de bloques de parafina de las biopsias pulmonares de pacientes con FPI. Tras el montaje y desparafinado, se hicieron tinciones seriadas de eosina/hematoxilina y tricrómico de Masson siguiendo los protocolos establecidos. Otros cortes se tiñeron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-NNMT o bien con un anticuerpo monoclonal de ratón anti- α -SMA y se revelaron con un anticuerpo secundario *anti-mouse*-HRP y el cromógeno DAB. HE: tinción de eosina/hematoxilina; TRI: tricrómico de Masson; α -SMA: tinción específica de α -SMA; NNMT: tinción específica de NNMT.

V. DISCUSIÓN

1. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE FIBROBLASTOS Y MIOFIBROBLASTOS EN CULTIVOS PRIMARIOS CONTROL Y DE FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

La dificultad clínica de la fibrosis pulmonar idiopática estriba en varias importantes características que la convierten en una enfermedad de difícil diagnóstico y de mal pronóstico. Por un lado, la ausencia de manifestaciones específicas y tempranas de la FPI es un obstáculo para la detección precoz de esta neumonía intersticial fibrosante. Por otro lado, su diagnóstico requiere de un algoritmo de compleja ejecución en el que un comité de expertos multidisciplinar debe evaluar las pruebas funcionales, radiológicas e histológicas con el fin de establecer un diagnóstico en consenso para incrementar la precisión diagnóstica. Además, el desconocimiento de la causa que la produce y, de los mecanismos específicos que la perpetúan, dificultan su abordaje.

Numerosos estudios clínicos han demostrado la ineffectividad de diferentes fármacos para el tratamiento de la FPI, como el caso del ambrisentán (inhibidor de la endotelina-1) (Ganesh Raghu *et al.* 2013) warfarina (anticoagulante) (Noth *et al.* 2012), imatinib (inhibidor de la tirosín quinasa) (Daniels *et al.* 2010) o la combinación de prednisona (glucocorticoide), azatioprina (inmunosupresor) y N-acetilcisteína (antiinflamatorio) (Ganesh Raghu *et al.* 2012). En 2014, resultados de ensayos clínicos demostraron que dos fármacos antifibróticos (pirferidona y nintedanib) ralentizan el ritmo del deterioro funcional y la progresión de la enfermedad y están aprobados en todo el mundo como tratamientos para la FPI (Richeldi *et al.* 2014; King *et al.* 2014). Aunque la disponibilidad de estos medicamentos es un cambio sustancial para las personas con FPI, en la mayoría de los pacientes la enfermedad continúa progresando a pesar del tratamiento y no se vislumbra una cura efectiva en los próximos años (Spagnolo y Maher 2017).

Todas estas características establecen la urgencia y enorme utilidad de encontrar nuevos biomarcadores asociados a la patología para un diagnóstico temprano y, en el mejor de los casos, que estos puedan convertirse en posibles dianas terapéuticas. Este ha sido el propósito del presente trabajo.

La dificultad clínica que se ha descrito anteriormente se manifiesta en una dificultad científica para el estudio de la enfermedad tanto a nivel básico

como a nivel clínico. Los modelos de laboratorio para el estudio de la FPI más utilizados son el cultivo de células primarias procedentes de tejido fibrótico y los modelos animales de fibrosis pulmonar. De estos últimos, el más utilizado se basa en la instilación de bleomicina en animales de experimentación (Liu, De Los Santos y Phan 2017). En este modelo se produce una respuesta inflamatoria inicial que, después de dos semanas aproximadamente, evoluciona hacia una fase fibrótica con características similares a la FPI (Liu, De Los Santos y Phan 2017). El grado de fibrosis en respuesta a la bleomicina depende directamente de la cantidad de respuesta inflamatoria inicial. Este hecho lo diferencia de la patología en humanos, de la cual se desconoce si la inflamación tiene un papel principal (Selman, King y Pardo 2001). Otro aspecto controvertido es la resolución de la fibrosis en el modelo de bleomicina, puesto que, en la mayoría de las condiciones experimentales, la fibrosis producida es reversible. Al no emular la progresión fatal típica de la FPI y surgir de un proceso claramente inflamatorio, el modelo de bleomicina conduce a una fibrosis que no refleja completamente las características propias de la patología en humanos (Scotton y Chambers 2010). Otros modelos animales intentan reproducir con mejor fidelidad la enfermedad, como es el modelo de sobreexpresión de TGF- β 1 basado en la transferencia de cDNA de TGF- β 1 porcino mediante el uso de vectores adenovirales de replicación (Sime *et al.* 1997); el modelo de desarrollo de FPI por excesivo acortamiento telomérico (ratones con deficiencia de telomerasa) o por disfunción telomérica severa en ausencia de acortamiento de los telómeros (ratones con delección de Trf1 en células alveolares de tipo II) (Povedano *et al.* 2015); o el modelo de trasplante de AECs2 en ratón (Guillamat-Prats *et al.* 2014). Sin embargo, son modelos más complejos de abordar y de un inicio concreto y específico que no reproduce la realidad de la FPI.

El análisis y/o cultivo de células primarias procedentes de tejido fibrótico es una buena alternativa a los modelos de animales de experimentación. La obtención y cultivo de fibroblastos y/o miofibroblastos de pacientes con FPI son procedimientos sencillos y reproducibles que nos proporcionan líneas celulares que se pueden estudiar en diferentes condiciones manteniendo las características propias del tejido fibrótico. De hecho, se ha descrito que los diferentes pases *in vitro* mantienen el fenotipo miofibroblasto lo que sugiere una memoria preservada. Esta memoria estaría relacionada con la regulación de modificaciones epigenéticas, ya sea de metilación de ADN, modificación de las histonas o regulación de diversos genes a través de

miRNAs (Balestrini *et al.* 2012). Además de obtener fibroblastos de estos pacientes, podemos estudiar sus biopsias parafinadas y su historial clínico para obtener una visión contextualizada de los resultados obtenidos en el laboratorio. Las líneas celulares disponibles comercialmente no proporcionan esta valiosa información.

El papel de los fibroblastos/miofibroblastos en la fibrosis es de vital importancia en la FPI, y aparecen muy posiblemente en respuesta a un daño alveolar repetitivo. Los focos fibróticos se desarrollan principalmente por una producción excesiva de mediadores profibróticos en detrimento de mediadores antifibróticos, la senescencia prematura y persistente de las células epiteliales, la activación de fibroblastos y la acumulación progresiva de miofibroblastos y matriz extracelular produciendo una cicatrización permanente. Por su capacidad contráctil y su capacidad de secreción de proteínas de la matriz extracelular, el fenotipo miofibroblasto es clave en el mantenimiento de este estado reparativo y en la evolución de la patología. El conocimiento de los mecanismos moleculares que dirigen su capacidad fibrótica, su senescencia, metabolismo y resistencia a la apoptosis es de gran interés científico y traslacional.

Los estudios que se presentan en esta tesis se han llevado a cabo utilizando fibroblastos primarios obtenidos a partir de tejido pulmonar de individuos con neumotórax con características histológicas normales y de tejido de individuos con fibrosis pulmonar idiopática. Cabe indicar que el uso de fibroblastos procedentes de pacientes con neumotórax espontáneo como controles “normales” tiene sus limitaciones. Aunque el tejido obtenido fue histológicamente normal, estudios previos han descrito que los fibroblastos obtenidos de resecciones quirúrgicas durante una pleurodesis por neumotórax espontáneo pueden proceder de áreas con anomalías patológicas, como reacciones inflamatorias o fibróticas (Fang *et al.* 2010). Aun así, este tejido es la mejor opción para obtener pulmón sano con características normales y afectación patológica mínima, ya que no es posible obtener muestra directamente de un pulmón normal (Roca-Ferrer *et al.* 2011).

En conjunto, los cultivos de fibroblastos procedentes de tejido fibrótico nos permiten evaluar las características propias de la patología en humanos. Sin embargo, es un cultivo en un entorno artificial y de células aisladas, por lo que su comportamiento fisiopatológico podría verse modificado.

Teóricamente, la digestión realizada del tejido pulmonar empleado podría proporcionar cultivos mixtos con diferentes fenotipos celulares. Es decir,

los cultivos podrían estar contaminadas con células epiteliales, inmunitarias o endoteliales. Para corroborar la pureza de nuestras poblaciones, se realizó una caracterización de dichas células (a pase 4) mediante la determinación de marcadores característicos de estirpe mesenquimal (vimentina, α -SMA) comparándolo con otros marcadores típicos de estirpe epitelial (E-cadherina) por inmunofluorescencia (Roca-Ferrer *et al.* 2011). La totalidad de poblaciones que se emplean en estos estudios fueron positivas para vimentina, en bajo porcentaje para α -SMA, y negativas para E-cadherina, por lo que se puede afirmar que se trata de poblaciones libres de células epiteliales. Además, la microscopía de campo claro muestra una clara morfología de tipo fibroblasto en todos los cultivos.

El número de pase donde se realizan los estudios es de gran importancia por la senescencia asociada a ellos y los cambios fenotípicos que se pueden desarrollar. Los estudios comparativos entre grupos se han realizado entre los pases 4 y 7. El uso de pases equivalentes entre líneas celulares procedentes de diferentes individuos contribuye a disminuir la variabilidad en los resultados (Pechkovsky *et al.* 2012). Como modelo de senescencia, se ha utilizado hasta un pase 12 tanto en fibroblastos control como en fibroblastos de FPI. Sin embargo, se ha descrito que los fibroblastos derivados de FPI muestran características morfológicas de senescencia replicativa incluso en pasaje temprano (Vu *et al.* 2019; Yanai *et al.* 2015).

Utilizando este modelo *in vitro*, confirmamos los resultados obtenidos en estudios previos que indican que los cultivos de fibroblastos procedentes de pulmones de pacientes con FPI están caracterizados por una expresión de α -SMA incrementada (Kuhn y McDonald 1991; Ramos *et al.* 2001). Este hecho aislado no necesariamente estaría relacionado con un incremento de los miofibroblastos en estos cultivos, ya que podría ser debido a una expresión incrementada basal de α -SMA en todas las células. Por ello, fue necesario comprobar mediante inmunofluorescencia la polimerización o ensamblaje en forma de fibras de α -SMA en las células *in situ*. Gracias a esta técnica, observamos un incremento significativo en el número de miofibroblastos en los pacientes con FPI comparado con los controles. Se desconoce el motivo por el cual el número de miofibroblastos presentes en un cultivo primario de fibroblastos de pulmón procedentes de FPI es superior a un cultivo control (Phan 2012). Sin embargo, la mayor presencia inicial de miofibroblastos en el tejido fibrótico podría ser la explicación de este hallazgo, ya que, durante el desarrollo del proceso fibrótico, son diferentes los factores solubles presentes

y factores de secreción de las células que inducen la activación de los fibroblastos y su transformación a miofibroblastos, así como la generación de estos a partir de otros posibles precursores celulares. Además, la memoria de los fibroblastos ya descrita, también contribuye a este hallazgo.

Los resultados de expresión génica de *ACTA2* corroboraron niveles aumentados en los fibroblastos procedentes de FPI respecto a los fibroblastos control. Los niveles aumentados de expresión génica de *COL1A1*, *COL1A2* y *FN1* en los fibroblastos de FPI, pusieron de nuevo de manifiesto que estaban enriquecidos con miofibroblastos respecto a las poblaciones control. Se desconoce si el aumento de *COL1A1*, *COL1A2* y *FN1* responde solo al incremento de miofibroblastos o también a una expresión aumentada por parte de los fibroblastos fibróticos que no son miofibroblastos.

Aunque los procesos que dirigen la acumulación exagerada de miofibroblastos en los focos fibróticos asociados a la FPI son desconocidos con exactitud por el momento, son numerosos los estudios que proponen al TGF- β 1 como uno de los inductores principales del proceso de transformación de fibroblastos a miofibroblasto (FMT) (Carthy 2018; Upagupta *et al.* 2018) y en el modelo utilizado también juega un papel de importancia. Los fibroblastos procedentes de FPI mostraron una mayor secreción de TGF- β 1 al medio extracelular respecto a los fibroblastos controles. El TGF- β 1 liberado al medio actuaría como inductor de la FMT de los fibroblastos presentes en el cultivo, que pasarían a miofibroblastos. Este incremento de TGF- β 1 es uno de los factores que favorece y perpetúa el enriquecimiento en miofibroblastos de las poblaciones de fibroblastos procedentes de FPI respecto a las poblaciones control.

2. LOS FIBROBLASTOS DE FPI PRESENTAN UN FENOTIPO SENESCENTE INCREMENTADO RESPECTO A LOS FIBROBLASTOS CONTROL

Existe una clara evidencia de que en la patogénesis de la FPI están implicados mecanismos acelerados de envejecimiento, incluida la senescencia celular (Faner *et al.* 2012). Además, la FPI es una enfermedad asociada al envejecimiento (McDonough *et al.* 2018). La senescencia celular es un estado conservado evolutivamente de la detención replicativa estable inducida por factores estresantes prosenescentes, que incluye el acortamiento de los telómeros, el estrés oxidativo, el daño al ADN y la inestabilidad del proteoma. La acumulación de daño estimula la actividad de los inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina p16^{Ink4a} y/o p53-p21^{Cip1/Waf1}, que antagonizan quinastas dependientes de ciclina para bloquear la progresión del ciclo celular (Van Deursen 2014). Se han observado en fibroblastos y en células epiteliales de tejido pulmonar humano de FPI biomarcadores de senescencia como p16, p21 y la actividad β -galactosidasa asociada a la senescencia (Kuwano *et al.* 1996; Lomas *et al.* 2012).

Para el estudio de esta posible correlación existente entre los marcadores fibróticos y los marcadores de senescencia, se desarrolló un modelo *in vitro* de senescencia en el que poblaciones de fibroblastos control y de FPI se sometieron a pases sucesivos. Se obtuvieron poblaciones de estos fibroblastos a pase 4, 6, 9 y 12. A nivel *in vitro*, cada vez que células mortales como los fibroblastos sufren un pase, se convierten en células más senescentes, puesto que se incrementa el número de divisiones celulares realizadas y se estresan las células en el proceso de tripsinización y posterior levantamiento de la placa de cultivo. Para reducir la variabilidad experimental, las siembras y pases celulares se realizaron de forma sistemática igualando el número de células sembradas.

La medida de marcadores de senescencia p16 y p21 en estos fibroblastos demostró un aumento significativo y progresivo de los mismos, proporcional al aumento de los pases tanto en los fibroblastos control como en los fibroblastos de FPI. Estos resultados validaron el modelo de senescencia *in vitro* elegido. La actividad de la β -galactosidasa también se vio incrementada en los cultivos de fibroblastos tanto control como de FPI en pase 12 respecto a los cultivos de pase 4. Además, los marcadores fibróticos α -SMA y COL1A1

también aumentaron significativamente con el número de pases para ambos grupos. Estos resultados sugieren que el envejecimiento de los fibroblastos está asociado a un enriquecimiento del cultivo con miofibroblastos o, al menos, un aumento de la capacidad fibrótica del cultivo, ya que se produce un aumento de la expresión de α -SMA y COL1A1.

Si bien en la FPI los fibroblastos/ miofibroblastos tienen un fenotipo más senescente respecto a poblaciones control, el aumento de un número de pases de poblaciones de fibroblastos podría reproducir *in vitro* un proceso progresivo de desarrollo fibrótico. En la bibliografía, un *microarray* de pulmón humano de FPI vs. pulmón control muestra cambios transcripcionales de CDKN2A (p16), ACTA2 y COL1A1 y estos parámetros aumentan a medida que se incrementa la severidad de la FPI (Schafer *et al.* 2017).

Una vez validado el modelo de envejecimiento, utilizamos p16, p21 y la actividad de la β -galactosidasa como marcadores de senescencia en nuestros grupos experimentales. Los resultados obtenidos en poblaciones de fibroblastos control y de FPI muestran que existe un incremento significativo en los niveles de p16 y p21 en los fibroblastos fibróticos en comparación con los controles asociado a un aumento de la actividad β -galactosidasa en los cultivos de FPI. Se confirma que, durante el proceso fibrótico que ocurre en la FPI, se produce una acumulación de células senescentes y que esta senescencia se mantiene *in vitro*. Además, estos fibroblastos senescentes también se caracterizarían por la expresión de α -SMA (Yanai *et al.* 2015) como muestran nuestros resultados. Otros autores han demostrado que los fibroblastos de FPI tienen una senescencia celular incrementada, con una elevada expresión de β -galactosidasa, p21, p16, p53 y citoquinas relacionadas con el fenotipo de secreción asociado a la senescencia, así como la disminución de la proliferación apoptosis comparado con los controles (Álvarez *et al.* 2017). Adicionalmente, se ha observado un acortamiento de los telómeros, disfunción mitocondrial y el incremento de marcadores de la matriz extracelular (Aubert y Lansdorp 2008; Arish, Petukhov y Wallach-Dayán 2019).

Una vez caracterizada la senescencia de los grupos de experimentación y demostrados los cambios fibróticos asociados a la senescencia, disponemos de parámetros que podemos utilizar en otras condiciones experimentales para caracterizar posibles marcadores de fibrosis y su relación con la senescencia.

3. EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN DE LAS POBLACIONES DE FIBROBLASTOS POR EL TGF- β 1 Y LA IL-1 β COMO MODULADORES DE LA FMT Y LA EMT

Para estudiar el efecto profibrótico del TGF- β 1 *in vitro*, poblaciones de fibroblastos control y de FPI se incubaron con una concentración de 5 ng/ml durante 72 horas. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es un factor de crecimiento conocido por regular numerosos procesos esenciales celulares como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Epstein, Border y Noble 1994). De sus tres isoformas, el TGF- β 1 es la más eficiente en el desarrollo de la fibrosis pulmonar (Sime *et al.* 1997; Xaubet *et al.* 2003). Su actividad y concentración se han visto aumentadas en los pulmones de diferentes modelos experimentales de FPI (Westergren-Thorsson *et al.* 1993; Khalil *et al.* 1991). La sobreexpresión de TGF- β 1 induce fibrosis pulmonar persistente en roedores (Sime *et al.* 1997). Se ha descrito que ejerce esta función a través de la vía canónica de SMAD3, de modo que un silenciamiento de SMAD3 en el ratón lo protege del efecto del TGF- β 1 en un modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (Bonniaud *et al.* 2004). Utilizar este factor *in vitro* nos proporciona un ambiente profibrótico que emula el ambiente celular producido en la FPI.

El TGF- β 1 está implicado en muchas respuestas fibrogénicas como la activación y diferenciación de miofibroblastos y la transición epitelio-mesenquimal de las células alveolares (Evans *et al.* 2003; Jian Xu, Lamouille y Derynck 2009). También juega un papel fundamental en la transdiferenciación de los diferentes precursores de los miofibroblastos (fibroblastos residentes, células endoteliales, pericitos, fibrocitos y células mesenquimales) hasta la obtención de los mismos (Piera-Velazquez, Li y Jimenez 2011). En nuestro modelo, produce una transformación fibroblasto-miofibroblasto intensa. Son numerosos los estudios que muestran que la inducción de la FMT por TGF- β 1 es tiempo y dosis dependiente (Kolodsick *et al.* 2003). Además, nuestro grupo ha demostrado que a las 72 horas se alcanza aproximadamente un porcentaje del 80% de células positivas a α -SMA, acompañado de un incremento de los niveles de COL1A1 (Gabasa *et al.* 2013), por lo que se escogió este tiempo de incubación para nuestro modelo *in vitro* de estimulación con TGF- β 1.

Como muestran los resultados, la inducción con TGF- β 1 de poblaciones de fibroblastos control y de FPI produjo un incremento significativo

de la expresión de marcadores del fenotipo miofibroblasto como el α -SMA y la fibronectina. Se ha descrito a la fibronectina como una proteína de la matriz extracelular que orquesta el complejo de adhesión y señalización a través de los receptores de integrina de las membranas celulares durante diferentes procesos fisiológicos como el desarrollo y remodelación tisular y durante la fibrosis (Cao *et al.* 2017).

Los niveles de proteína observados mediante la técnica de *Western Blot* se corroboraron con estudios de inmunofluorescencia. La FMT se puso de relieve al detectarse α -SMA ensamblado en forma de fibras en numerosas células del cultivo, tanto en las poblaciones control como en las FPI. Esta proteína confiere las características morfológicas y bioquímicas de células contráctiles (Hong Yu Zhang *et al.* 1996; Phan 2012). Además, estos miofibroblastos se han identificado como la fuente predominante de aumento de la expresión génica de colágeno (Gharaee-Kermani *et al.* 2009). Con esta premisa, se determinó la expresión génica del gen codificante del colágeno I (*COL1A1*) y II (*COL1A2*), además de los genes *ACTA2* y fibronectina. El tratamiento con TGF- β 1 de ambos grupos de fibroblastos aumentó significativamente la expresión de todos ellos, como era esperado.

Los procesos de (EMT) y sus intermediarios se han descrito como conductores cruciales de procesos fibróticos como la fibrosis pulmonar (Nieto *et al.* 2016). De los marcadores mesenquimales conocidos, N-cadherina y el factor de transcripción SNAI1 están descritos como unos de los principales involucrados en procesos fibróticos (Barrallo-Gimeno y Nieto 2005; Su *et al.* 2020). Por ello, se evaluó la respuesta de marcadores característicos del fenotipo mesenquimal, como SNAI1 y la N-cadherina, tras el tratamiento con TGF- β 1 en los cultivos de fibroblastos. Los resultados muestran un aumento significativo de dichos marcadores mesenquimales en los fibroblastos control y de FPI tras ser tratados con el factor transformante.

En conjunto, los resultados demuestran que el TGF- β 1 es capaz de inducir la expresión de parámetros fibróticos y marcadores mesenquimales en las poblaciones de fibroblastos de nuestro modelo *in vitro* control. Además, en el grupo de fibroblastos FPI, que se caracterizan por presentar niveles elevados de los parámetros analizados, el TGF- β 1 incrementó también los valores fibróticos y mesenquimales.

En contraste con el TGF- β 1, la IL-1 β se ha descrito como una molécula con funciones antifibróticas. La IL-1 β es una citoquina proinflamatoria que se acumula durante fases tempranas de respuesta al daño tisular y se considera

reguladora clave de la inflamación y la homeostasis tisular en el pulmón y otros órganos (Lie, Yan Cheng y Mruk 2012; Hoffman y Wanderer 2010). Los efectos de la IL-1 β contribuyen a la regulación de la inflamación local y procesos de reparación de tejidos, y su desregulación ha estado implicada en numerosas condiciones histopatológicas pulmonares, incluyendo la fibrosis pulmonar, asbestosis, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema, casos graves de COVID-19 y otros tipos de daño agudo de pulmón (Borthwick 2016; Parisi y Leosco 2020; Postlethwaite *et al.* 1988; Campos *et al.* 2009).

Con la finalidad de evaluar el efecto antifibrótico de la IL-1 β *in vitro*, tratamos poblaciones de fibroblastos y miofibroblastos control y de FPI con una concentración de 10 ng/ml de IL-1 β durante 72 horas. Esta concentración se ha utilizado con éxito en fibroblastos anteriormente por nuestro grupo de investigación (Gabasa *et al.* 2020). La efectividad del tratamiento se comprobó analizando los niveles de COX-2, ya que la IL-1 β es capaz de incrementar el metabolismo del ácido araquidónico en diversos tipos celulares, entre los que se encuentran los fibroblastos (Roca-Ferrer *et al.* 2011); de modo que un incremento en la síntesis proteica de dicha proteína tras el tratamiento con IL-1 β respecto al control, fue suficiente para validar el modelo. Numerosos son los estudios que le atribuyen a la IL-1 β una función innata de protección frente a la fibrosis que podría ser relevante durante los primeros estadios de la reparación del tejido pulmonar, ya que se ha demostrado que reduce la rigidez del tejido local por una disminución de la síntesis de colágeno (COL1A1) (Gabasa *et al.* 2020). La IL-1 β también es capaz de disminuir la expresión génica de α -SMA y *F-actina* y, por tanto, reducir la dureza de los fibroblastos (H Y Zhang, Gharaee-Kermani y Phan 1997). Numerosos efectos de la citoquina se podrían explicar a través de la secreción de PGE-2 asociada a la inducción de COX-2. Esta prostaglandina posee efectos antifibróticos potentes y en la FPI se han descrito importantes alteraciones de su metabolismo e interacción con sus receptores específicos (Garrison *et al.* 2013; Wettlaufer *et al.* 2016).

Los resultados nos muestran una capacidad antifibrótica limitada para las poblaciones control, pero significativa para las poblaciones de fibroblastos de FPI. En células control, los niveles de fibronectina (marcador fibrótico) y marcadores mesenquimales como n-cadherina y SNAI1 no mostraron una disminución, e incluso llegaron a experimentar ligeros aumentos respecto a la condición basal. Los resultados sugieren que el fenotipo de la población control no es lo suficientemente fibrótico para que la IL-1 β ejerza una inhibición significativa. Los efectos proinflamatorios de la citoquina podrían ser los

causantes de estas modificaciones paradójicas. El efecto beneficioso de la IL-1 β en la FPI en este sentido es controvertido; algunos estudios la relacionan con un papel patológico asociado a la inflamación crónica pulmonar (Hoffman y Wanderer 2010; Borthwick 2016) y se asocia con la aparición de otras citoquinas profibróticas (Leung, Weitz y Tschumperlin 2007; Mia, Boersema y Bank 2014) que tienden a acumularse en etapas posteriores a la respuesta tisular al daño (Hannan, Peirce y Barker 2018; Saxena *et al.* 2013).

Sin embargo, el tratamiento con IL-1 β en fibroblastos FPI mostró una disminución significativa de los niveles proteicos en los parámetros fibróticos α -SMA y FN1, así como en los marcadores del fenotipo mesenquimal N-cadherina y SNAI1. Estos resultados demostraron el efecto antifibrótico de la IL-1 β , posiblemente porque estos fibroblastos presentan un fenotipo más fibrótico y mesenquimal basal. En este contexto, los efectos asociados a la IL-1 β y/o a la secreción de PGE-2 son más potentes y evidentes y señalan a esta citoquina como una herramienta antifibrótica efectiva para las poblaciones de fibroblastos fibróticos.

4. LOS FIBROBLASTOS PROCEDENTES DE PACIENTES CON FPI PRESENTAN UNA EXPRESIÓN INCREMENTADA DE NNMT RESPECTO A LOS FIBROBLASTOS CONTROL

Dado que los miofibroblastos juegan un papel crucial en la fisiopatología de la fibrosis pulmonar, investigadores y clínicos han destinado muchos esfuerzos a estudiar su comportamiento, sus características y el descubrimiento de nuevos caminos para bloquear su actividad (Fertala *et al.* 2017; Richeldi *et al.* 2014; Ganesh Raghu 2017; T. E. King *et al.* 2014). Nuestro propósito se centró en descubrir un posible marcador de estos fibroblastos activados en la FPI.

La nicotinamida N-metiltransferasa es una enzima cuya función fisiológica principal consiste en la metabolización por metilación del exceso de la nicotinamida (NAM) o vitamina B3 para su posterior eliminación en orina, utilizando la SAM como dador de metilos. La actividad NNMT puede ser inhibida por los productos de la reacción, 1-MNA y SAH. Su gen, clonado en los años 90, se localiza en el cromosoma 11, es relativamente simple (3 exones y 2 intrones) y se encuentra altamente conservado evolutivamente. El tejido donde se encuentra más expresión de NNMT es el hígado, aunque también es abundante en tejido adiposo, músculo y varios tipos de células mesenquimales, como los fibroblastos (Aksoy, Szumlanski y Weinshilboum 1994; Kraus *et al.* 2014).

Nuestro grupo tuvo interés por la NNMT al aparecer sobreexpresada en células de adenocarcinoma pulmonar que habían sufrido procesos de EMT asociados a la resistencia al tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa. Además, la NNMT fue necesaria para mantener el estado mesenquimal, resistente a la terapia e invasivo que exhibían estas células. Consecuentemente, la inhibición de NNMT devolvió a las células a un estado más epitelial, menos invasivo y más sensible a la terapia con inhibidores de la tirosina quinasa (Pulido, Inés. 2017). Sin embargo, no existe ninguna referencia científica que le otorgue a esta enzima un papel en la FPI. Estudios publicados en los últimos años han situado la actividad NNMT en la diana de importantes procesos fisiológicos asociados al metabolismo. En ratones, la NNMT hepática y a través del producto de la reacción 1-MNA, disminuye la producción y los niveles de colesterol y triglicéridos. Además, reduce la inflamación del hígado provocada por una dieta rica en grasas, en un mecanismo molecular mediado

por la actividad sirtuina (Hong *et al.* 2015). Paradójicamente, la represión de NNMT en el tejido adiposo tiene un efecto similar, al proteger al ratón de la obesidad inducida por una dieta rica en grasas y de las complicaciones de ésta (como la diabetes), aumentando el gasto energético del tejido adiposo y la producción de poliaminas. También aumenta la metilación de la histona H3 (una marca de activación transcripcional) y provoca una reprogramación epigenética que afecta a las enzimas de la ruta de las poliaminas ornitina decarboxilasa (ODC) y espermidina-espermina acetiltransferasa (SAT1) (Kraus *et al.* 2014; Ehebauer, Ghavampour y Kraus 2020). Estas evidencias señalaron a NNMT como una potencial diana para prevenir la obesidad o incluso para tratar las complicaciones metabólicas asociadas a ella, y de ahí el interés de la industria farmacéutica y muchos laboratorios en la búsqueda de inhibidores específicos de su actividad (Neelakantan *et al.* 2017; Van Haren *et al.* 2016).

En cuanto a su relación con el cáncer, la expresión de NNMT está aumentada en diversas neoplasias malignas humanas y asociada con la progresión del cáncer y la resistencia al tratamiento. Estudios inmunohistoquímicos y de ARNm han descrito la expresión incrementada de NNMT en muchos tipos de tumores sólidos (S. Li *et al.* 2018), glioblastomas (Jung *et al.* 2017), carcinoma renal de células claras (Tang *et al.* 2011; Yao *et al.* 2005), carcinomas gástricos (B.-H. Lim *et al.* 2006; Jang *et al.* 2004), en carcinomas orales (Sartini *et al.* 2007), líneas celulares de cáncer tiroideo (Jimin Xu *et al.* 2003) y de vejiga (Wu *et al.* 2008; Pozzi *et al.* 2018), así como en cáncer colorrectal (Roessler *et al.* 2006) y carcinoma oral escamoso (Sartini *et al.* 2007).

En algunos modelos celulares de este tipo de cánceres, la represión de NNMT disminuye la proliferación y migración celulares. En estos casos, la expresión de NNMT se asocia a la agresividad tumoral y su actividad se relaciona con procesos EMT. Por otro lado, la sobreexpresión de NNMT en células de carcinoma renal provoca una disminución de la ratio SAM/SAH y de los niveles de trimetilación de la histona H3 en las posiciones K9 y K27, una marca epigenética que podría dirigir la reprogramación de las células tumorales hacia un fenotipo más agresivo (Ulanovskaya, Zuhl y Cravatt 2013). Este y otros estudios sugieren que la actividad NNMT conduce a la hipometilación de histonas. Se regularía la expresión génica aumentando la agresividad tumoral y la capacidad metastásica (Akar *et al.* 2020).

En todos estos estudios la NNMT ha sido considerada como un prometedor marcador pronóstico tumoral, así como una posible diana terapéutica.

En el estroma tumoral, que es un contexto muy similar a la fibrosis que sucede en la FPI, se ha descrito la acumulación de NNMT en los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs), y la proponen como un biomarcador de pronóstico desfavorable para el paciente en cáncer gástrico (Li Zhang *et al.* 2020), en cáncer colorectal (Song *et al.* 2020) y cáncer de ovario (Eckert *et al.* 2019). De hecho, se ha mostrado a la NNMT como necesaria y suficiente para producir importantes cambios fenotípicos en los CAFs de ovario, incluyendo la expresión de marcadores asociados al miofibroblasto, la secreción de citoquinas y el remodelado de la matriz extracelular oncogénica (Eckert *et al.* 2019).

Está ampliamente descrito que los CAFs o también llamados TAFs (Fibroblastos asociados al tumor), comparten un fenotipo y unas características funcionales muy similares a los fibroblastos asociados a un proceso de reparación de tejido, como el que ocurre durante el desarrollo del proceso fibrótico en la FPI. Dvorak *et al.*, afirmaban, en un trabajo publicado varios años atrás, que la respuesta crónica de reparación de tejidos también ocurre en el contexto del cáncer, ya que se produce una agresión genética continuada al parénquima pulmonar. En este sentido, los tumores se consideran “heridas que no se curan” (Flier, Underhill y Dvorak 1986).

Kalluri, en 2016, realizó una clasificación de los diferentes tipos de fibroblastos comparándolos con los CAFs (Kalluri 2016). Esta clasificación denomina a los fibroblastos que intervienen en el proceso de reparación de una herida como Fibroblastos Normales Activados (NAFs). Proceden de fibroblastos quiescentes que han sufrido una inducción de la FMT por diferentes estímulos profibróticos (como el TGF- β 1) y han adquirido un fenotipo de miofibroblasto. En un paso posterior y con un carácter irreversible, los NAFs podrían sufrir una estimulación perpetuada en el tiempo acompañada de una reprogramación epigenética profunda que desembocaría en la adquisición de un fenotipo más miofibroblástico con grandes similitudes a los CAFs. Estos fibroblastos, llamados Fibroblastos Asociados a la Fibrosis (FAFs), tienen su capacidad secretora aumentada, una mayor capacidad de remodelación de la matriz extracelular y una modulación y activación autocrina (Kalluri 2016). De acuerdo con esta clasificación, en nuestros cultivos observaríamos mezclas de fibroblastos quiescentes, fibroblastos NAFs y fibroblastos FAFs, sobre todo en aquellos cultivos de fibroblastos procedentes de FPI. Desgraciadamente, la

complejidad presente en estos cultivos, la falta de marcadores específicos y la simpleza de esta clasificación dificulta su utilidad práctica. Sin embargo, pone de relieve las grandes similitudes que existen entre aquellos fibroblastos más fibróticos y los CAFs. Como hemos detallado en los apartados de la caracterización de nuestras poblaciones de fibroblastos control y de FPI, los fibroblastos fibróticos se caracterizan por un aumento de la síntesis de α -SMA que implica una remodelación de su citoesqueleto, una remodelación de la matriz extracelular (aumento de la síntesis de fibronectina y colágenos) y de los marcadores mesenquimales, todos procesos comunes presentes en los CAFs tumorales.

Dado el papel que desempeña la NNMT en los fibroblastos asociados al cáncer y en la transición epitelio mesenquimal (EMT) (Harmankaya *et al.* 2020), es del todo lógico asumir que en la fibrosis la NNMT desempeñe un importante rol. Sin embargo, no existen estudios que relacionen la NNMT directamente con un proceso fibrótico como el que ocurriría durante el desarrollo de la FPI.

Es cierto que los procesos de FMT y EMT comparten rasgos en común. Las células que lo desarrollan sufren una transformación de su fenotipo de epitelial o fibroblasto a mesenquimal o miofibroblasto, según se trate de EMT o FMT respectivamente. De nuevo, el fenotipo resultante (mesenquimal o miofibroblasto) está caracterizado por un aumento de los marcadores mesenquimales y fibróticos, una remodelación del citoesqueleto, con un aumento del fenotipo de secreción de moléculas protumorales o profibróticas. Además, está ampliamente descrito que ambos procesos están presentes e íntimamente relacionados en el proceso de desarrollo fibrótico que ocurre durante la FPI.

Los resultados que se presentan en este trabajo muestran que el aumento de actividad enzimática de NNMT observado en los fibroblastos obtenidos de pacientes con FPI respecto a los controles, se correlaciona con un aumento de la expresión proteica y génica de la misma. Además, al determinar su expresión mediante anticuerpos fluorescentes se observa un incremento muy significativo en la expresión de NNMT en los fibroblastos de FPI respecto a los controles. Estos resultados corroboran la hipótesis de partida y demuestran que la NNMT está significativamente elevada en los fibroblastos fibróticos respecto a los controles, como se esperaba al asumir las similitudes que guardan estas células con los CAFs y con el proceso EMT.

Para investigar la regulación del propio gen *NNMT* en un ambiente fibrótico, incubamos las células con TGF- β 1. Los resultados demuestran que el TGF- β 1 es regulador directo de la expresión de *NNMT*, ya que se produce un aumento significativo de su expresión proteica en los fibroblastos que han sido incubados con este factor de crecimiento. Como se ha descrito anteriormente, el TGF- β 1 es el inductor más potente de la FMT y un poderoso agente profibrótico (Carthy 2018; Upagupta *et al.* 2018) y es razonable que estimule la síntesis de *NNMT*. Además, la inducción de *NNMT* mediante TGF- β 1 se ha descrito en diferentes contextos, como el tumoral (Docherty *et al.* 2006).

La IL-1 β , utilizada como agente antifibrótico, ha demostrado ser capaz de producir el efecto contrario, ya que los fibroblastos fibróticos incubados con esta citoquina proinflamatoria disminuyen la expresión de *NNMT*. La IL-1 β ha mostrado la capacidad de disminuir parámetros fibróticos como el α -SMA y el COL1A1 en diversos trabajos (Gabasa *et al.* 2020). El hecho de que *NNMT* responda de forma coherente a estímulos profibróticos y antifibróticos la sitúan como un prometedor marcador de fibrosis en los fibroblastos humanos.

5. LA MODULACIÓN DE LA NNMT ESTÁ IMPLICADA EN LA REGULACIÓN DE LA FMT Y EMT DEL PROCESO FIBRÓTICO ASOCIADO A LA FPI

Tras la comprobación de que NNMT estaba aumentada en los fibroblastos de FPI respecto a los controles, el siguiente paso consistió en evaluar su implicación en el proceso fibrótico y más concretamente, en la FMT. La estrategia fue inhibir o aumentar la expresión de la enzima de la forma más precisa posible y, posteriormente, determinar el impacto que produce sobre el fenotipo celular. Para inhibir NNMT se empleó la técnica de silenciamiento mediado por shRNA utilizando partículas lentivirales como vector de transducción génica y se utilizó la condición experimental que más NNMT presenta basalmente, los fibroblastos de pacientes con FPI. En cambio, la sobreexpresión de estos fibroblastos se realizó empleando el sistema Gateway, una tecnología de clonaje mejorada de gran rapidez y eficiencia, lo que facilitó el éxito de la sobreexpresión.

El silenciamiento de NNMT provoca una disminución significativa de los niveles de α -SMA, marcadores mesenquimales como SNAI1 y vimentina y disminuye la expresión de FAP. La sobreexpresión de NNMT por su parte, produce el efecto contrario, ya que es capaz de aumentar de manera significativa el α -SMA y FN1, SNAI1, N-cadherina y FAP. Con estos resultados se demuestra que la enzima está directamente implicada en la activación y mantenimiento del fenotipo fibrótico en los fibroblastos y que su inhibición podría ser de utilidad en la FPI. El silenciamiento y la sobreexpresión de NNMT produce una “desactivación” o una “activación” de los fibroblastos fibróticos, respectivamente.

Los resultados obtenidos se encuentran respaldados por estudios que demuestran que el silenciamiento de NNMT en CAFs presentes en el estroma del cáncer de ovario provoca una disminución de marcadores como el α -SMA y la fibronectina. En el caso de la sobreexpresión de NNMT, estos parámetros aumentan (Eckert *et al.* 2019). Por lo que respecta a FAP, se ha descrito que aumenta en fibroblastos activados confiriendo un fenotipo miofibroblasto con gran capacidad contráctil (Hanahan y Coussens 2012; Kalluri y Zeisberg 2006; Marsh, Pietras y McAllister 2013).

La represión de NNMT se ha demostrado conductora de la reversión de EMT en carcinoma esofágico de células escamosas, ya que produce un incremento en la expresión de E-cadherina y una disminución de la expresión de N-cadherina y vimentina (Cui *et al.* 2019). Todos estos resultados le otorgan a la NNMT un papel de enorme importancia en la inducción del proceso fibrótico, ya que su represión produce una disminución de parámetros fibróticos y mesenquimales, mientras que su sobreexpresión produce el efecto contrario.

Además, se ha descrito que la activación de SNAI1 es un requisito indispensable, aunque no suficiente, para el desarrollo de la fibrosis renal (Boutet *et al.* 2006; Grande *et al.* 2015). La inhibición de este factor de transcripción en modelos de ratones con daño renal ha mostrado una reversión *in vivo* de la respuesta fibrótica. Nuestros resultados muestran que la inhibición y sobreexpresión de NNMT produce una disminución y aumento significativo de los niveles de SNAI1 respectivamente. Este hecho, junto con los antecedentes descritos para SNAI1 en el contexto de la fibrosis renal, demuestran que NNMT podría tener una función importante en la regulación de la expresión de este factor de transcripción y, en definitiva, del desarrollo del proceso fibrótico pulmonar.

Utilizando anticuerpos fluorescentes, se observó que los fibroblastos donde la NNMT se expresaba en niveles incrementados también se detectaban fibras de α -SMA en un porcentaje muy elevado. Además, los fibroblastos en los que se ha producido la represión de NNMT, se produjo una disminución significativa de la expresión de las fibras musculares de músculo liso y una disminución de la coexpresión con NNMT. Por el contrario, los fibroblastos que sobreexpresaban NNMT presentaron una coexpresión aumentada significativamente, ya que la mayoría de los fibroblastos que eran positivos para α -SMA también lo fueron para NNMT. Además de mostrar que la actividad de NNMT influye directamente en la FMT, también los resultados nos indican que la detección de la enzima podría ser un prometedor marcador de los miofibroblastos.

En todos los escenarios analizados, la modulación de NNMT ha demostrado ser capaz de regular los procesos de FMT y EMT asociados a la fibrosis por lo que la NNMT podría constituir una diana terapéutica eficaz para abordar el tratamiento de la enfermedad.

A continuación, se evaluó la sensibilidad de estos fibroblastos modificados mediante estimulación con el TGF- β 1 (agente profibrótico) y la IL-1 β (agente antifibrótico). Como se observa en los resultados, tras la incubación

con el agente fibrótico, los fibroblastos shNT y los shNNMT vieron incrementada la expresión proteica de NNMT, α -SMA, SNAI1, FAP y FN1 de manera significativa al ser tratados con TGF- β 1, por lo que se consideraron sensibles a la inducción de este agente profibrótico. La inhibición de NNMT no impide, al menos en las condiciones ensayadas, el efecto profibrótico del TGF- β 1, pero el efecto final producido es mucho menor en estas células que en los fibroblastos control.

Al incubarse las células con IL-1 β , se observaron resultados similares a los obtenidos en los fibroblastos FPI, ya que los fibroblastos shNT vieron disminuidos los niveles de NNMT y α -SMA, pero se incrementaron los niveles de SNAI1 y FAP. Los fibroblastos shNNMT no mostraron, en general, cambios de expresión tras la incubación con IL-1 β , lo que podría deberse a que la represión de NNMT podría haberlos convertido en fibroblastos con un fenotipo más cercano a los fibroblastos control.

Los cambios observados en los fibroblastos con sobreexpresión de NNMT no fueron tan evidentes. La estimulación con TGF- β 1 muestra una tendencia a incrementar los parámetros fibróticos y mesenquimales tanto en los fibroblastos Flag como al sobreexpresar NNMT. Este incremento se hace significativo en parámetros como FAP, NNMT, SNAI1 y α -SMA en fibroblastos Flag y FAP en los fibroblastos sobreexpresados. La incubación con IL-1 β también muestra una capacidad de acción antifibrótica por la disminución de la expresión de algunos de estos parámetros, pero de forma limitada. Estos resultados muestran que los fibroblastos que han sufrido la sobreexpresión de NNMT y sus controles, son células menos sensibles a la modulación con los agentes profibróticos y antifibróticos. Este hecho podría explicarse porque los fibroblastos con NNMT muy elevada podrían haber alcanzado un fenotipo fibrótico tal que dificultaría la reversión mediante la IL-1 β y su inducción mediante el TGF- β 1.

Las conclusiones obtenidas en los diferentes estudios de la modulación de EMT y FMT en las diferentes poblaciones de fibroblastos despiertan el interés de estudiar el efecto conjunto de ambos moduladores y la repercusión de esto en el desarrollo de la FMT y EMT.

6. IMPACTO DE LA MODULACIÓN DE NNMT EN FIBROBLASTOS FIBRÓTICOS EN LA CAPACIDAD DE CIERRE DE UNA HERIDA

Una vez caracterizadas las poblaciones de fibroblastos con la NNMT silenciada y sobreexpresada, se realizó un estudio de la capacidad de migración de estos cultivos mediante un corte o herida en la monocapa celular.

En gran parte de los estudios publicados, utilizan métodos de análisis de la migración basados en la quimiotaxis, como la cámara de Bovden, donde se utiliza un medio con alguna sustancia quimiotáctica para inducir la migración celular (Suganuma *et al.* 1995). En este método, las células se preparan en suspensión antes del ensayo, de tal forma que se eliminan factores como la interacción célula-célula, que pueden influir sobre la respuesta migratoria. En cambio, con el método de corte de la monocapa celular *in vitro* se emula la reacción de los fibroblastos en situación de una herida de manera más parecida a la situación *in vivo*. Los estímulos quimiotácticos, si existen, serán sintetizados únicamente por las propias células del cultivo. Además, hay un componente importante de proliferación en nuestro modelo que contribuye al cierre de la herida. Por tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio se diferencian de los logrados en experimentos basados en quimiotaxis por la diferente aproximación *in vitro* realizada.

Con la finalidad de analizar el papel que desempeña la proliferación en nuestro modelo, se utilizó una condición adicional donde se incubaron las células con mitomicina C a una concentración de 1,5 µg/ml. Este antibiótico actúa como inhibidor de la proliferación mediante la unión al ADN e impide su replicación. Por tanto, en los cultivos tratados con mitomicina C, el cierre de la herida fue principalmente debido a la migración celular, mientras que sin mitomicina, el cierre correspondía a la migración y la proliferación celular. La dosis de mitomicina fue relativamente baja respecto a las concentraciones descritas previamente en la bibliografía. La razón es que los fibroblastos que han sufrido el proceso de trasducción lentiviral, son más sensibles a la agresión, de modo que concentraciones superiores de mitomicina C fueron tóxicas para estas poblaciones.

Analizando el área cerrada por los fibroblastos shNNMT, observamos que fue significativamente superior a la cerrada por los shNT (control) 24 horas después de realizar el corte en el cultivo, pero esta diferencia se perdió a las 48 horas. Sin embargo, al ser incubados con mitomicina C, los fibroblastos

shNNMT fueron capaces de cerrar la herida por completo a las 48 horas, mientras que los shNT no lo consiguieron. Esto podría deberse a que existe una migración neta aumentada en los fibroblastos con la NNMT silenciada. Por otro lado, al evaluar la capacidad de cierre de una herida en los fibroblastos con la NNMT sobreexpresada, se observó que fue significativamente inferior respecto a sus fibroblastos control (Flag) a las 24 horas, que consiguieron cerrar por completo la herida. Estas diferencias desaparecieron a las 48 horas puesto que ambas condiciones cerraron la herida en este tiempo. Sin embargo, se observa que los fibroblastos con sobreexpresión de NNMT tratados con mitomicina C no fueron capaces de cerrar la herida a las 48 horas, mientras que los fibroblastos Flag lo consiguieron por completo. Esto podría deberse, de nuevo, a que la migración neta de los fibroblastos con mayores niveles de NNMT está disminuida respecto a los Flag.

Existen publicaciones controvertidas sobre la capacidad de migración y proliferación tanto de fibroblastos como de miofibroblastos durante un proceso de cierre de una herida. Los resultados pueden ser muy dispares en función de las condiciones ensayadas, como por ejemplo, la presencia o no de suero en el medio, la forma de determinar la migración, etc. Algunos autores (Suganuma *et al.* 1995; White *et al.* 2003; Cai *et al.* 2010) han descrito que los fibroblastos procedentes de individuos con enfermedades fibróticas tienen una capacidad incrementada de migración mediada por quimiotaxis. Utilizando otros métodos, otros autores (Thampatty y Wang 2007) han descrito que los miofibroblastos tienen menos movilidad que los fibroblastos. Los fibroblastos presentes en otras patologías, como los fibroblastos de lámina propia de pacientes con enfermedad de Crohn han mostrado una capacidad de migración significativamente inferior a la de los fibroblastos control (C. Li y Kuemmerle 2014).

La literatura respecto al impacto que puede tener la modulación de NNMT en la migración de células epiteliales nos indica que, en el contexto del carcinoma esofágico de células escamosas y cáncer de vejiga el silenciamiento de NNMT produce una inhibición de la migración, la viabilidad celular, proliferación y de la adquisición del fenotipo mesenquimal en estas células (Cui *et al.* 2019; Hah *et al.* 2019; Wu *et al.* 2008).

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los fibroblastos que han visto reducidos parámetros fibróticos como el α -SMA y COL1A1 que implica, a su vez, una reducción de su rigidez, tienen incrementada su capacidad de migración. Se trata de células más ligeras y dinámicas que ven

favorecida su capacidad de cierre de una herida (Gabasa *et al.* 2020; Rianna, Radmacher y Kumar 2020; Rudzka *et al.* 2019). Parece que el fibroblasto, cuando migra necesita un contacto más íntimo con la matriz extracelular (Oberringer *et al.* 2007). Estas evidencias podrían dar una explicación a los resultados de migración de este trabajo, ya que los fibroblastos con represión de NNMT se ha demostrado que tienen disminuidos parámetros fibróticos y mesenquimales y, en definitiva, menor presencia de miofibroblastos activos. La disminución de estos parámetros podría representar menor rigidez celular, confiriéndoles una mayor capacidad de migración. Los resultados avalan el paradigma que en la fibrosis pulmonar los fibroblastos migran y proliferan mientras que los miofibroblastos son más estáticos, migran menos, pero tienen mayor capacidad contráctil y de remodelado de la matriz extracelular.

De la misma forma, los fibroblastos con la NNMT sobreexpresada muestran menor capacidad de cierre de la herida. Esos fibroblastos tendrían mayor activación, mayor capacidad contráctil y una rigidez incrementada que repercutiría negativamente en su capacidad de migración y proliferación.

7. LA NNMT Y LA SENESENCIA CELULAR

En estudios recientes se ha descrito que la NNMT se expresa en el músculo esquelético, con una expresión progresivamente incrementada asociada al envejecimiento de los tejidos musculares (Ho *et al.* 2010; Rudolphi *et al.* 2018). Dada su capacidad para modular los niveles de los precursores de nicotinamida necesarios para la biosíntesis de NAD⁺, desempeña un papel crucial en la regulación de la vía de rescate del NAD⁺ y el metabolismo celular (Pissios 2017). La sobreexpresión de NNMT en los músculos esqueléticos envejecidos produce una desregulación de la actividad sirtuina 1 y un aumento de la senescencia de las células madre musculares (Kraus *et al.* 2014; Neelakantan *et al.* 2018). Además, se ha demostrado que el tratamiento con inhibidores de NNMT es capaz de rescatar los déficits metabólicos relacionados con la edad de las células musculares y promueven una regeneración mayor después de una lesión en el músculo envejecido (Neelakantan *et al.* 2019). También se ha descrito una expresión incrementada de NNMT en células neuronales de pacientes con enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Parsons *et al.* 2002; 2003) y el

Alzheimer (Kocinaj *et al.* 2021), por lo que la NNMT se ha considerado una causa común de las enfermedades neurodegenerativas.

En el mismo sentido, nuestros resultados muestran que la represión de NNMT en los fibroblastos fibróticos produce una disminución significativa de los marcadores de senescencia p16 y p21 y de la actividad β -galactosidasa. En cambio, la sobreexpresión de NNMT produce el efecto contrario.

Como se ha comentado en la caracterización de las poblaciones de fibroblastos obtenidas, está ampliamente descrito que los fibroblastos fibróticos presentan un fenotipo senescente aumentado respecto a los fibroblastos control.

El efecto observado en los marcadores de senescencia tras la modulación de la NNMT en los fibroblastos fibróticos está íntimamente relacionado con la capacidad de reducir o aumentar el fenotipo miofibroblasto y los marcadores EMT. De modo que se podría considerar a la NNMT como un triple modulador de los fibroblastos y los miofibroblastos implicados en el proceso fibrótico asociado a la FPI, ya que afecta a los tres niveles de caracterización de estos fibroblastos fibróticos: FMT, EMT y senescencia.

8. ADAPTACIONES METABÓLICAS EN LOS FIBROBLASTOS DE FPI ANTES Y DESPUÉS DE LA MODULACIÓN DE NNMT

No hay que olvidar que NNMT es una enzima metabólica con capacidad metiltransferasa, y que transfiere grupos metilos del donante universal SAM a la nicotinamida (NAM) para formar 1-metilnicotinamida (1-MNA). Además, la NAM o vitamina B3 junto al nicotinato y el aminoácido triptófano, son precursores de la biosíntesis de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺ en su forma oxidada; NADH en su forma reducida).

Nuestra hipótesis respecto al metabolismo de NNMT fue que aquellas células con niveles altos de actividad NNMT podrían sufrir una alteración en el metabolismo de la SAM y la síntesis de NAD⁺. Debido a que la SAM forma parte del ciclo de la metionina y este, a su vez, presenta múltiples ramificaciones hacia la síntesis de poliaminas y la transulfuración, decidimos determinar mediante un estudio metabolómico cuantitativo algunos de los metabolitos implicados en el ciclo de la metionina (SAM y SAH), la ruta de las poliaminas (5-MTA, espermidina y espermina), el metabolismo de NNMT y la síntesis del NAD⁺ (NAM, NAD⁺ y 1-MNA).

En la actualidad, los estudios señalan que la expresión de NNMT regula directamente la capacidad de metilación de la célula. Se ha descrito que niveles elevados de NNMT en el estroma tumoral producen una hipometilación del ADN, ARN o histonas a través de la atenuación del ratio SAM:SAH. Además, los niveles de nicotinamida están negativamente asociados con la expresión de NNMT. Por otro lado, se ha descrito que la represión de NNMT es capaz de incrementar los niveles de NAD⁺. Respecto a la ruta de las poliaminas, NNMT produce un incremento de los niveles de 5-MTA que contribuye a la hipometilación global al crear un sumidero de metilos (Eckert *et al.* 2019).

Nuestro análisis de los metabolitos muestra que, como se esperaba, los niveles de 1-MNA están aumentados en los fibroblastos de FPI respecto a los controles, ya que poseen mayor actividad NNMT que los controles, lo que produce una disminución de los niveles de nicotinamida que será empleada como sustrato de la reacción. Sin embargo, el ratio SAM:SAH se encuentra prácticamente inalterado. En la vía de las poliaminas, los niveles de 5-MTA están disminuidos significativamente en los fibroblastos de FPI respecto a los controles. Paradójicamente, los niveles de espermina y espermidina están drásticamente elevados.

Con la finalidad de estudiar con profundidad el papel de la NNMT en las adaptaciones metabólicas de los fibroblastos fibróticos, se llevó a cabo el análisis de estos metabolitos en las parejas de fibroblastos shNT y shNNMT. Debido a la represión de la actividad NNMT, los niveles de 1-MNA y nicotinamida se vieron disminuidos y aumentados en los fibroblastos shNNMT respectivamente. El ratio SAM:SAH se encontró de nuevo prácticamente inalterado. Sin embargo, en el ciclo de las poliaminas encontramos que los niveles de espermina y espermidina están significativamente elevados en los fibroblastos shNNMT respecto a los shNT. Esto concuerda con los resultados obtenidos en las poblaciones basales de fibroblastos control y de FPI, que podría explicarse por una mayor disponibilidad de los niveles de SAM en las poblaciones control y shNNMT (por tener menor actividad NNMT), de modo que podría emplearse este SAM como sustrato de la ruta de las poliaminas. Este mecanismo explicaría que los niveles de SAM no mostraran cambios al compararse las poblaciones de fibroblastos control y FPI o shNT y shNNMT, ya que el exceso de SAM que se pudiera acumular por déficit de actividad NNMT, podría estar empleándose en la ruta de las poliaminas, dando como resultado neto niveles muy similares de SAM en ambas poblaciones. Estos resultados deberán corroborarse en experimentos futuros.

Sin embargo, en la medida de los niveles de NAD^+ , que es un metabolito de gran importancia por sus funciones celulares, no se observaron cambios significativos. Estudios realizados en poblaciones de fibroblastos con senescencia replicativa, demuestran que son capaces de mantener los niveles intracelulares de NAM y NAD^+ (James *et al.* 2015; 2016). Esta compensación se debe a que emplean rutas alternativas de la síntesis de NAD^+ que evitan la depleción de sus niveles y los mantienen constantes. Entre estas rutas alternativas cabe destacar la síntesis a partir del triptófano, la síntesis a partir de la nicotinamida ribósido (NR) y la síntesis a partir de la nicotinamida ribonucleótido (NMN). Todas ellas se encuentran muy significativamente elevadas en los fibroblastos senescentes respecto a los controles (Mori *et al.* 2014; Imai y Guarente 2014).

Teniendo en cuenta que los fibroblastos de FPI y los fibroblastos shNT presentan un fenotipo más senescente respecto a los fibroblastos control y shNNMT respectivamente, los resultados de los estudios anteriores podrían ayudarnos a entender que estas poblaciones de fibroblastos son capaces de compensar el déficit de NAD^+ observado en otros modelos con la NNMT sobreexpresada.

9. LA NNMT EN EL ESCENARIO CLÍNICO

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad caracterizada por un cuadro histológico de neumonía intersticial usual (NIU). El complicado diagnóstico de esta patología incluye la exclusión de otras enfermedades pulmonares intersticiales, la identificación de un patrón NIU generalmente con tomografía computarizada de alta resolución (TCAR) y en aquellos casos dudosos, el análisis de una biopsia pulmonar, necesaria en algunos pacientes (Ganesh Raghu *et al.* 2011).

El patrón histopatológico NIU se caracteriza por fibrosis intersticial que muestra heterogeneidad espacial con afectación irregular del parénquima pulmonar, áreas de marcada fibrosis y distorsión arquitectónica. Las imágenes TCAR muestran que es predominantemente bilateral, periférico y con una distribución basal de cambios reticulares asociados a bronquiectasias por tracción (Hansell *et al.* 2008), grupos de espacios aéreos quísticos subpleurales, engrosamiento del tabique alveolar periférico y microscopia de panal de abejas y posible presencia de vidrio esmerilado (Ganesh Raghu *et al.* 2011; Hunninghake *et al.* 2003; Tcherakian *et al.* 2011). La FPI se considera que se inicia en la base y en la periferia (borde) de los pulmones, progresando gradualmente hasta involucrar a todo el tejido pulmonar (Omote *et al.* 2015).

Debido a la dificultad de su diagnóstico y las diferentes características del patrón NIU presentes en las imágenes del paciente, se recomienda el establecimiento de cuatro categorías diagnósticas: patrón NIU, probable patrón NIU, indeterminado patrón NIU y diagnóstico alternativo. Es por ello que en gran cantidad de casos es necesario confirmar el diagnóstico mediante un estudio histopatológico de biopsias pulmonares de estos pacientes (Ganesh Raghu *et al.* 2018).

El aspecto parcheado de la fibrosis es el sello histopatológico distintivo del patrón NIU que está causado por una remodelación de la arquitectura del pulmón, la generación de un patrón histológico en panal de abejas, que se alterna con áreas menos afectadas del parénquima pulmonar (Ganesh Raghu *et al.* 2018). Entre la interfaz del tejido pulmonar fibrótico y de apariencia normal se encuentran los focos de fibroblastos. Se tratan de agregados de fibroblastos y miofibroblastos proliferantes dentro de una matriz de apariencia mixoide compuesta principalmente de colágeno denso. Estos focos son una característica histopatológica clave del patrón NIU y se cree que representan áreas activas de la enfermedad, de modo que su ausencia excluye un

diagnóstico NIU definido. En dos dimensiones, estos focos se han considerado pequeños, pero en tres dimensiones se ha demostrado que forman estructuras heterogéneas con grandes variaciones de formas y volúmenes (Jones *et al.* 2016). Por otro lado, la inflamación suele ser leve y consiste en un infiltrado intersticial irregular de linfocitos y células plasmáticas asociadas con hiperplasia de neumocitos tipo 2 y epitelio bronquiolar. La metaplasia muscular en el intersticio suele aparecer en áreas de fibrosis avanzada y con panalización.

Nuestros resultados plasman la heterogeneidad de los cortes procedentes de pacientes con FPI. Estos manifiestan que en una misma muestra es posible encontrar zonas de fibrosis reactiva caracterizada por la presencia de focos de fibroblastos activos embebidos en una matriz de colágeno, así como zonas de fibrosis más avanzada o cicatrizante, donde la celularidad se ha perdido casi por completo, con colágeno más denso y se observa metaplasia muscular del intersticio. También es habitual ver zonas de parénquima pulmonar casi normal.

Este hecho dificulta, en parte, la evaluación de las muestras histológicas de tejido obtenidas de pacientes, ya que se precisa de una observación exhaustiva con la participación de expertos en el campo que guíen el estudio de los cortes obtenidos.

Las tinciones del tricrómico de Masson y hematoxilina y eosina permitieron detectar las diferentes zonas presentes en las preparaciones. De todas ellas nos focalizamos en las zonas de proliferación de fibroblastos y miofibroblastos o zonas de fibrosis activa que representan focos clave del patrón NIU.

A estas dos tinciones se les sumó la inmunodetección de α -SMA y NNMT en estos tejidos. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de ambas proteínas está presente en las zonas de fibrosis reactiva de los cortes obtenidos de pacientes con FPI, ya que los fibroblastos y miofibroblastos que constituyen estos focos fibróticos eran positivos para las tinciones de α -SMA y NNMT. Además, esta expresión muestra una cotinción para ambos marcadores. Sin embargo, la tinción de NNMT estuvo ausente en los cortes obtenidos de pacientes control mientras que la expresión de α -SMA sí que era positiva en estos pacientes. La expresión de α -SMA que se detectó en zonas sanas de pulmón principalmente estaba asociada a las paredes de los vasos sanguíneos.

Estos resultados se corresponden con hallazgos en estudios inmunohistoquímicos en el estroma tumoral de diferentes tipos de cánceres, como en el cáncer de ovario (112), cáncer gástrico (Li Zhang *et al.* 2020) o cáncer colorrectal (Song *et al.* 2020). Los fibroblastos y miofibroblastos presentes en el microambiente tumoral de estos cánceres (CAFs) se han demostrado positivos a α -SMA y NNMT, de modo que la acumulación de la expresión de esta última es marcadora de mal pronóstico. En el carcinoma de células escamosas de cuello uterino, la expresión de NNMT se ha asociado con un estadio avanzado y la presencia de nódulos linfáticos metastásicos (Akar *et al.* 2020).

Como se comentaba con anterioridad, las similitudes entre el estroma tumoral y el foco fibrótico reactivo asociado a la FPI, permiten hacer una comparación entre ambos microambientes. En otros estudios de nuestro grupo se ha observado también la coexpresión de α -SMA y NNMT en el estroma de muestras de tumores de pulmón y el grado de expresión se ha relacionado con el mal pronóstico y la mortalidad de los pacientes. Sin embargo, el abordaje histopatológico de estos cortes es más sencillo respecto al de los cortes de pacientes con FPI. Generalmente las muestras de cáncer presentan una zona tumoral más delimitada con un estroma muy claro. En cambio, la heterogeneidad de las muestras de FPI, junto con un estroma menos definido dificultan la identificación y el estudio de estos focos fibróticos.

La expresión incrementada de NNMT en las células estromales de los focos de fibrosis reactiva presentes en los cortes de pacientes con FPI y su contención α -SMA, facilitan la identificación histológica de estos fibroblastos activos o miofibroblastos con mayor seguridad. Estos resultados permiten validar clínicamente los hallazgos *in vitro* que se presentan en este trabajo, debido a la sobreexpresión observada de NNMT en los cortes de pacientes FPI respecto a los controles. Además, sitúan a esta proteína enzimática como un marcador potencial a ser incluido en el diagnóstico histopatológico de esta enfermedad.

VI. CONCLUSIONS/ CONCLUSIONES

In the study of the role of nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) in fibroblast myofibroblast transformation, senescence and metabolism of fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis, the following conclusions were obtained:

- Fibroblast cultures from IPF have a higher number of myofibroblasts than control cultures. Furthermore, they show a higher expression of fibrotic markers such as α -SMA, COL1A1, COL1A2 and FN1 and secrete more TGF- β 1 to the extracellular medium.
- The senescence caused by an increase in the number of passages is reflected in an increase in fibrotic parameters such as α -SMA and COL1A1; as well as senescence markers such as p16 and p21 and the expression of β -galactosidase. All of them are increased in fibrotic fibroblasts compared to controls.
- TGF- β 1 stimulation of fibroblast cultures produces an increase in mesenchymal markers (CDH2, SNAI1) and fibrotic (α -SMA, FN1, COL1A1, COL1A2). In contrast, treatment with IL-1 β produces a decrease in SNAI1 and the fibrotic parameters α -SMA and FN1 in IPF fibroblasts.
- NNMT is increased in fibroblasts from patients with IPF compared to fibroblasts from control patients. Stimulation of fibroblasts with TGF- β 1 and IL-1 β produces an increase and a decrease in the expression of NNMT, respectively. Furthermore, cells expressing α -SMA show co-expression with NNMT.
- Inhibition by lentiviral gene transduction of NNMT in fibrotic fibroblasts produces a decrease in the fibrotic parameter α -SMA, FAP, mesenchymal parameters such as SNA1 and vimentin, as well as senescence markers such as p16, p21 and β -galactosidase activity. In turn, fibroblasts with repressed NNMT show an increased migration capacity compared to controls.
- The fibroblast populations with higher expression of NNMT show a decrease in 1-MNA and NAM and an increase in the metabolites of the polyamine pathway (spermine and spermidine) compared to their controls. The levels of NAD⁺ did not show changes between the different groups.
- The overexpression by lentiviral gene transduction of NNMT in fibroblasts produces an increase in fibrotic parameters such as α -SMA

and FN1, mesenchymal parameters such as CDH2 and SNAI1, FAP and senescence markers such as p16, p21 and β -galactosidase activity. Furthermore, fibroblasts with overexpressed NNMT show a decreased migration capacity compared to controls.

- The results obtained in sections of paraffin lung tissue from patients with IPF show an increased expression of NNMT compared to control patients, which confirms the results obtained in vitro and suggests that NNMT could be used as a marker of Idiopathic Pulmonary Fibrosis.

En el estudio del papel de la nicotinamida N-metiltransferasa (NNMT) en la transformación fibroblasto miofibroblasto, la senescencia y el metabolismo de fibroblastos aislados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática se han obtenido las siguientes conclusiones:

- Los cultivos de fibroblastos procedentes de FPI presentan mayor número de miofibroblastos que los cultivos control. Además, expresan mayor cantidad de marcadores fibróticos como α -SMA, COL1A1, COL1A2 y FN1 y secretan más TGF- β 1 al medio extracelular.
- La senescencia provocada por incremento en el número de pases se refleja en un aumento de parámetros fibróticos como el α -SMA y COL1A1; así como marcadores de senescencia como p16 y p21 y la expresión de β -galactosidasa. Todos ellos están incrementados en los fibroblastos fibróticos respecto a los controles.
- La estimulación con TGF- β 1 de los cultivos de fibroblastos produce un incremento de marcadores mesenquimales (CDH2, SNAI1) y fibróticos (α -SMA, FN1, COL1A1, COL1A2). Por el contrario, el tratamiento con IL-1 β produce una disminución de SNAI1 y de los parámetros fibróticos α -SMA y FN1 en poblaciones de fibroblastos de FPI.
- La NNMT está incrementada en los fibroblastos de pacientes con FPI respecto a los fibroblastos de pacientes control. La estimulación con TGF- β 1 e IL-1 β de los fibroblastos, produce un aumento y una disminución de la expresión de NNMT respectivamente. Además, las células que expresan α -SMA muestran coexpresión con NNMT.
- La inhibición de NNMT en fibroblastos fibróticos mediante transducción con partículas lentivirales produce una disminución del parámetro fibrótico α -SMA, la FAP, parámetros mesenquimales como SNA1 y vimentina, así como de marcadores de senescencia como p16, p21 y la actividad β -galactosidasa. A su vez, los fibroblastos con la NNMT reprimida presentan una capacidad de migración aumentada respecto a los controles.
- Las poblaciones de fibroblastos con mayor expresión de NNMT muestran una disminución de 1-MNA y NAM y un aumento de los metabolitos de la ruta de las poliaminas (espermina y espermidina) respecto a sus controles. Los niveles de NAD⁺ no mostraron cambios entre los distintos grupos.

- La sobreexpresión de NNMT en fibroblastos mediante transducción con partículas lentivirales produce un aumento de parámetros fibróticos como el α -SMA y FN1, parámetros mesenquimales como CDH2 y SNAI1, la FAP y marcadores de senescencia como p16, p21 y la actividad β -galactosidasa. Además, los fibroblastos con la NNMT sobreexpresado presentan una capacidad de migración disminuida respecto a los controles.
- Los resultados obtenidos en cortes de tejido pulmonar parafinado de pacientes con FPI muestran una expresión incrementada de NNMT respecto a los pacientes controles, que confirma los resultados obtenidos *in vitro* y nos sugieren que la NNMT podría utilizarse como marcador de Fibrosis Pulmonar Idiopática.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, Juan C., Ana O'Loghlen, Ana Banito, Maria V. Guijarro, Arnaud Augert, Selina Raguz, Marzia Fumagalli, *et al.* 2008. "Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence." *Cell* 133 (6): 1006–18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.038>.
- Akar, Serra, İsmail Harmankaya, Serdar Uğraş, and Çetin Çelik. 2020. "Expression and Clinical Significance of Nicotinamide N-Methyltransferase in Cervical Squamous Cell Carcinoma." *International Journal of Gynecological Pathology* 39 (3): 289–95. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000605>.
- Akhurst, Rosemary J., and Rik Derynck. 2001. "TGF- β Signaling in Cancer - A Double-Edged Sword." *Trends in Cell Biology*. Trends Cell Biol. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02130-4](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02130-4).
- Aksoy, S., C. L. Szumlanski, and R. M. Weinshilboum. 1994. "Human Liver Nicotinamide N-Methyltransferase. CDNA Cloning, Expression, and Biochemical Characterization." *Journal of Biological Chemistry* 269 (20): 14835–40. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)36700-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)36700-5).
- Alder, Jonathan K., Julian J.L. Chen, Lisa Lancaster, Sonye Danoff, Shu Chih Su, Joy D. Cogan, Irma Vulto, *et al.* 2008. "Short Telomeres Are a Risk Factor for Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (35): 13051–56. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804280105>.
- Alder, Jonathan K., Susan E. Stanley, Christa L. Wagner, Makenzie Hamilton, Vidya Sagar Hanumanthu, and Mary Armanios. 2015. "Exome Sequencing Identifies Es Mutant TINF2 in a Family with Pulmonary Fibrosis." *Chest* 147 (5): 1361–68. <https://doi.org/10.1378/chest.14-1947>.
- Álvarez, Diana, Nayra Cárdenes, Jacobo Sellarés, Marta Bueno, Catherine Corey, Vidya Sagar Hanumanthu, Yating Peng, *et al.* 2017. "IPF Lung Fibroblasts Have a Senescent Phenotype." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 313 (6): L1164–73. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00220.2017>.
- Amadeu, Thais Porto, Bernard Coulomb, Alexis Desmouliere, and Andréa Monte Alto Costa. 2003. "Cutaneous Wound Healing: Myofibroblastic Differentiation and in Vitro Models." *The International Journal of Lower Extremity Wounds* 2 (2): 60–68. <https://doi.org/10.1177/1534734603256155>.
- Arish, Nissim, Dmytro Petukhov, and Shulamit B. Wallach-Dayana. 2019. "The Role of Telomerase and Telomeres in Interstitial Lung Diseases: From Molecules to Clinical Implications." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (12). <https://doi.org/10.3390/ijms20122996>.
- Armanios, Mary Y., Julian J.L. Chen, Joy D. Cogan, Jonathan K. Alder, Roxann G. Ingersoll, Cheryl Markin, William E. Lawson, *et al.* 2007. "Telomerase Mutations in Families with Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *New England Journal of Medicine* 356 (13): 1317–26. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa066157>.
- Aubert, Geraldine, and Peter M. Lansdorp. 2008. "Telomeres and Aging."

- Physiological Reviews*. Physiol Rev.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2007>.
- Babiak, Alexander, Jürgen Hetzel, Ganesh Krishna, Peter Fritz, Peter Moeller, Tahsin Balli, and Martin Hetzel. 2009. "Transbronchial Cryobiopsy: A New Tool for Lung Biopsies." *Respiration* 78 (2): 203–8. <https://doi.org/10.1159/000203987>.
- Baker, Darren J., Bennett G. Childs, Matej Durik, Melinde E. Wijers, Cynthia J. Sieben, Jian Zhong, Rachel A. Saltness, *et al.* 2016. "Naturally Occurring P16 Ink4a-Positive Cells Shorten Healthy Lifespan." *Nature* 530 (7589): 184–89. <https://doi.org/10.1038/nature16932>.
- Balestrini, Jenna L., Sidharth Chaudhry, Vincent Sarrazy, Anne Koehler, and Boris Hinz. 2012. "The Mechanical Memory of Lung Myofibroblasts." *Integrative Biology* 4 (4): 410–21. <https://doi.org/10.1039/c2ib00149g>.
- Barnes, Peter J. 2015. "Mechanisms of Development of Multimorbidity in the Elderly." *European Respiratory Journal* 45 (3): 790–806. <https://doi.org/10.1183/09031936.00229714>.
- Barnes, Peter J., Jonathan Baker, and Louise E. Donnelly. 2019. "Cellular Senescence as a Mechanism and Target in Chronic Lung Diseases." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 200 (5): 556–64. <https://doi.org/10.1164/rccm.201810-1975TR>.
- Barrallo-Gimeno, Alejandro, and M. Angela Nieto. 2005. "The Snail Genes as Inducers of Cell Movement and Survival: Implications in Development and Cancer." *Development*. Development. <https://doi.org/10.1242/dev.01907>.
- Bassett, D. J.P., and A. B. Fisher. 1979. "Glucose Metabolism in Rat Lung during Exposure to Hyperbaric O₂." *Journal of Applied Physiology Respiratory Environmental and Exercise Physiology* 46 (5): 943–49. <https://doi.org/10.1152/jappl.1979.46.5.943>.
- Batenburg, Aernoud A. Van, Karin M. Kazemier, Matthijs F.M. Van Oosterhout, Joanne J. Van Der Vis, Hendrik W. Van Es, Jan C. Grutters, Roel Goldschmeding, and Coline H.M. Van Moorsel. 2020. "From Organ to Cell: Multi-Level Telomere Length Assessment in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *PLoS ONE* 15 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226785>.
- Behr, Jürgen, Michael Kreuter, Marius M. Hoepfer, Hubert Wirtz, Jens Klotsche, Dirk Kosche, Stefan Andreas, *et al.* 2015. "Management of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Clinical Practice: The INSIGHTS-IPF Registry." *European Respiratory Journal* 46 (1): 186–96. <https://doi.org/10.1183/09031936.00217614>.
- Bergeron, A., P. Soler, M. Kambouchner, P. Loiseau, B. Milleron, D. Valeyre, A. J. Hance, and Abdellatif Tazi. 2003. "Cytokine Profiles in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Suggest an Important Role for TGF- β and IL-10." *European Respiratory Journal* 22 (1): 69–76. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00014703>.
- Bernard, Karen, Naomi J. Logsdon, Gloria A. Benavides, Yan Sanders, Jianhua

- Zhang, Victor M. Darley-USmar, and Victor J. Thannickal. 2018. "Glutaminolysis Is Required for Transforming Growth Factor-B1-Induced Myofibroblast Differentiation and Activation." *Journal of Biological Chemistry* 293 (4): 1218–28. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra117.000444>.
- Bernard, Karen, Naomi J. Logsdon, Saranya Ravi, Na Xie, Benjamin P. Persons, Sunad Rangarajan, Jaroslaw W. Zmijewski, *et al.* 2015. "Metabolic Reprogramming Is Required for Myofibroblast Contractility and Differentiation." *Journal of Biological Chemistry* 290 (42): 25427–38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.646984>.
- Bitterman, Kevin J., Rozalyn M. Anderson, Haim Y. Cohen, Magda Latorre-Esteves, and David A. Sinclair. 2002. "Inhibition of Silencing and Accelerated Aging by Nicotinamide, a Putative Negative Regulator of Yeast Sir2 and Human SIRT1." *Journal of Biological Chemistry* 277 (47): 45099–107. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205670200>.
- Bogan, Katrina L., and Charles Brenner. 2008. "Nicotinic Acid, Nicotinamide, and Nicotinamide Riboside: A Molecular Evaluation of NAD⁺ Precursor Vitamins in Human Nutrition." *Annual Review of Nutrition*. Annu Rev Nutr. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155443>.
- Bonnaud, Philippe, Martin Kolb, Tom Galt, Jennifer Robertson, Clinton Robbins, Martin Stampfli, Carol Lavery, Peter J. Margetts, Anita B. Roberts, and Jack Gauldie. 2004. "Smad3 Null Mice Develop Airspace Enlargement and Are Resistant to TGF- β -Mediated Pulmonary Fibrosis." *The Journal of Immunology* 173 (3): 2099–2108. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.2099>.
- Booth, Adam J., Ryan Hadley, Ashley M. Cornett, Alyssa A. Dreffs, Stephanie A. Matthes, Jessica L. Tsui, Kevin Weiss, *et al.* 2012. "Acellular Normal and Fibrotic Human Lung Matrices as a Culture System for in Vitro Investigation." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 186 (9): 866–76. <https://doi.org/10.1164/rccm.201204-0754OC>.
- Borthwick, L. A. 2016. "The IL-1 Cytokine Family and Its Role in Inflammation and Fibrosis in the Lung." *Seminars in Immunopathology*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0559-z>.
- Boutet, Agnès, Cristina A. De Frutos, Patrick H. Maxwell, M. José Mayol, J. Romero, and M. Angela Nieto. 2006. "Snail Activation Disrupts Tissue Homeostasis and Induces Fibrosis in the Adult Kidney." *EMBO Journal* 25 (23): 5603–13. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601421>.
- Broekelmann, T. J., A. H. Limper, T. V. Colby, and J. A. McDonald. 1991. "Transforming Growth Factor B1 Is Present at Sites of Extracellular Matrix Gene Expression in Human Pulmonary Fibrosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (15): 6642–46. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.15.6642>.
- Cabo, Rafael De, Didac Carmona-Gutierrez, Michel Bernier, Michael N. Hall, and Frank Madeo. 2014. "The Search for Antiaging Interventions: From Elixirs to Fasting Regimens." *Cell*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.031>.

- Cai, Guo qiang, Anni Zheng, Qingjiu Tang, Eric S. White, Chu Fang Chou, Candace L. Gladson, Mitchell A. Olman, and Qiang Ding. 2010. "Downregulation of FAK-Related Non-Kinase Mediates the Migratory Phenotype of Human Fibrotic Lung Fibroblasts." *Experimental Cell Research* 316 (9): 1600–1609. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.01.021>.
- Camenisch, Todd D., Daniël G.M. Molin, Anthony Person, Raymond B. Runyan, Adriana C. Gittenberger-de Groot, John A. McDonald, and Scott E. Klewer. 2002. "Temporal and Distinct TGF β Ligand Requirements during Mouse and Avian Endocardial Cushion Morphogenesis." *Developmental Biology* 248 (1): 170–81. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0731>.
- Campos, Silvia B., Sharon L. Ashworth, Sarah Wean, Melanie Hosford, Ruben M. Sandoval, Mark A. Hallett, Simon J. Atkinson, and Bruce A. Molitoris. 2009. "Cytokine-Induced F-Actin Reorganization in Endothelial Cells Involves RhoA Activation." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 296 (3). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00112.2008>.
- Cantó, Carles, Keir J. Menzies, and Johan Auwerx. 2015. "NAD⁺ Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus." *Cell Metabolism*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.023>.
- Cao, Lizhi, John Nicosia, Jacqueline Larouche, Yuanyuan Zhang, Haylee Bachman, Ashley C. Brown, Lars Holmgren, and Thomas H. Barker. 2017. "Detection of an Integrin-Binding Mechanoswitch within Fibronectin during Tissue Formation and Fibrosis." *ACS Nano* 11 (7): 7110–17. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b02755>.
- Carthy, Jonathon M. 2018. "TGF β Signaling and the Control of Myofibroblast Differentiation: Implications for Chronic Inflammatory Disorders." *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.25879>.
- Casoni, Gian Luca, Sara Tomassetti, Alberto Cavazza, Thomas V. Colby, Alessandra Dubini, Jay H. Ryu, Elisa Carretta, *et al.* 2014. "Transbronchial Lung Cryobiopsy in the Diagnosis of Fibrotic Interstitial Lung Diseases." *PLoS ONE* 9 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086716>.
- Chapman, Harold A. 2011. "Epithelial-Mesenchymal Interactions in Pulmonary Fibrosis." *Annual Review of Physiology* 73: 413–35. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142225>.
- Chen, Li Jun, Hong Ye, Qian Zhang, Feng Zhi Li, Lin Jie Song, Jie Yang, Qing Mu, *et al.* 2015. "Bleomycin Induced Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Pleural Mesothelial Cells." *Toxicology and Applied Pharmacology* 283 (2): 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.01.004>.
- Clark, J. B., G. M. Ferris, and S. Pinder. 1971. "Inhibition of Nuclear NAD Nucleosidase and Poly ADP-Ribose Polymerase Activity from Rat Liver by Nicotinamide and 5'-Methyl Nicotinamide." *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis* 238 (1): 82–85. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(71\)90012-8](https://doi.org/10.1016/0005-2787(71)90012-8).
- Clarke, Deborah L., Alan M. Carruthers, Tomas Mustelin, and Lynne A. Murray.

2013. "Matrix Regulation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: The Role of Enzymes." *Fibrogenesis and Tissue Repair*. Fibrogenesis Tissue Repair. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-6-20>.
- Collard, Harold R., Christopher J. Ryerson, Tamera J. Corte, Gisli Jenkins, Yasuhiro Kondoh, David J. Lederer, Joyce S. Lee, *et al.* 2016. "Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis an International Working Group Report." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. American Thoracic Society. <https://doi.org/10.1164/rccm.201604-0801CI>.
- Correia-Melo, Clara, Graeme Hewitt, and João F Passos. 2014. "Telomeres, Oxidative Stress and Inflammatory Factors: Partners in Cellular Senescence?" *Longevity & Healthspan* 3 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/2046-2395-3-1>.
- Crosby, Lynn M., and Christopher M. Waters. 2010. "Epithelial Repair Mechanisms in the Lung." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00361.2009>.
- Cui, Yanyan, Luyu Zhang, Wenjie Wang, Shanshan Ma, Hongtao Liu, Xingxing Zang, Yanting Zhang, and Fangxia Guan. 2019. "Downregulation of Nicotinamide N-Methyltransferase Inhibits Migration and Epithelial-Mesenchymal Transition of Esophageal Squamous Cell Carcinoma via Wnt/ β -Catenin Pathway." *Molecular and Cellular Biochemistry* 460 (1–2): 93–103. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03573-0>.
- Dai, Han, David A. Sinclair, James L. Ellis, and Clemens Steegborn. 2018. "Sirtuin Activators and Inhibitors: Promises, Achievements, and Challenges." *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.03.004>.
- Daniels, Craig E., Joseph A. Lasky, Andrew H. Limper, Kathleen Mieras, Edith Gabor, Darrell R. Schroeder, Jeffrey Chapman, *et al.* 2010. "Imatinib Treatment for Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Randomized Placebo-Controlled Trial Results." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181 (6): 604–10. <https://doi.org/10.1164/rccm.200906-0964OC>.
- Derynck, Rik, and Ying E. Zhang. 2003. "Smad-Dependent and Smad-Independent Pathways in TGF- β Family Signalling." *Nature*. Nature. <https://doi.org/10.1038/nature02006>.
- Desmouliere, A., M. Redard, I. Darby, and G. Gabbiani. 1995. "Apoptosis Mediates the Decrease in Cellularity during the Transition between Granulation Tissue and Scar." *American Journal of Pathology* 146 (1): 56–66. [/pmc/articles/PMC1870783/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1870783/).
- Desmouliere, A., L. Rubbia-Brandt, G. Grau, and G. Gabbiani. 1992. "Heparin Induces α -Smooth Muscle Actin Expression in Cultured Fibroblasts and in Granulation Tissue Myofibroblasts." *Laboratory Investigation* 67 (6): 716–26. <https://europepmc.org/article/med/1460862>.
- Desmoulière, Alexis, Chérif Badid, Marie Luce Bochaton-Piallat, and Giulio Gabbiani. 1997. "Apoptosis during Wound Healing, Fibrocontractive Diseases and Vascular Wall Injury." *International Journal of Biochemistry and Cell*

- Biology*. Int J Biochem Cell Biol. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(96\)00117-3](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(96)00117-3).
- Deursen, Jan M. Van. 2014. "The Role of Senescent Cells in Ageing." *Nature*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature13193>.
- Docherty, Neil G., Orhlaith E. O'Sullivan, Declan A. Healy, Madeline Murphy, Amanda J. O'Neill, John M. Fitzpatrick, and R. William G. Watson. 2006. "TGF-B1-Induced EMT Can Occur Independently of Its Proapoptotic Effects and Is Aided by EGF Receptor Activation." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 290 (5). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00406.2005>.
- Dong, Soon Kim, Harold R. Collard, and Talmadge E. King. 2006. "Classification and Natural History of the Idiopathic Interstitial Pneumonias." *Proceedings of the American Thoracic Society*. <https://doi.org/10.1513/pats.200601-005TK>.
- Dowman, Leona M., Christine F. McDonald, Steven Bozinovski, Ross Vlahos, Rebecca Gillies, Dodie Pouniotis, Catherine J. Hill, Nicole S.L. Goh, and Anne E. Holland. 2017. "Greater Endurance Capacity and Improved Dyspnoea with Acute Oxygen Supplementation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients without Resting Hypoxaemia." *Respirology* 22 (5): 957–64. <https://doi.org/10.1111/resp.13002>.
- Drakopanagiotakis, F., Lukasz Wujak, Malgorzata Wygrecka, and P. Markart. 2018. "Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Matrix Biology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.023>.
- Eckert, Mark A., Fabian Coscia, Agnieszka Chryplewicz, Jae Won Chang, Kyle M. Hernandez, Shawn Pan, Samantha M. Tienda, *et al.* 2019. "Proteomics Reveals NNMT as a Master Metabolic Regulator of Cancer-Associated Fibroblasts." *Nature* 569 (7758): 723–28. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1173-8>.
- Ehebauer, Franziska, Sharang Ghavampour, and Daniel Kraus. 2020. "Glucose Availability Regulates Nicotinamide N-Methyltransferase Expression in Adipocytes." *Life Sciences* 248 (May). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117474>.
- Emanuelli, Monica, Andrea Santarelli, Davide Sartini, Domenico Ciavarella, Valentina Rossi, Valentina Pozzi, Corrado Rubini, and Lorenzo Lo Muzio. 2010. "Nicotinamide N-Methyltransferase Upregulation Correlates with Tumour Differentiation in Oral Squamous Cell Carcinoma." *Histology and Histopathology* 25 (1): 15–20. <https://doi.org/10.14670/HH-25.15>.
- Epstein, Franklin H., Wayne A. Border, and Nancy A. Noble. 1994. "Transforming Growth Factor β in Tissue Fibrosis." *New England Journal of Medicine* 331 (19): 1286–92. <https://doi.org/10.1056/nejm199411103311907>.
- Evans, Rachel Anna, Ya Chung Tian, Robert Steadman, and Aled Owain Phillips. 2003. "TGF-B1-Mediated Fibroblast-Myofibroblast Terminal Differentiation - The Role of Smad Proteins." *Experimental Cell Research* 282 (2): 90–100. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(02\)00015-0](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(02)00015-0).
- Faner, Rosa, Mauricio Rojas, William MacNee, and Alvar Agustí. 2012. "Abnormal Lung Aging in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Idiopathic

- Pulmonary Fibrosis." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. Am J Respir Crit Care Med. <https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0282PP>.
- Fang, Hsin Yuan, Ching Yuang Lin, Kuan Chih Chow, Hung Che Huang, and Wen Je Ko. 2010. "Microarray Detection of Gene Overexpression in Primary Spontaneous Pneumothorax." *Experimental Lung Research* 36 (6): 323–30. <https://doi.org/10.3109/01902141003628579>.
- Faubert, Brandon, Kevin Y. Li, Ling Cai, Christopher T. Hensley, Jiyeon Kim, Lauren G. Zacharias, Chendong Yang, *et al.* 2017. "Lactate Metabolism in Human Lung Tumors." *Cell* 171 (2): 358-371.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.019>.
- Fedorowicz, Andrzej, Łukasz Mateuszuk, Grzegorz Kopec, Tomasz Skórka, Barbara Kutryb-Zajac, Agnieszka Zakrzewska, Maria Walczak, *et al.* 2016. "Activation of the Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT)-1-Methylnicotinamide (MNA) Pathway in Pulmonary Hypertension." *Respiratory Research* 17 (1). <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0423-7>.
- Fertala, Jolanta, Freddy Romero, Ross Summer, and Andrzej Fertala. 2017. "Target-Specific Delivery of an Antibody That Blocks the Formation of Collagen Deposits in Skin and Lung." *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy* 36 (5): 199–207. <https://doi.org/10.1089/mab.2017.0044>.
- Fingerlin, Tasha E., Elissa Murphy, Weiming Zhang, Anna L. Peljto, Kevin K. Brown, Mark P. Steele, James E. Loyd, *et al.* 2013. "Genome-Wide Association Study Identifies Multiple Susceptibility Loci for Pulmonary Fibrosis." *Nature Genetics* 45 (6): 613–20. <https://doi.org/10.1038/ng.2609>.
- Fischer, Aryeh, and Roland Du Bois. 2012. "Interstitial Lung Disease in Connective Tissue Disorders." *The Lancet*. Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61079-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61079-4).
- Flaherty, Kevin R., Talmadge E. King, Ganesh Raghu, Joseph P. Lynch, Thomas V. Colby, William D. Travis, Barry H. Gross, *et al.* 2004. "Idiopathic Interstitial Pneumonia: What Is the Effect of a Multidisciplinary Approach to Diagnosis?" *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 170 (8): 904–10. <https://doi.org/10.1164/rccm.200402-147OC>.
- Flier, Jeffrey S., Lisa H. Underhill, and Harold F. Dvorak. 1986. "Tumors: Wounds That Do Not Heal." *New England Journal of Medicine* 315 (26): 1650–59. <https://doi.org/10.1056/nejm198612253152606>.
- Gabasa, Marta, Marselina Arshakyan, Alejandro Llorente, Lourdes Chuliá-Peris, Irina Pavelescu, Antoni Xaubet, Javier Pereda, and Jordi Alcaraz. 2020. "Interleukin-1 β Modulation of the Mechanobiology of Primary Human Pulmonary Fibroblasts: Potential Implications in Lung Repair." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228417>.
- Gabasa, Marta, Dolores Royo, Maria Molina-Molina, Jordi Roca-Ferrer, Laura Pujols, Cesar Picado, Antoni Xaubet, and Javier Pereda. 2013. "Lung

- Myofibroblasts Are Characterized by Down-Regulated Cyclooxygenase-2 and Its Main Metabolite, Prostaglandin E2." *PLoS ONE* 8 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065445>.
- Gabasa, Marta. (2014). *Estudi del fenotip miofibroblast i la seva implicació en l'expressió de ciclooxigenasa-2 i en la secreció de prostaglandina E2 en la fibrosi pulmonar idiopàtica*. (Tesis doctoral). Universitat de Barcelona, España.
- Gabbiani, Giulio. 2003. "The Myofibroblast in Wound Healing and Fibrocontractive Diseases." *Journal of Pathology*. J Pathol. <https://doi.org/10.1002/path.1427>.
- Garrison, Garth, Steven K. Huang, Katsuhide Okunishi, Jacob P. Scott, Loka Raghu Kumar Penke, Anne M. Scruggs, and Marc Peters-Golden. 2013. "Reversal of Myofibroblast Differentiation by Prostaglandin E2." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 48 (5): 550–58. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0262OC>.
- Ge, Jing, Huachun Cui, Na Xie, Sami Banerjee, Sijia Guo, Shubham Dubey, Stephen Barnes, and Gang Liu. 2018. "Glutaminolysis Promotes Collagen Translation and Stability via A-Ketoglutarate-Mediated MTOR Activation and Proline Hydroxylation." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. American Thoracic Society. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0238OC>.
- Gharaee-Kermani, M., B. Hu, S. Phan, and M. Gyetko. 2009. "Recent Advances in Molecular Targets and Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Focus on TGF- β ; Signaling and the Myofibroblast." *Current Medicinal Chemistry* 16 (11): 1400–1417. <https://doi.org/10.2174/092986709787846497>.
- Gorgoulis, Vassilis, Peter D. Adams, Andrea Alimonti, Dorothy C. Bennett, Oliver Bischof, Cleo Bishop, Judith Campisi, *et al.* 2019. "Cellular Senescence: Defining a Path Forward." *Cell*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>.
- Grande, M. Teresa, Berta Sánchez-Laorden, Cristina López-Blau, Cristina A. De Frutos, Agnès Boutet, Miguel Arévalo, R. Grant Rowe, Stephen J. Weiss, José M. López-Novoa, and M. Angela Nieto. 2015. "Snail1-Induced Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition Drives Renal Fibrosis in Mice and Can Be Targeted to Reverse Established Disease." *Nature Medicine* 21 (9): 989–97. <https://doi.org/10.1038/nm.3901>.
- Guan, Wei-jie, Zheng-yi Ni, Yu Hu, Wen-hua Liang, Chun-quan Ou, Jian-xing He, Lei Liu, *et al.* 2020. "Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China." *New England Journal of Medicine* 382 (18): 1708–20. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2002032>.
- Guillamat-Prats, Raquel, Marta Camprubi-Rimblas, Ferranda Puig, Raquel Herrero, Neus Tantinyà, Anna Serrano-Mollar, and Antonio Artigas. 2020. "Alveolar Type II Cells or Mesenchymal Stem Cells: Comparison of Two Different Cell Therapies for the Treatment of Acute Lung Injury in Rats." *Cells* 9 (8). <https://doi.org/10.3390/cells9081816>.
- Guillamat-Prats, Raquel, Gemma Gay-Jordi, Antoni Xaubet, Victor I. Peinado, and

- Anna Serrano-Mollar. 2014. "Alveolar Type II Cell Transplantation Restores Pulmonary Surfactant Protein Levels in Lung Fibrosis." *Journal of Heart and Lung Transplantation* 33 (7): 758–65. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2014.03.008>.
- Hah, Young Sool, Hee Young Cho, Sun Young Jo, Young Sook Park, Tae Jin Yoon, and Eun Phil Heo. 2019. "Nicotinamide N-methyltransferase Induces the Proliferation and Invasion of Squamous Cell Carcinoma Cells." *Oncology Reports* 42 (5): 1805–14. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7315>.
- Hanahan, Douglas, and Lisa M. Coussens. 2012. "Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment." *Cancer Cell*. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>.
- Hanazawa, Yasuo, Kenichi Sato, Namiko Kuroiwa, Masako Ogawa, Atsuko Kuriyama, Mineko Asanagi, Noriko Kato, Yoichi Moriyama, Keisuke Horitsu, and Shinji Fujimura. 1994. "Characterization of Nicotinamide Methyltransferase in Livers of Mice Bearing Ehrlich Ascites Tumors: Preferential Increase of Activity." *Tumor Biology* 15 (1): 7–16. <https://doi.org/10.1159/000217868>.
- Hannan, Riley T., Shayn M. Peirce, and Thomas H. Barker. 2018. "Fibroblasts: Diverse Cells Critical to Biomaterials Integration." *ACS Biomaterials Science and Engineering*. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00244>.
- Hannum, Gregory, Justin Guinney, Ling Zhao, Li Zhang, Guy Hughes, Srinivas Sadda, Brandy Klotzle, *et al.* 2013. "Genome-Wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates." *Molecular Cell* 49 (2): 359–67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016>.
- Hansell, David M., Alexander A. Bankier, Heber MacMahon, Theresa C. McLoud, Nestor L. Müller, and Jacques Remy. 2008. "Fleischner Society: Glossary of Terms for Thoracic Imaging." *Radiology*. <https://doi.org/10.1148/radiol.2462070712>.
- Haren, Matthijs J. Van, Javier Sastre Toraño, Davide Sartini, Monica Emanuelli, Richard B. Parsons, and Nathaniel I. Martin. 2016. "A Rapid and Efficient Assay for the Characterization of Substrates and Inhibitors of Nicotinamide N-Methyltransferase." *Biochemistry* 55 (37): 5307–15. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00733>.
- Harmankaya, İsmail, Serra Akar, Serdar Uğraş, Abdül Hamid Güler, Huriye Ezveci, Meltem Aydoğdu, and Çetin Çelik. 2020. "Nicotinamide N-Methyltransferase Overexpression May Be Associated with Poor Prognosis in Ovarian Cancer." *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. <https://doi.org/10.1080/01443615.2020.1732891>.
- Hashimoto, Shu, Yasuhiro Gon, Ikuko Takeshita, Shuichiro Maruoka, and Takashi Horie. 2001. "IL-4 and IL-13 Induce Myofibroblastic Phenotype of Human Lung Fibroblasts through c-Jun NH2-Terminal Kinase-Dependent Pathway." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107 (6): 1001–8. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.114702>.

- Hetzel, M., M. Bachem, D. Anders, G. Trischler, and M. Faehling. 2005. "Different Effects of Growth Factors on Proliferation and Matrix Production of Normal and Fibrotic Human Lung Fibroblasts." *Lung* 183 (4): 225–37. <https://doi.org/10.1007/s00408-004-2534-z>.
- Hinz, Boris, Sem H. Phan, Victor J. Thannickal, Andrea Galli, Marie Luce Bochaton-Piallat, and Giulio Gabbiani. 2007. "The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins." *American Journal of Pathology* 170 (6): 1807–16. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070112>.
- Hinz, Boris, Sem H. Phan, Victor J. Thannickal, Marco Prunotto, Alexis Desmouliere, John Varga, Olivier De Wever, Marc Mareel, and Giulio Gabbiani. 2012. "Recent Developments in Myofibroblast Biology: Paradigms for Connective Tissue Remodeling." *American Journal of Pathology*. *Am J Pathol*. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.02.004>.
- Ho, Cheol Kim, Mahroo Mofarrahi, Theodoros Vassilakopoulos, Francois Maltais, Ioanna Sigala, Richard Debigare, Ioannis Bellenis, and Sabah N.A. Hussain. 2010. "Expression and Functional Significance of Nicotinamide N-Methyl Transferase in Skeletal Muscles of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181 (8): 797–805. <https://doi.org/10.1164/rccm.200906-0936OC>.
- Hoffman, Hal M., and Alan A. Wanderer. 2010. "Inflammasome and IL-1 β -Mediated Disorders." *Current Allergy and Asthma Reports*. *Curr Allergy Asthma Rep*. <https://doi.org/10.1007/s11882-010-0109-z>.
- Holland, Anne, and Catherine Hill. 2008. "Physical Training for Interstitial Lung Disease." *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006322.pub2>.
- Hong, Shangyu, Jose M. Moreno-Navarrete, Xiaojing Wei, Yusuke Kikukawa, Iphigenia Tzamelis, Deepthi Prasad, Yoonjin Lee, *et al.* 2015. "Nicotinamide N-Methyltransferase Regulates Hepatic Nutrient Metabolism through Sirt1 Protein Stabilization." *Nature Medicine* 21 (8): 887–94. <https://doi.org/10.1038/nm.3882>.
- Hong, Shangyu, Bo Zhai, and Pavlos Pissios. 2018. "Nicotinamide N-Methyltransferase Interacts with Enzymes of the Methionine Cycle and Regulates Methyl Donor Metabolism." *Biochemistry* 57 (40): 5775–79. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00561>.
- Hoshino, Jiro, Uta Kühne, and Hans Kröger. 1982. "Methylation of Nicotinamide in Rat Liver Cytosol and Its Correlation with Hepatocellular Proliferation." *BBA - General Subjects* 719 (3): 518–26. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(82\)90241-0](https://doi.org/10.1016/0304-4165(82)90241-0).
- Houtkooper, Riekelt H., Carles Cantó, Ronald J. Wanders, and Johan Auwerx. 2010. "The Secret Life of NAD⁺: An Old Metabolite Controlling New Metabolic Signaling Pathways." *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0026>.
- Hsu, Sarah, Marianne Kim, Lidia Hernandez, Valentina Grajales, Anne Noonan, Miriam Anver, Ben Davidson, and Christina M. Annunziata. 2012. "IKK- ϵ

- Coordinates Invasion and Metastasis of Ovarian Cancer." *Cancer Research* 72 (21): 5494–5504. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3993>.
- Huang, Steven K., and Marc Peters-Golden. 2008. "Eicosanoid Lipid Mediators in Fibrotic Lung Diseases: Ready for Prime Time?" *Chest* 133 (6): 1442–50. <https://doi.org/10.1378/chest.08-0306>.
- Hunninghake, Gary W., M. Bridget Zimmerman, David A. Schwartz, Talmadge E. King, Joseph Lynch, Richard Hegele, James Waldron, *et al.* 2001. "Utility of a Lung Biopsy for the Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164 (2): 193–96. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.2.2101090>.
- Hunninghake, Gary W., David A. Lynch, Jeffrey R. Galvin, Barry H. Gross, Nestor Müller, David A. Schwartz, Talmadge E. King, *et al.* 2003. "Radiologic Findings Are Strongly Associated with a Pathologic Diagnosis of Usual Interstitial Pneumonia." *Chest* 124 (4): 1215–23. <https://doi.org/10.1378/chest.124.4.1215>.
- Imai, Shin ichiro, and Leonard Guarente. 2014. "NAD⁺ and Sirtuins in Aging and Disease." *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.04.002>.
- Issa, Jean Pierre. 2014. "Aging and Epigenetic Drift: A Vicious Cycle." *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI69735>.
- Jablonski, Renea P., Seok Jo Kim, Paul Cheresh, David B. Williams, Luisa Morales-Nebreda, Yuan Cheng, Anjana Yeldandi, *et al.* 2017. "SIRT3 Deficiency Promotes Lung Fibrosis by Augmenting Alveolar Epithelial Cell Mitochondrial DNA Damage and Apoptosis." *FASEB Journal* 31 (6): 2520–32. <https://doi.org/10.1096/fj.201601077R>.
- Jafarian, Amir Hossein, Nema Mohamadian Roshan, Hossein Ayatollahi, Abbas Ali Omid, Masoumeh Ghaznavi, and Masoumeh Gharib. 2020. "Epstein-Barr Virus and Human Herpesvirus 8 in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Iranian Journal of Pathology* 15 (1): 30–33. <https://doi.org/10.30699/IJP.2019.77233.1728>.
- Jakubowski, Andrzej, Magdalena Sternak, Konrad Jablonski, Marta Ciszek-Lenda, Janusz Marcinkiewicz, and Stefan Chlopicki. 2016. "1-Methylnicotinamide Protects against Liver Injury Induced by Concanavalin A via a Prostacyclin-Dependent Mechanism: A Possible Involvement of IL-4 and TNF- α ." *International Immunopharmacology* 31 (February): 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.11.032>.
- James, Emma L., James A.E. Lane, Ryan D. Michalek, Edward D. Karoly, and E. Kenneth Parkinson. 2016. "Replicatively Senescent Human Fibroblasts Reveal a Distinct Intracellular Metabolic Profile with Alterations in NAD⁺ and Nicotinamide Metabolism." *Scientific Reports* 6 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep38489>.
- James, Emma L., Ryan D. Michalek, Gayani N. Pitiyage, Alice M. De Castro, Katie S. Vignola, Janice Jones, Robert P. Mohny, Edward D. Karoly, Stephen S. Prime, and Eric Kenneth Parkinson. 2015. "Senescent Human Fibroblasts

- Show Increased Glycolysis and Redox Homeostasis with Extracellular Metabolomes That Overlap with Those of Irreparable DNA Damage, Aging, and Disease." *Journal of Proteome Research* 14 (4): 1854–71. <https://doi.org/10.1021/pr501221g>.
- Jang, Joung S., Hee Y. Cho, Young J. Lee, Woo S. Ha, and Hwal W. Kim. 2004. "The Differential Proteome Profile of Stomach Cancer: Identification of the Biomarker Candidates." *Oncology Research* 14 (10): 491–99. <https://doi.org/10.3727/0965040042380441>.
- Jechlinger, Martin, Andreas Sommer, Richard Moriggl, Peter Seither, Norbert Kraut, Paola Capodiecci, Michael Donovan, Carlos Cordon-Cardo, Hartmut Beug, and Stefan Grünert. 2006. "Autocrine PDGFR Signaling Promotes Mammary Cancer Metastasis." *Journal of Clinical Investigation* 116 (6): 1561–70. <https://doi.org/10.1172/JCI24652>.
- Johkoh, Takeshi, Nestor L. Müller, Yannick Cartier, Peter V. Kavanagh, Thomas E. Hartman, Masanori Akira, Kazuya Ichikado, Masayuki Ando, and Hironobu Nakamura. 1999. "Idiopathic Interstitial Pneumonias: Diagnostic Accuracy of Thin-Section CT in 129 Patients." *Radiology* 211 (2): 555–60. <https://doi.org/10.1148/radiology.211.2.r99ma01555>.
- Jones, Mark G., Aurélie Fabre, Philipp Schneider, Francesco Cinetto, Giacomo Sgalla, Mark Mavrogordato, Sanjay Jogai, *et al.* 2016. "Three-Dimensional Characterization of Fibroblast Foci in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *JCI Insight* 1 (5). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.86375>.
- Jordan, Nicole Vincent, Gary L. Johnson, and Amy N. Abell. 2011. "Tracking the Intermediate Stages of Epithelial-Mesenchymal Transition in Epithelial Stem Cells and Cancer." *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cc.10.17.17188>.
- Jung, Jinkyu, Leo Jy Kim, Xiuxing Wang, Qiulian Wu, Tanwarat Sanvoranart, Christopher G. Hubert, Briana C. Prager, *et al.* 2017. "Nicotinamide Metabolism Regulates Glioblastoma Stem Cell Maintenance." *JCI Insight* 2 (10). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90019>.
- Kage, Hidenori, and Zea Borok. 2012. "EMT and Interstitial Lung Disease: A Mysterious Relationship." *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e3283566721>.
- Kaimori, Aki, James Potter, Jun Ya Kaimori, Connie Wang, Esteban Mezey, and Ayman Koteish. 2007. "Transforming Growth Factor-B1 Induces an Epithelial-to-Mesenchymal Transition State in Mouse Hepatocytes in Vitro." *Journal of Biological Chemistry* 282 (30): 22089–101. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700998200>.
- Kalluri, Raghu. 2016. "The Biology and Function of Fibroblasts in Cancer." *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>.
- Kalluri, Raghu, and Eric G. Neilson. 2003. "Epithelial-Mesenchymal Transition and Its Implications for Fibrosis." *Journal of Clinical Investigation* 112 (12): 1776–84. <https://doi.org/10.1172/jci20530>.

- Kalluri, Raghu, and Michael Zeisberg. 2006. "Fibroblasts in Cancer." *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>.
- Kanska, Justyna, Paul Joseph P. Aspuria, Barbie Taylor-Harding, Lindsay Spurka, Vincent Funari, Sandra Orsulic, Beth Y. Karlan, and W. Ruprecht Wiedemeyer. 2017. "Glucose Deprivation Elicits Phenotypic Plasticity via ZEB1- Mediated Expression of NNMT." *Oncotarget* 8 (16): 26200–220. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15429>.
- Kendall, Ryan T., and Carol A. Feghali-Bostwick. 2014. "Fibroblasts in Fibrosis: Novel Roles and Mediators." *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00123>.
- Khalil, N., R. N. O'Connor, H. W. Unruh, P. W. Warren, K. C. Flanders, A. Kemp, O. H. Berezney, and A. H. Greenberg. 1991. "Increased Production and Immunohistochemical Localization of Transforming Growth Factor-Beta in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 5 (2): 155–62. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/5.2.155>.
- Kim, E. J., B. M. Elicker, F. Maldonado, W. R. Webb, J. H. Ryu, J. H. Van Uden, J. S. Lee, T. E. King, and H. R. Collard. 2010. "Usual Interstitial Pneumonia in Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease." *European Respiratory Journal* 35 (6): 1322–28. <https://doi.org/10.1183/09031936.00092309>.
- Kim, Hyun-Jung, Beate C. Litzénburger, Xiaojiang Cui, David A. Delgado, Brian C. Grabiner, Xin Lin, Michael T. Lewis, *et al.* 2007. "Constitutively Active Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor Causes Transformation and Xenograft Growth of Immortalized Mammary Epithelial Cells and Is Accompanied by an Epithelial-to-Mesenchymal Transition Mediated by NF- κ B and Snail." *Molecular and Cellular Biology* 27 (8): 3165–75. <https://doi.org/10.1128/mcb.01315-06>.
- Kim, Jongmin, Seok Joo Hong, Eun Kyung Lim, Yun Suk Yu, Seung Whan Kim, Ji Hyeon Roh, In Gu Do, Jae Won Joh, and Dae Shick Kim. 2009. "Expression of Nicotinamide N-Methyltransferase in Hepatocellular Carcinoma Is Associated with Poor Prognosis." *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 28 (1): 20. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-20>.
- Kim, Kevin K., Matthias C. Kugler, Paul J. Wolters, Liliane Robillard, Michael G. Galvez, Alexis M. Brumwell, Dean Sheppard, and Harold A. Chapman. 2006. "Alveolar Epithelial Cell Mesenchymal Transition Develops in Vivo during Pulmonary Fibrosis and Is Regulated by the Extracellular Matrix." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (35): 13180–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605669103>.
- King, Jr, U. Costabel, J. F. Cordier, G. A. DoPico, R. M. DuBois, D. Lynch, J. P. Lynch, *et al.* 2000. "Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment: International Consensus Statement." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. American Lung Association. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.2.ats3-00>.
- King, Talmadge E., Williamson Z. Bradford, Socorro Castro-Bernardini, Elizabeth A.

- Fagan, Ian Glaspole, Marilyn K. Glassberg, Eduard Gorina, *et al.* 2014. "A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *New England Journal of Medicine* 370 (22): 2083–92. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1402582>.
- King, Talmadge E., Annie Pardo, and Moisés Selman. 2011. "Idiopathic Pulmonary Fibrosis." In *The Lancet*, 378:1949–61. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60052-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60052-4).
- Kis, Kornelia, Xiaoqiu Liu, and James S. Hagood. 2011. "Myofibroblast Differentiation and Survival in Fibrotic Disease." *Expert Reviews in Molecular Medicine*. Expert Rev Mol Med. <https://doi.org/10.1017/s1462399411001967>.
- Kistler, Kristin D., Luba Nalysnyk, Philip Rotella, and Dirk Esser. 2014. "Lung Transplantation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Systematic Review of the Literature." *BMC Pulmonary Medicine* 14 (1): 139. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-14-139>.
- Kocinaj, Altin, Tabassum Chaudhury, Mohammed S. Uddin, Rashad R. Junaid, David B. Ramsden, Geshanthi Hondhamuni, Fábio Klamt, Linda Parsons, and Richard B. Parsons. 2021. "High Expression of Nicotinamide N-Methyltransferase in Patients with Sporadic Alzheimer's Disease." *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02259-9>.
- Kolb, M., P. J. Margetts, D. C. Anthony, F. Pitossi, and J. Gauldie. 2001. "Transient Expression of IL-1 β Induces Acute Lung Injury and Chronic Repair Leading to Pulmonary Fibrosis." *Journal of Clinical Investigation* 107 (12): 1529–36. <https://doi.org/10.1172/JC112568>.
- Kolb, Martin, Francesco Bonella, and Lutz Wollin. 2017. "Therapeutic Targets in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Respiratory Medicine*. W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.07.062>.
- Kolodsick, Jill E., Marc Peters-Golden, José Larios, Galen B. Toews, Victor J. Thannickal, and Bethany B. Moore. 2003. "Prostaglandin E2 Inhibits Fibroblast to Myofibroblast Transition via E. Prostanoid Receptor 2 Signaling and Cyclic Adenosine Monophosphate Elevation." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 29 (5): 537–44. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0243OC>.
- Kottmann, Robert Matthew, Ajit A. Kulkarni, Katie A. Smolnycki, Elizabeth Lyda, Thinesh Dahanayake, Rami Salibi, Sylvie Honnons, *et al.* 2012. "Lactic Acid Is Elevated in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Induces Myofibroblast Differentiation via PH-Dependent Activation of Transforming Growth Factor- β ." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 186 (8): 740–51. <https://doi.org/10.1164/rccm.201201-0084OC>.
- Kraus, Daniel, Qin Yang, Dong Kong, Alexander S. Banks, Lin Zhang, Joseph T. Rodgers, Eija Pirinen, *et al.* 2014. "Nicotinamide N-Methyltransferase Knockdown Protects against Diet-Induced Obesity." *Nature* 508 (7495): 258–62. <https://doi.org/10.1038/nature13198>.
- Kropski, Jonathan A., Daphne B. Mitchell, Cheryl Markin, Vasilij V. Polosukhin,

- Leena Choi, Joyce E. Johnson, William E. Lawson, *et al.* 2014. "A Novel Dyskerin (DKC1) Mutation Is Associated with Familial Interstitial Pneumonia." *Chest* 146 (1): e1–7. <https://doi.org/10.1378/chest.13-2224>.
- Kugel, Sita, and Raul Mostoslavsky. 2014. "Chromatin and beyond: The Multitasking Roles for SIRT6." *Trends in Biochemical Sciences*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.002>.
- Kuhn, C., and J. A. McDonald. 1991. "The Roles of the Myofibroblast in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Ultrastructural and Immunohistochemical Features of Sites of Active Extracellular Matrix Synthesis." *American Journal of Pathology* 138 (5): 1257–65. [/pmc/articles/PMC1886011/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1886011/).
- Kulkarni, Tejaswini, Joao de Andrade, Yong Zhou, Tracy Luckhardt, and Victor J. Thannickal. 2016. "Alveolar Epithelial Disintegrity in Pulmonary Fibrosis." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00115.2016>.
- Kuwano, Kazuyoshi, Ritsuko Kunitake, Masayuki Kawasaki, Yoshitugu Nomoto, Naoki Hagimoto, Yoichi Nakanishi, and Nobuyuki Hara. 1996. "P21(Waf1/Cip1/Sdi1) and P53 Expression in Association with DNA Strand Breaks in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154 (2): 477–83. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.2.8756825>.
- Lamouille, Samy, and Rik Derynck. 2010. "Emergence of the Phosphoinositide 3-Kinase-Akt- Mammalian Target of Rapamycin Axis in Transforming Growth Factor- β -Induced Epithelial- Mesenchymal Transition." *Cells Tissues Organs* 193 (1–2): 8–22. <https://doi.org/10.1159/000320172>.
- Larsen, Kristoffer, Ellen Tufvesson, Johan Malmström, Matthias Mörgelin, Marie Wildt, Annika Andersson, Anna Lindström, *et al.* 2004. "Presence of Activated Mobile Fibroblasts in Bronchoalveolar Lavage from Patients with Mild Asthma." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 170 (10): 1049–56. <https://doi.org/10.1164/rccm.200404-507OC>.
- Larsson, Ola, Deanna Diebold, Danhua Fan, Mark Peterson, Richard Seonghun Nho, Peter B. Bitterman, and Craig A. Henke. 2008. "Fibrotic Myofibroblasts Manifest Genome-Wide Derangements of Translational Control." *PLoS ONE* 3 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003220>.
- Lederer, David J., and Fernando J. Martinez. 2018. "Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1705751>.
- Leung, Lester Y, David Weitz, and Daniel Tschumperlin. 2007. "A New Microrheometric Approach Reveals Individual and Cooperative Roles for TGF- β 1 and IL-1 β in Fibroblast-Mediated Stiffening of Collagen Gels." *Article in The FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7510com>.
- Ley, Brett, and Harold R. Collard. 2013. "Epidemiology of Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Clinical Epidemiology*. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S54815>.
- Ley, Brett, Christopher J. Ryerson, Eric Vittinghoff, Jay H. Ryu, Sara Tomassetti, Joyce S. Lee, Venerino Poletti, *et al.* 2012. "A Multidimensional Index and

- Staging System for Idiopathic Pulmonary Fibrosis.” *Annals of Internal Medicine* 156 (10): 684–95. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-156-10-201205150-00004>.
- Li, Chao, and John F. Kummerle. 2014. “Mechanisms That Mediate the Development of Fibrosis in Patients with Crohn’s Disease.” *Inflammatory Bowel Diseases*. Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000043>.
- Li, Shimeng, Lu Qiao, Zhaowei Yang, and Chengyan He. 2018. “Prognostic Value of Nicotinamide N-Methyltransferase Expression in Patients with Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01407>.
- Lie, Pearl P.Y., C. Yan Cheng, and Dolores D. Mruk. 2012. “The Biology of Interleukin-1: Emerging Concepts in the Regulation of the Actin Cytoskeleton and Cell Junction Dynamics.” *Cellular and Molecular Life Sciences*. Cell Mol Life Sci. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0760-0>.
- Lim, Bo-Hyun, Bok-Im Cho, Yu Na Kim, Jae Won Kim, Soon-Tae Park, and Chang-Won Lee. 2006. “Overexpression of Nicotinamide N-Methyltransferase in Gastric Cancer Tissues and Its Potential Post-Translational Modification.” *Experimental & Molecular Medicine* 38 (5): 455–65. <https://doi.org/10.1038/emm.2006.54>.
- Lim, Bo Hyun, Bok Im Cho, Na Kim Yu, Won Kim Jae, Soon Tae Park, and Chang Won Lee. 2006. “Overexpression of Nicotinamide N-Methyltransferase in Gastric Cancer Tissues and Its Potential Post-Translational Modification.” *Experimental and Molecular Medicine* 38 (5): 455–65. <https://doi.org/10.1038/emm.2006.54>.
- Liu, Fei, Justin D. Mih, Barry S. Shea, Alvin T. Kho, Asma S. Sharif, Andrew M. Tager, and Daniel J. Tschumperlin. 2010. “Feedback Amplification of Fibrosis through Matrix Stiffening and COX-2 Suppression.” *Journal of Cell Biology* 190 (4): 693–706. <https://doi.org/10.1083/jcb.201004082>.
- Liu, Karolina Y., Rakhee J. Mistry, Carlos A. Aguirre, Eirini S. Fasouli, Martin G. Thomas, Fábio Klamt, David B. Ramsden, and Richard B. Parsons. 2015. “Nicotinamide N-Methyltransferase Increases Complex i Activity in SH-SY5Y Cells via Sirtuin 3.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 467 (3): 491–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.023>.
- Liu, Tianju, Francina Gonzalez De Los Santos, and Sem H. Phan. 2017. “The Bleomycin Model of Pulmonary Fibrosis.” In *Methods in Molecular Biology*, 1627:27–42. Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_2.
- Lomas, Nicola J., Keira L. Watts, Khondoker M. Akram, Nicholas R. Forsyth, and Monica A. Spiteri. 2012. “Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Immunohistochemical Analysis Provides Fresh Insights into Lung Tissue Remodelling with Implications for Novel Prognostic Markers.” *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 5 (1): 58–71. www.ijcep.com.
- López-Otín, Carlos, Maria A. Blasco, Linda Partridge, Manuel Serrano, and Guido

- Kroemer. 2013. "The Hallmarks of Aging." *Cell*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.
- Lu, X. M., and H. Long. 2018. "Nicotinamide N-Methyltransferase as a Potential Marker for Cancer." *Neoplasma*. AEPRESS, s.r.o. https://doi.org/10.4149/neo_2018_171024N680.
- Marmai, Cecilia, Rachel E. Sutherland, Kevin K. Kim, Gregory M. Dolganov, Xiaohui Fang, Sophia S. Kim, Shuwei Jiang, *et al.* 2011. "Alveolar Epithelial Cells Express Mesenchymal Proteins in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 301 (1): 71–78. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00212.2010>.
- Marsh, Timothy, Kristian Pietras, and Sandra S. McAllister. 2013. "Fibroblasts as Architects of Cancer Pathogenesis." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.10.013>.
- Martinez, Fernando J., Harold R. Collard, Annie Pardo, Ganesh Raghu, Luca Richeldi, Moises Selman, Jeffrey J. Swigris, Hiroyuki Taniguchi, and Athol U. Wells. 2017. "Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.74>.
- Maschler, Sabine M., Gerhard Wirl, Herbert Spring, Dorothea V. Bredow, Isabelle Sordat, Hartmut Beug, and Ernst Reichmann. 2005. "Tumor Cell Invasiveness Correlates with Changes in Integrin Expression and Localization." *Oncogene* 24 (12): 2032–41. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208423>.
- Mathai, Susan K., Chad A. Newton, David A. Schwartz, and Christine Kim Garcia. 2016. "Pulmonary Fibrosis in the Era of Stratified Medicine." *Thorax*. BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209172>.
- McDonough, John E., Dries S. Martens, Naoya Tanabe, Farida Ahangari, Stijn E. Verleden, Karen Maes, Geert M. Verleden, *et al.* 2018. "A Role for Telomere Length and Chromosomal Damage in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Respiratory Research* 19 (1): 132. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0838-4>.
- Mia, Masum M., Miriam Boersema, and Ruud A. Bank. 2014. "Interleukin-1 β Attenuates Myofibroblast Formation and Extracellular Matrix Production in Dermal and Lung Fibroblasts Exposed to Transforming Growth Factor-B1." *PLoS ONE* 9 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091559>.
- Micheli, V., H. A. Simmonds, S. Sestini, and C. Ricci. 1990. "Importance of Nicotinamide as an NAD Precursor in the Human Erythrocyte." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 283 (1): 40–45. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90609-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90609-3).
- Morell, Ferran, Ana Villar, María Ángeles Montero, Xavier Muñoz, Thomas V. Colby, Sudhakar Pipvath, María Jesús Cruz, and Ganesh Raghu. 2013. "Chronic Hypersensitivity Pneumonitis in Patients Diagnosed with Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Prospective Case-Cohort Study." *The Lancet Respiratory Medicine* 1 (9): 685–94. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70191-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70191-7).
- Mori, Valerio, Adolfo Amici, Francesca Mazzola, Michele Di Stefano, Laura Conforti,

- Giulio Magni, Silverio Ruggieri, Nadia Raffaelli, and Giuseppe Orsomando. 2014. "Metabolic Profiling of Alternative NAD Biosynthetic Routes in Mouse Tissues." *PLoS ONE* 9 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113939>.
- Mouw, Janna K., Guanqing Ou, and Valerie M. Weaver. 2014. "Extracellular Matrix Assembly: A Multiscale Deconstruction." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm3902>.
- Mubarak, K. K., A. Montes-Worboys, D. Regev, N. Nasreen, K. A. Mohammed, I. Faruqi, E. Hensel, *et al.* 2012. "Parenchymal Trafficking of Pleural Mesothelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *European Respiratory Journal* 39 (1): 133–40. <https://doi.org/10.1183/09031936.00141010>.
- Mulugeta, Surafel, Shin Ichi Nureki, and Michael F. Beers. 2015. "Lost after Translation: Insights from Pulmonary Surfactant for Understanding the Role of Alveolar Epithelial Dysfunction and Cellular Quality Control in Fibrotic Lung Disease." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 309 (6): L507–25. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00139.2015>.
- Muñoz-Espín, Daniel, and Manuel Serrano. 2014. "Cellular Senescence: From Physiology to Pathology." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>.
- Neelakantan, Harshini, Camille R. Brightwell, Ted G. Graber, Rosario Maroto, Hua Yu Leo Wang, Stanton F. McHardy, John Papaconstantinou, Christopher S. Fry, and Stanley J. Watowich. 2019. "Small Molecule Nicotinamide N-Methyltransferase Inhibitor Activates Senescent Muscle Stem Cells and Improves Regenerative Capacity of Aged Skeletal Muscle." *Biochemical Pharmacology* 163 (May): 481–92. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.008>.
- Neelakantan, Harshini, Virginia Vance, Michael D. Wetzel, Hua Yu Leo Wang, Stanton F. McHardy, Celeste C. Finnerty, Jonathan D. Hommel, and Stanley J. Watowich. 2018. "Selective and Membrane-Permeable Small Molecule Inhibitors of Nicotinamide N-Methyltransferase Reverse High Fat Diet-Induced Obesity in Mice." *Biochemical Pharmacology* 147 (January): 141–52. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.11.007>.
- Neelakantan, Harshini, Hua Yu Wang, Virginia Vance, Jonathan D. Hommel, Stanton F. McHardy, and Stanley J. Watowich. 2017. "Structure-Activity Relationship for Small Molecule Inhibitors of Nicotinamide N-Methyltransferase." *Journal of Medicinal Chemistry* 60 (12): 5015–28. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00389>.
- Nicholson, Andrew G., Laura G. Fulford, Thomas V. Colby, Roland M. Du Bois, David M. Hansell, and Athol U. Wells. 2002. "The Relationship between Individual Histologic Features and Disease Progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166 (2): 173–77. <https://doi.org/10.1164/rccm.2109039>.
- Nieto, M. Angela, Ruby Yun Y.J. Huang, Rebecca A.A. Jackson, and Jean Paul P. Thiery. 2016. "EMT: 2016." *Cell*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>.

- Nigdelioglu, Recep, Robert B. Hamanaka, Angelo Y. Meliton, Erin O'Leary, Leah J. Witt, Takugo Cho, Kaitlyn Sun, *et al.* 2016. "Transforming Growth Factor (TGF)- β Promotes de Novo Serine Synthesis for Collagen Production." *Journal of Biological Chemistry* 291 (53): 27239–51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.756247>.
- Nishimura, K., T. Izumi, M. Kitaichi, S. Nagai, and H. Itoh. 1993. "The Diagnostic Accuracy of High-Resolution Computed Tomography in Diffuse Infiltrative Lung Diseases." *Chest* 104 (4): 1149–55. <https://doi.org/10.1378/chest.104.4.1149>.
- Noth, Imre, Kevin J. Anstrom, Sara Bristol Calvert, Joao De Andrade, Kevin R. Flaherty, Craig Glazer, Robert J. Kaner, and Mitchell A. Olman. 2012. "A Placebo-Controlled Randomized Trial of Warfarin in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 186 (1): 88–95. <https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0314OC>.
- Noth, Imre, Yingze Zhang, Shwu Fan Ma, Carlos Flores, Mathew Barber, Yong Huang, Steven M. Broderick, *et al.* 2013. "Genetic Variants Associated with Idiopathic Pulmonary Fibrosis Susceptibility and Mortality: A Genome-Wide Association Study." *The Lancet Respiratory Medicine* 1 (4): 309–17. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70045-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70045-6).
- Oberringer, Martin, Claudia Meins, Monika Bubel, and Tim Pohlemann. 2007. "A New in Vitro Wound Model Based on the Co-Culture of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells and Human Dermal Fibroblasts." *Biology of the Cell* 99 (4): 197–207. <https://doi.org/10.1042/bc20060116>.
- Omote, Norihito, Hiroyuki Taniguchi, Yasuhiro Kondoh, Naohiro Watanabe, Koji Sakamoto, Tomoki Kimura, Kensuke Kataoka, *et al.* 2015. "Lung-Dominant Connective Tissue Disease Clinical, Radiologic, and Histologic Features." *Chest* 148 (6): 1438–46. <https://doi.org/10.1378/chest.14-3174>.
- Parisi, Valentina, and Dario Leosco. 2020. "Precision Medicine in COVID-19: IL-1 β a Potential Target." *JACC: Basic to Translational Science* 5 (5): 543–44. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2020.04.006>.
- Parker, Matthew W., Daniel Rossi, Mark Peterson, Karen Smith, Kristina Sikstrom, Eric S. White, John E. Connett, Craig A. Henke, Ola Larsson, and Peter B. Bitterman. 2014. "Fibrotic Extracellular Matrix Activates a Profibrotic Positive Feedback Loop." *Journal of Clinical Investigation* 124 (4): 1622–35. <https://doi.org/10.1172/JCI71386>.
- Parsons, Richard B., Marie Louise Smith, Adrian C. Williams, Rosemary H. Waring, and David B. Ramsden. 2002. "Expression of Nicotinamide N-Methyltransferase (E.C. 2.1.1.1) in the Parkinsonian Brain." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 61 (2): 111–24. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.2.111>.
- Parsons, Richard B., Stuart W. Smith, Rosemary H. Waring, Adrian C. Williams, and David B. Ramsden. 2003. "High Expression of Nicotinamide N-Methyltransferase in Patients with Idiopathic Parkinson's Disease." *Neuroscience Letters* 342 (1–2): 13–16. <https://doi.org/10.1016/S0304->

3940(03)00218-0.

- Pechkovsky, Dmitri V., Cecilia M. Prêle, John Wong, Cory M. Hogaboam, Robin J. McAnulty, Geoffrey J. Laurent, Samuel S.M. Zhang, Moisés Selman, Steven E. Mutsaers, and Darryl A. Knight. 2012. "STAT3-Mediated Signaling Dysregulates Lung Fibroblast-Myofibroblast Activation and Differentiation in UIP/IPF." *American Journal of Pathology* 180 (4): 1398–1412. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.12.022>.
- Peljto, Anna L., Moises Selman, Dong Soon Kim, Elissa Murphy, Laura Tucker, Annie Pardo, Jung Su Lee, *et al.* 2015. "The MUC5B Promoter Polymorphism Is Associated with Idiopathic Pulmonary Fibrosis in a Mexican Cohort but Is Rare among Asian Ancestries." *Chest* 147 (2): 460–64. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0867>.
- Phan, Sem H. 2008. "Biology of Fibroblasts and Myofibroblasts." In *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5:334–37. American Thoracic Society. <https://doi.org/10.1513/pats.200708-146DR>.
- Phan, Sem H.. 2012. "Genesis of the Myofibroblast in Lung Injury and Fibrosis." In *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9:148–52. Proc Am Thorac Soc. <https://doi.org/10.1513/pats.201201-011AW>.
- Piera-Velazquez, Sonsoles, Zhaodong Li, and Sergio A. Jimenez. 2011. "Role of Endothelial-Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Fibrotic Disorders." *American Journal of Pathology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.06.001>.
- Pissios, Pavlos. 2017. "Nicotinamide N-Methyltransferase: More Than a Vitamin B3 Clearance Enzyme." *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.02.004>.
- Postlethwaite, A. E., R. Raghov, G. P. Stricklin, H. Poppleton, J. M. Seyer, and A. H. Kang. 1988. "Modulation of Fibroblast Functions by Interleukin 1: Increased Steady-State Accumulation of Type I Procollagen Messenger RNAs and Stimulation of Other Functions but Not Chemotaxis by Human Recombinant Interleukin 1 α and β ." *Journal of Cell Biology* 106 (2): 311–18. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.2.311>.
- Povedano, Juan M., Paula Martinez, Juana M. Flores, Francisca Mulero, and Maria A. Blasco. 2015. "Mice with Pulmonary Fibrosis Driven by Telomere Dysfunction." *Cell Reports* 12 (2): 286–99. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.028>.
- Pozzi, Valentina, Giulia Di Ruscio, Davide Sartini, Roberto Campagna, Riccardo Seta, Paola Fulvi, Alexia Vici, *et al.* 2018. "Clinical Performance and Utility of a Nnmt-Based Urine Test for Bladder Cancer." *International Journal of Biological Markers* 33 (1): 94–101. <https://doi.org/10.5301/ijbm.5000311>.
- Pulido, Inés. (2017). Análisis genómico funcional de la resistencia a las terapias anti-EGFR asociada al fenotipo mesenquimal en el cáncer pulmonar. Universitat de València, España.
- Qunn, Lei, Tamiko Takemura, Soichiro Ikushima, Tsunehiro Ando, Takashi Yanagawa, Osamu Akiyama, Masaru Oritsu, Noboru Tanaka, and Toshio

- Kuroki. 2002. "Hyperplastic Epithelial Foci in Honeycomb Lesions in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Virchows Archiv* 441 (3): 271–78. <https://doi.org/10.1007/s00428-002-0618-9>.
- Raghu, G., and K. C. Meyer. 2012. "Silent Gastro-Oesophageal Reflux and Microaspiration in IPF: Mounting Evidence for Anti-Reflux Therapy?" *European Respiratory Journal*. <https://doi.org/10.1183/09031936.00211311>.
- Raghu, Ganesh. 2011. "Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Increased Survival with 'Gastroesophageal Reflux Therapy': Fact or Fallacy?" *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. <https://doi.org/10.1164/rccm.201110-1842ED>.
- Raghu, Ganesh. 2017. "Pharmacotherapy for Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Current Landscape and Future Potential." *European Respiratory Review*. European Respiratory Society. <https://doi.org/10.1183/16000617.0071-2017>.
- Raghu, Ganesh, Juergen Behr, Kevin K. Brown, Jim J. Egan, Steven M. Kawut, Kevin R. Flaherty, Fernando J. Martinez, *et al.* 2013. "Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis with Ambrisentan: A Parallel, Randomized Trial." *Annals of Internal Medicine* 158 (9): 641–49. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-9-201305070-00003>.
- Raghu, Ganesh, Shih Yin Chen, Wei Shi Yeh, Brad Maroni, Qian Li, Yuan Chi Lee, and Harold R. Collard. 2014. "Idiopathic Pulmonary Fibrosis in US Medicare Beneficiaries Aged 65 Years and Older: Incidence, Prevalence, and Survival, 2001-11." *The Lancet Respiratory Medicine* 2 (7): 566–72. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70101-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70101-8).
- Raghu, Ganesh, Harold R. Collard, Jim J. Egan, Fernando J. Martinez, Juergen Behr, Kevin K. Brown, Thomas V. Colby, *et al.* 2011. "An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-Based Guidelines for Diagnosis and Management." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183 (6): 788–824. <https://doi.org/10.1164/rccm.2009-040GL>.
- Raghu, Ganesh, Martine Remy-Jardin, Jeffrey L. Myers, Luca Richeldi, Christopher J. Ryerson, David J. Lederer, Juergen Behr, *et al.* 2018. "Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 198 (5): e44–68. <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1255ST>.
- Raghu, Ganesh, Bram Rochweg, Yuan Zhang, Carlos A. Cuello Garcia, Arata Azuma, Juergen Behr, Jan L. Brozek, *et al.* 2015. "An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 192 (2): e3–19. <https://doi.org/10.1164/rccm.201506-1063ST>.
- Raghu, Ganesh, Derek Weycker, John Edelsberg, Williamson Z. Bradford, and Gerry Oster. 2006. "Incidence and Prevalence of Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 174 (7):

- 810–16. <https://doi.org/10.1164/rccm.200602-163OC>.
- Ramirez, Horacio, Shailee B. Patel, and Irena Pastar. 2014. "The Role of TGF β Signaling in Wound Epithelialization." *Advances in Wound Care* 3 (7): 482–91. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0466>.
- Ramos, Carlos, Martha Montaña, Jorge García-Alvarez, Víctor Ruiz, Bruce D. Uhal, Moises Selman, and Annie Pardo. 2001. "Fibroblasts from Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Normal Lungs Differ in Growth Rate, Apoptosis, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Expression." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 24 (5): 591–98. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.24.5.4333>.
- Rianna, Carmela, Manfred Radmacher, and Sanjay Kumar. 2020. "Direct Evidence That Tumor Cells Soften When Navigating Confined Spaces." *Molecular Biology of the Cell* 31 (16): 1726–34. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-10-0588>.
- Richeldi, Luca, Roland M. du Bois, Ganesh Raghu, Arata Azuma, Kevin K. Brown, Ulrich Costabel, Vincent Cottin, *et al.* 2014. "Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *New England Journal of Medicine* 370 (22): 2071–82. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1402584>.
- Roca-Ferrer, Jordi, Francesc J. Garcia-Garcia, Javier Pereda, Maria Perez-Gonzalez, Laura Pujols, Isam Alobid, Joaquim Mullol, and Cesar Picado. 2011. "Reduced Expression of COXs and Production of Prostaglandin E2 in Patients with Nasal Polyps with or without Aspirin-Intolerant Asthma." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128 (1): 66-72.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.065>.
- Roessler, Markus, Wolfgang Rollinger, Liliana Mantovani-Endl, Marie Luise Hagmann, Stefan Palme, Peter Berndt, Alfred M. Engel, *et al.* 2006. "Identification of PSME3 as a Novel Serum Tumor Marker for Colorectal Cancer by Combining Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis with a Strictly Mass Spectrometry-Based Approach for Data Analysis." *Molecular and Cellular Proteomics* 5 (11): 2092–2101. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600118-MCP200>.
- Rubbia-Brandt, Laura, André Pascal Sappino, and Giulio Gabbiani. 1991. "Locally Applied GM-CSF Induces the Accumulation of α -Smooth Muscle Actin in Containing Myofibroblasts." *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology* 60 (1): 73–82. <https://doi.org/10.1007/BF02899530>.
- Rudolphi, Bianca, Benedikt Zapp, Nils A. Kraus, Franziska Ehebauer, Bettina J. Kraus, and Daniel Kraus. 2018. "Body Weight Predicts Nicotinamide N-Methyltransferase Activity in Mouse Fat." *Endocrine Research* 43 (1): 55–63. <https://doi.org/10.1080/07435800.2017.1381972>.
- Rudzka, Dominika A., Giulia Spennati, David J. McGarry, Ya Hua Chim, Matthew Neilson, Aleksandra Ptak, June Munro, *et al.* 2019. "Migration through Physical Constraints Is Enabled by MAPK-Induced Cell Softening via Actin Cytoskeleton Re-Organization." *Journal of Cell Science* 132 (11). <https://doi.org/10.1242/jcs.224071>.

- Sadighi Akha, Amir A. 2018. "Aging and the Immune System: An Overview." *Journal of Immunological Methods*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.08.005>.
- Salama, Rafik, Mahito Sadaie, Matthew Hoare, and Masashi Narita. 2014. "Cellular Senescence and Its Effector Programs." *Genes and Development*. Genes Dev. <https://doi.org/10.1101/gad.235184.113>.
- Sartini, Davide, Andrea Santarelli, Valentina Rossi, Gaia Goteri, Corrado Rubini, Domenico Ciavarella, Lorenzo Lo Muzio, and Monica Emanuelli. 2007. "Nicotinamide N-Methyltransferase Upregulation Inversely Correlates with Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma." *Molecular Medicine* 13 (7–8): 415–21. <https://doi.org/10.2119/2007-00035.Sartini>.
- Savarimuthu Francis, Santiyagu M., Jill E. Larsen, Sandra J. Pavey, Edwina E. Duhig, Belinda E. Clarke, Rayleen V. Bowman, Nick K. Hayward, Kwun M. Fong, and Ian A. Yang. 2011. "Genes and Gene Ontologies Common to Airflow Obstruction and Emphysema in the Lungs of Patients with COPD." *PLoS ONE* 6 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017442>.
- Saxena, Amit, Wei Chen, Ya Su, Vikrant Rai, Olisambu U. Uche, Na Li, and Nikolaos G. Frangogiannis. 2013. "IL-1 Induces Proinflammatory Leukocyte Infiltration and Regulates Fibroblast Phenotype in the Infarcted Myocardium." *The Journal of Immunology* 191 (9): 4838–48. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300725>.
- Schafer, Marissa J., Thomas A. White, Koji Iijima, Andrew J. Haak, Giovanni Ligresti, Elizabeth J. Atkinson, Ann L. Oberg, *et al.* 2017. "Cellular Senescence Mediates Fibrotic Pulmonary Disease." *Nature Communications* 8 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms14532>.
- Schuliga, Michael, Christopher Grainge, Glen Westall, and Darryl Knight. 2018. "The Fibrogenic Actions of the Coagulant and Plasminogen Activation Systems in Pulmonary Fibrosis." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.02.016>.
- Scotton, Chris J., and Rachel C. Chambers. 2007. "Molecular Targets in Pulmonary Fibrosis: The Myofibroblast in Focus." *Chest* 132 (4): 1311–21. <https://doi.org/10.1378/chest.06-2568>.
- Scotton, Chris J., and Rachel C. Chambers. 2010. "Bleomycin Revisited: Towards a More Representative Model of IPF?" *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00258.2010>.
- Seibold, Max A., Anastasia L. Wise, Marcy C. Speer, Mark P. Steele, Kevin K. Brown, James E. Loyd, Tasha E. Fingerlin, *et al.* 2011. "A Common MUC5B Promoter Polymorphism and Pulmonary Fibrosis." *New England Journal of Medicine* 364 (16): 1503–12. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1013660>.
- Selman, M., Jr King, and A. Pardo. 2001. "Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy." *Annals of Internal Medicine*. American College of Physicians. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-2-200101160-00015>.

- Selman, Moisés, Carlos López-Otín, and Annie Pardo. 2016. "Age-Driven Developmental Drift in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *European Respiratory Journal* 48 (2): 538–52. <https://doi.org/10.1183/13993003.00398-2016>.
- Selman, Moisés, and Annie Pardo. 2014. "Revealing the Pathogenic and Aging-Related Mechanisms of the Enigmatic Idiopathic Pulmonary Fibrosis: An Integral Model." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 189 (10): 1161–72. <https://doi.org/10.1164/rccm.201312-2221PP>.
- Sen, Payel, Parisha P. Shah, Raffaella Nativio, and Shelley L. Berger. 2016. "Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging." *Cell*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.050>.
- Serini, Guido, Marie Luce Bochaton-Piallat, Patricia Ropraz, Antoine Geinoz, Laura Borsi, Luciano Zardi, and Giulio Gabbiani. 1998. "The Fibronectin Domain ED-A Is Crucial for Myofibroblastic Phenotype Induction by Transforming Growth Factor-B1." *Journal of Cell Biology* 142 (3): 873–81. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.3.873>.
- Serrano-Mollar, Anna. 2012. "La Célula Epitelial Como Factor Etiopatogénico de La Fibrosis Pulmonar." *Archivos de Bronconeumología* 48 (SUPPL.2): 2–6. [https://doi.org/10.1016/S0300-2896\(12\)70044-3](https://doi.org/10.1016/S0300-2896(12)70044-3).
- Serrano-Mollar Anna. 2018. "Cell Therapy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis†." *Medical Sciences* 6 (3): 64. <https://doi.org/10.3390/medsci6030064>.
- Serrano-Mollar, Anna, Gemma Gay-Jordi, Raquel Guillamat-Prats, Daniel Closa, Fernanda Hernandez-Gonzalez, Pedro Marin, Felip Burgos, *et al.* 2016. "Safety and Tolerability of Alveolar Type II Cell Transplantation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Chest* 150 (3): 533–43. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.03.021>.
- Sime, Patricia J., Zhou Xing, Frank L. Graham, Karl G. Csaky, and Jack Gauldie. 1997. "Adenovector-Mediated Gene Transfer of Active Transforming Growth Factor- B1 Induces Prolonged Severe Fibrosis in Rat Lung." *Journal of Clinical Investigation* 100 (4): 768–76. <https://doi.org/10.1172/JCI119590>.
- Smirnova, N. F., A. C. Schamberger, S. Nayakanti, R. Hatz, J. Behr, and O. Eickelberg. 2016. "Detection and Quantification of Epithelial Progenitor Cell Populations in Human Healthy and IPF Lungs." *Respiratory Research* 17 (1). <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0404-x>.
- Song, Mengmeng, Ye Li, Mingyong Miao, Fan Zhang, Hao Yuan, Fuao Cao, Wenjun Chang, Hanping Shi, and Chunhua Song. 2020. "High Stromal Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT) Indicates Poor Prognosis in Colorectal Cancer." *Cancer Medicine* 9 (6): 2030–38. <https://doi.org/10.1002/cam4.2890>.
- Spagnolo, Paolo, Elisabetta Balestro, Stefano Aliberti, Elisabetta Coconcelli, Davide Biondini, Giovanni Della Casa, Nicola Sverzellati, and Toby M. Maher. 2020. "Pulmonary Fibrosis Secondary to COVID-19: A Call to Arms?" *The Lancet Respiratory Medicine*. Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30222-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30222-8).
- Spagnolo, Paolo, and Toby M. Maher. 2017. "Clinical Trial Research in Focus: Why

- Do so Many Clinical Trials Fail in IPF?" *The Lancet Respiratory Medicine*. Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30122-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30122-4).
- Štefatić, Daria, Monika Riederer, Marija Balić, Nadia Dandachi, Stefanie Stanzer, Birgit Janesch, Margit Resel, Darko Ler, Hellmut Samonigg, and Thomas Bauernhofer. 2008. "Optimization of Diagnostic Elisa - Based Tests for the Detection of Auto-Antibodies against Tumor Antigens in Human Serum." *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 8 (3): 245–50. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2008.2926>.
- Sternak, Magdalena, Tamara I. Khomich, Andrzej Jakubowski, Małgorzata Szafarz, Wojciech Szczepański, Magdalena Białas, Marta Stojak, Joanna Szymura-Oleksiak, and Stefan Chłopiczki. 2010. "Nicotinamide N-Methyltransferase (Nnmt) and 1-Methylnicotinamide (Mna) in Experimental Hepatitis Induced by Concanavalin a in the Mouse." *Pharmacological Reports* 62 (3): 483–93. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(10\)70304-2](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70304-2).
- Stone, Rivka C., Irena Pastar, Nkemcho Ojeh, Vivien Chen, Sophia Liu, Karen I. Garzon, and Marjana Tomic-Canic. 2016. "Epithelial-Mesenchymal Transition in Tissue Repair and Fibrosis." *Cell and Tissue Research*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2464-0>.
- Stuart, Bridget D., Jungmin Choi, Samir Zaidi, Chao Xing, Brody Holohan, Rui Chen, Mihwa Choi, *et al.* 2015. "Exome Sequencing Links Mutations in PARN and RTEL1 with Familial Pulmonary Fibrosis and Telomere Shortening." *Nature Genetics* 47 (5): 512–17. <https://doi.org/10.1038/ng.3278>.
- Su, Jie, Sophie M. Morgani, Charles J. David, Qiong Wang, Ekrem Emrah Er, Yun Han Huang, Harihar Basnet, *et al.* 2020. "TGF- β Orchestrates Fibrogenic and Developmental EMTs via the RAS Effector RREB1." *Nature* 577 (7791): 566–71. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1897-5>.
- Suganuma, H., A. Sato, R. Tamura, and K. Chida. 1995. "Enhanced Migration of Fibroblasts Derived from Lungs with Fibrotic Lesions." *Thorax* 50 (9): 984–89. <https://doi.org/10.1136/thx.50.9.984>.
- Takahashi, Akiko, Naoko Ohtani, Kimi Yamakoshi, Shin Ichi Iida, Hidetoshi Tahara, Keiko Nakayama, Keiichi I. Nakayama, Toshinori Ide, Hideyuki Saya, and Eiji Hara. 2006. "Mitogenic Signalling and the P16INK4a-Rb Pathway Cooperate to Enforce Irreversible Cellular Senescence." *Nature Cell Biology* 8 (11): 1291–97. <https://doi.org/10.1038/ncb1491>.
- Tang, Sai Wen, Tsung Cheng Yang, Wei Chou Lin, Wen Hsin Chang, Chung Chieh Wang, Ming Kuen Lai, and Jung Yaw Lin. 2011. "Nicotinamide N-Methyltransferase Induces Cellular Invasion through Activating Matrix Metalloproteinase-2 Expression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Cells." *Carcinogenesis* 32 (2): 138–45. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq225>.
- Taskar, Varsha S., and David B. Coultas. 2006. "Is Idiopathic Pulmonary Fibrosis an Environmental Disease?" *Proceedings of the American Thoracic Society*. <https://doi.org/10.1513/pats.200512-131TK>.
- Tcherakian, Colas, Vincent Cottin, Pierre Yves Brillet, Olivia Freynet, Nicolas Naggara, Zohra Carton, Jean François Cordier, Michel Brauner, Dominique

- Valeyre, and Hilario Nunes. 2011. "Progression of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Lessons from Asymmetrical Disease." *Thorax* 66 (3): 226–31. <https://doi.org/10.1136/thx.2010.137190>.
- Tchkonia, Tamara, Yi Zhu, Jan Van Deursen, Judith Campisi, and James L. Kirkland. 2013. "Cellular Senescence and the Senescent Secretory Phenotype: Therapeutic Opportunities." *Journal of Clinical Investigation*. J Clin Invest. <https://doi.org/10.1172/JCI64098>.
- Thampatty, Bhavani P., and James H.C. Wang. 2007. "A New Approach to Study Fibroblast Migration." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 64 (1): 1–5. <https://doi.org/10.1002/cm.20166>.
- Thannickal, Victor J., Daniel Y. Lee, Eric S. White, Zongbin Cui, Jose M. Larios, Raquel Chacon, Jeffrey C. Horowitz, Regina M. Day, and Peedikayil E. Thomas. 2003. "Myofibroblast Differentiation by Transforming Growth Factor-B1 Is Dependent on Cell Adhesion and Integrin Signaling via Focal Adhesion Kinase." *Journal of Biological Chemistry* 278 (14): 12384–89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208544200>.
- Thompson, Michael A., Eunpyo Moon, Ung Jin Kim, Jingping Xu, Michael J. Siciliano, and Richard M. Weinshilboum. 1999. "Human Indoethylamine N-Methyltransferase: cDNA Cloning and Expression, Gene Cloning, and Chromosomal Localization." *Genomics* 61 (3): 285–97. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5960>.
- Tian, Sufang, Yong Xiong, Huan Liu, Li Niu, Jianchun Guo, Meiyuan Liao, and Shu Yuan Xiao. 2020. "Pathological Study of the 2019 Novel Coronavirus Disease (COVID-19) through Postmortem Core Biopsies." *Modern Pathology* 33 (6): 1007–14. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0536-x>.
- Tomasek, James J., Giulio Gabbiani, Boris Hinz, Christine Chaponnier, and Robert A. Brown. 2002. "Myofibroblasts and Mechano: Regulation of Connective Tissue Remodelling." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nat Rev Mol Cell Biol. <https://doi.org/10.1038/nrm809>.
- Tomida, Mikio, Hideki Ohtake, Takashi Yokota, Yasuhito Kobayashi, and Masafumi Kurosumi. 2008. "Stat3 Up-Regulates Expression of Nicotinamide N-Methyltransferase in Human Cancer Cells." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 134 (5): 551–59. <https://doi.org/10.1007/s00432-007-0318-6>.
- Torres-González, Edilson, Marta Bueno, Atsuko Tanaka, Laurie T. Krug, Dong Sheng Cheng, Vasiliy V. Polosukhin, Dan Sorescu, *et al.* 2012. "Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Age-Related Susceptibility to Lung Fibrosis." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 46 (6): 748–56. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0224OC>.
- Travis, William D., Talmadge E. King, Eric D. Bateman, David A. Lynch, Frédérique Capron, David Center, Thomas V. Colby, *et al.* 2002. "American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias." In *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165:277–304.

- American Lung Association. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.2.ats01>.
- Tsakiri, Kalliopi D., Jennifer T. Cronkhite, Phillip J. Kuan, Chao Xing, Ganesh Raghu, Jonathan C. Weissler, Randall L. Rosenblatt, Jerry W. Shay, and Christine Kim Garcia. 2007. "Adult-Onset Pulmonary Fibrosis Caused by Mutations in Telomerase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (18): 7552–57. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701009104>.
- Uhal, Bruce D., Iravati Joshi, W. Frank Hughes, Carlos Ramos, Annie Pardo, and Moises Selman. 1998. "Alveolar Epithelial Cell Death Adjacent to Underlying Myofibroblasts in Advanced Fibrotic Human Lung." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 275 (6 19-6). <https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.275.6.11192>.
- Uhal, Bruce, Jong Kyong Kim, Xiaopeng Li, and Maria Molina-Molina. 2007. "Angiotensin-TGF- β 1 Crosstalk in Human Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Autocrine Mechanisms in Myofibroblasts and Macrophages." *Current Pharmaceutical Design* 13 (12): 1247–56. <https://doi.org/10.2174/138161207780618885>.
- Ulanovskaya, Olesya A., Andrea M. Zuhl, and Benjamin F. Cravatt. 2013. "NNMT Promotes Epigenetic Remodeling in Cancer by Creating a Metabolic Methylation Sink." *Nature Chemical Biology* 9 (5): 300–306. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1204>.
- Upagupta, Chandak, Chiko Shimbori, Rahmah Alsilmi, and Martin Kolb. 2018. "Matrix Abnormalities in Pulmonary Fibrosis." *European Respiratory Review* 27 (148). <https://doi.org/10.1183/16000617.0033-2018>.
- Vainshelboim, Baruch, Benjamin Daniel Fox, Jose Oliveira, and Mordechai Reuven Kramer. 2016. "Exercise Training in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Expert Review of Respiratory Medicine*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1586/17476348.2016.1121104>.
- Varga, John, and David Abraham. 2007. "Systemic Sclerosis: A Prototypic Multisystem Fibrotic Disorder." *Journal of Clinical Investigation*. J Clin Invest. <https://doi.org/10.1172/JCI31139>.
- Villas-Bôas, Silas G., Sandrine Mas, Mats Åkesson, Jørn Smedsgaard, and Jens Nielsen. 2005. "Mass Spectrometry in Metabolome Analysis." *Mass Spectrometry Reviews*. Mass Spectrom Rev. <https://doi.org/10.1002/mas.20032>.
- Vincent, Theresa, Etienne P.A. Neve, Jill R. Johnson, Alexander Kukalev, Federico Rojo, Joan Albanell, Kristian Pietras, *et al.* 2009. "A SNAIL1-SMAD3/4 Transcriptional Repressor Complex Promotes TGF- β Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition." *Nature Cell Biology* 11 (8): 943–50. <https://doi.org/10.1038/ncb1905>.
- Visscher, Daniel W., and Jeffrey L. Myers. 2006. "Histologic Spectrum of Idiopathic Interstitial Pneumonias." *Proceedings of the American Thoracic Society* 3 (4): 322–29. <https://doi.org/10.1513/pats.200602-019TK>.
- Vu, Tuong N., Xuesong Chen, Hussein D. Foda, Gerald C. Smaldone, and Nadia A.

- Hasaneen. 2019. "Interferon- γ Enhances the Antifibrotic Effects of Pirfenidone by Attenuating IPF Lung Fibroblast Activation and Differentiation." *Respiratory Research* 20 (1). <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1171-2>.
- Waghray, Meghna, Zongbin Cui, Jeffrey C. Horowitz, Indhu M. Subramanian, Fernando J. Martinez, Galen B. Toews, and Victor J. Thannickal. 2005. "Hydrogen Peroxide Is a Diffusible Paracrine Signal for the Induction of Epithelial Cell Death by Activated Myofibroblasts." *The FASEB Journal* 19 (7): 1–16. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2882fje>.
- Walsh, Simon L.F., Athol U. Wells, Sujal R. Desai, Venerino Poletti, Sara Piciucchi, Alessandra Dubini, Hilario Nunes, *et al.* 2016. "Multicentre Evaluation of Multidisciplinary Team Meeting Agreement on Diagnosis in Diffuse Parenchymal Lung Disease: A Case-Cohort Study." *The Lancet Respiratory Medicine* 4 (7): 557–65. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)30033-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)30033-9).
- Wang, Rongi, Carlos Ramos, Iravati Joshi, Alex Zagariya, Annie Pardo, Moises Selman, and Bruce D. Uhal. 1999. "Human Lung Myofibroblast-Derived Inducers of Alveolar Epithelial Apoptosis Identified as Angiotensin Peptides." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 277 (6 21-6). <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.277.6.11158>.
- Westergren-Thorsson, Gunilla, Johan Hernnäs, Bengt Särnstrand, Åke Oldberg, Dick Heinegård, and Anders Malmström. 1993. "Altered Expression of Small Proteoglycans, Collagen, and Transforming Growth Factor-B1 in Developing Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats." *Journal of Clinical Investigation* 92 (2): 632–37. <https://doi.org/10.1172/JCI116631>.
- Wettlaufer, Scott H., Jacob P. Scott, Richard C. McEachin, Marc Peters-Golden, and Steven K. Huang. 2016. "Reversal of the Transcriptome by Prostaglandin E2 during Myofibroblast Dedifferentiation." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 54 (1): 114–27. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0468OC>.
- White, Eric S., Victor J. Thannickal, Shannon L. Carskadon, Emily G. Dickie, Donna L. Livant, Sonja Markwart, Galen B. Toews, and Douglas A. Arenberg. 2003. "Integrin A4 β 1 Regulates Migration across Basement Membranes by Lung Fibroblasts: A Role for Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168 (4): 436–42. <https://doi.org/10.1164/rccm.200301-041OC>.
- Willis, Brigham C., and Zea Borok. 2007. "TGF- β -Induced EMT: Mechanisms and Implications for Fibrotic Lung Disease." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00163.2007>.
- Willis, Brigham C., Janice M. Liebler, Katherine Luby-Phelps, Andrew G. Nicholson, Edward D. Crandall, Roland M. Du Bois, and Zea Borok. 2005. "Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor-B1: Potential Role in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *American Journal of Pathology* 166 (5): 1321–32. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62351-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62351-6).

- Wolters, Paul J., Harold R. Collard, and Kirk D. Jones. 2014. "Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 9 (1): 157–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104706>.
- Wu, Y., M. S. Siadaty, M. E. Berens, G. M. Hampton, and D. Theodorescu. 2008. "Overlapping Gene Expression Profiles of Cell Migration and Tumor Invasion in Human Bladder Cancer Identify Metallothionein 1E and Nicotinamide N-Methyltransferase as Novel Regulators of Cell Migration." *Oncogene* 27 (52): 6679–89. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.264>.
- Wynn, T. A. 2008. "Cellular and Molecular Mechanisms of Fibrosis." *Journal of Pathology*. J Pathol. <https://doi.org/10.1002/path.2277>.
- Wynn, Thomas A., and Thirumalai R. Ramalingam. 2012. "Mechanisms of Fibrosis: Therapeutic Translation for Fibrotic Disease." *Nature Medicine*. Nat Med. <https://doi.org/10.1038/nm.2807>.
- Xaubet, Antoni, Julio Ancochea, Elena Bollo, Estrella Fernández-Fabrellas, Tomás Franquet, María Molina-Molina, María Angeles Montero, and Anna Serrano-Mollar. 2013. "Normativa Sobre El Diagnóstico y Tratamiento de La Fibrosis Pulmonar Idiopática." *Archivos de Bronconeumología* 49 (8): 343–53. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2013.03.011>.
- Xaubet, Antoni, Julio Ancochea, and María Molina-Molina. 2017. "Fibrosis Pulmonar Idiopática." *Medicina Clínica*. Ediciones Doyma, S.L. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.11.004>.
- Xaubet, Antoni, Alejandra Marin-Arguedas, Sergio Lario, Julio Ancochea, Ferran Morell, Juan Ruiz-Manzano, Eulogio Rodriguez-Becerra, *et al.* 2003. "Transforming Growth Factor-B1 Gene Polymorphisms Are Associated with Disease Progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168 (4): 431–35. <https://doi.org/10.1164/rccm.200210-1165OC>.
- Xaubet, Antoni, Jordi Roca-Ferrer, Laura Pujols, Josep Ramírez, Joaquim Mullol, Alejandra Marin-Arguedas, Alfons Torrego, Josep Maria Gimferrer, and Cesar Picado. 2004. "Cyclooxygenase-2 Is up-Regulated in Lung Parenchyma of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and down-Regulated in Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases* 21 (1): 35–42. <https://europepmc.org/article/med/15127973>.
- Xie, Na, Zheng Tan, Sami Banerjee, Huachun Cui, Jing Ge, Rui Ming Liu, Karen Bernard, Victor J. Thannickal, and Gang Liu. 2015. "Glycolytic Reprogramming in Myofibroblast Differentiation and Lung Fibrosis." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 192 (12): 1462–74. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0780OC>.
- Xie, Xinyou, Haitao Yu, Yanzhong Wang, Yanwen Zhou, Guiling Li, Zhi Ruan, Fengying Li, Xiuhong Wang, Huixing Liu, and Jun Zhang. 2014. "Nicotinamide N-Methyltransferase Enhances the Capacity of Tumorigenesis Associated with the Promotion of Cell Cycle Progression in Human Colorectal Cancer Cells." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 564 (December): 52–66.

- <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.08.017>.
- Xu, Jian, Samy Lamouille, and Rik Derynck. 2009. "TGF-B-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition." *Cell Research*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>.
- Xu, Jimin, Marco Capezzone, Xiao Xu, and Jerome M. Hershman. 2005. "Activation of Nicotinamide N-Methyltransferase Gene Promoter by Hepatocyte Nuclear Factor-1 β in Human Papillary Thyroid Cancer Cells." *Molecular Endocrinology* 19 (2): 527–39. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0215>.
- Xu, Jimin, and Jerome M. Hershman. 2006. "Histone Deacetylase Inhibitor Depsipeptide Represses Nicotinamide N-Methyltransferase and Hepatocyte Nuclear Factor-1 β Gene Expression in Human Papillary Thyroid Cancer Cells." *Thyroid* 16 (2): 151–60. <https://doi.org/10.1089/thy.2006.16.151>.
- Xu, Jimin, Farhad Moatamed, Jeremy S. Caldwell, John R. Walker, Zaki Kraiem, Katsumi Taki, Gregory A. Brent, and Jerome M. Hershman. 2003. "Enhanced Expression of Nicotinamide N-Methyltransferase in Human Papillary Thyroid Carcinoma Cells." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88 (10): 4990–96. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021843>.
- Xu, Ming, Tamara Tchkonja, Husheng Ding, Mikolaj Odrodnik, Ellen R. Lubbers, Tamar Pirtskhalava, Thomas A. White, *et al.* 2015. "JAK Inhibition Alleviates the Cellular Senescence-Associated Secretory Phenotype and Frailty in Old Age." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (46): E6301–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515386112>.
- Xu, Ying Dong, Jiesong Hua, Alice Mui, Robert O'Connor, Gary Grotendorst, and Nasreen Khalil. 2003. "Release of Biologically Active TGF-B1 by Alveolar Epithelial Cells Results in Pulmonary Fibrosis." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00298.2002>.
- Xu, Yong, Ping Liu, Dong Hui Zheng, Nan Wu, Lun Zhu, Changying Xing, and Jin Zhu. 2016. "Expression Profile and Prognostic Value of NNMT in Patients with Pancreatic Cancer." *Oncotarget* 7 (15): 19975–81. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7891>.
- Yanai, Hagai, Albert Shteinberg, Ziv Porat, Arie Budovsky, Alex Braiman, Rolf Zeische, and Vadim E. Fraifeld. 2015. "Cellular Senescence-like Features of Lung Fibroblasts Derived from Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients." *Aging* 7 (9): 664–72. <https://doi.org/10.18632/aging.100807>.
- Yang, Xiaofang, Bryan Pursell, Shaolei Lu, Tsun Kai Chang, and Arthur M. Mercurio. 2009. "Regulation of B4-Integrin Expression by Epigenetic Modifications in the Mammary Gland and during the Epithelial-to-Mesenchymal Transition." *Journal of Cell Science* 122 (14): 2473–80. <https://doi.org/10.1242/jcs.049148>.
- Yang, Yue, and Anthony A. Sauve. 2016. "NAD⁺ Metabolism: Bioenergetics, Signaling and Manipulation for Therapy." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.014>.

- Yao, Masahiro, Hisahiro Tabuchi, Yoji Nagashima, Masaya Baba, Noboru Nakaigawa, Hitoshi Ishiguro, Kenji Hamada, *et al.* 2005. "Gene Expression Analysis of Renal Carcinoma: Adipose Differentiation-Related Protein as a Potential Diagnostic and Prognostic Biomarker for Clear-Cell Renal Carcinoma." *Journal of Pathology* 205 (3): 377–87. <https://doi.org/10.1002/path.1693>.
- Zhang, H Y, M Gharaee-Kermani, and S H Phan. 1997. "Regulation of Lung Fibroblast Alpha-Smooth Muscle Actin Expression, Contractile Phenotype, and Apoptosis by IL-1beta." *The Journal of Immunology* 158 (3).
- Zhang, Hong Yu, Mehrnaz Gharaee-Kermani, Kai Zhang, Soverin Karmiol, and Sem H. Phan. 1996. "Lung Fibroblast α -Smooth Muscle Actin Expression and Contractile Phenotype in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis." *American Journal of Pathology* 148 (2): 527–37. [/pmc/articles/PMC1861697/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1861697/).
- Zhang, Jun, Yanzhong Wang, Guiling Li, Haitao Yu, and Xinyou Xie. 2014. "Down-Regulation of Nicotinamide N-Methyltransferase Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells via the Mitochondria-Mediated Pathway." *PLoS ONE* 9 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089202>.
- Zhang, Kai, Mark D. Rekhter, David Gordon, and Sem H. Phan. 1994. "Myofibroblasts and Their Role in Lung Collagen Gene Expression during Pulmonary Fibrosis: A Combined Immunohistochemical and in Situ Hybridization Study." *American Journal of Pathology* 145 (1): 114–25. [/pmc/articles/PMC1887314/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1887314/).
- Zhang, Li, Mengmeng Song, Fan Zhang, Hao Yuan, Wenjun Chang, Guanyu Yu, and Yongdong Niu. 2020. "Accumulation of Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT) in Cancer-Associated Fibroblasts: A Potential Prognostic and Predictive Biomarker for Gastric Carcinoma." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. <https://doi.org/10.1369/0022155420976590>.
- Zhang, Lijuan, Xiaowen Chi, Wen Luo, Shihuan Yu, Jiawen Zhang, Yuening Guo, Qiu Ren, and Wei Zhang. 2020. "Lung Myofibroblast Transition and Fibrosis Is Regulated by Circ0044226." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 118 (January). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.105660>.
- Zhang, Shaoli, Helena Smartt, Stephen T. Holgate, and William R. Roche. 1999. "Growth Factors Secreted by Bronchial Epithelial Cells Control Myofibroblast Proliferation: An in Vitro Co-Culture Model of Airway Remodeling in Asthma." *Laboratory Investigation* 79 (4): 395–405. <https://europepmc.org/article/med/10211992>.
- Zhang, Y., T. Lee, B. Guillemin, M. C. Yu, and W. Rom. 1993. "Enhanced IL-1 Beta and Tumor Necrosis Factor-Alpha Release and Messenger RNA Expression in Macrophages from Idiopathic Pulmonary Fibrosis or after Asbestos Exposure." *Undefined*.
- Zhou, Guofei, Laura A. Dada, Minghua Wu, Aileen Kelly, Humberto Trejo, Qiyan Zhou, John Varga, and Jacob I. Sznajder. 2009. "Hypoxia-Induced Alveolar

- Epithelial-Mesenchymal Transition Requires Mitochondrial ROS and Hypoxia-Inducible Factor 1." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 (6). <https://doi.org/10.1152/ajplung.00007.2009>.
- Zolak, Jason S., Rajesh Jagirdar, Ranu Surolia, Suman Karki, Octavio Oliva, Thomas Hock, Purushotham Guroji, *et al.* 2013. "Pleural Mesothelial Cell Differentiation and Invasion in Fibrogenic Lung Injury." *American Journal of Pathology* 182 (4): 1239–47. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.12.030>.

