



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**EVALUACIÓN DE AUTOFAGIA Y DEL SISTEMA UBIQUITINA-
PROTEOSOMA EN FIBROBLASTOS NORMALES Y DERIVADOS
DE PACIENTES CON FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA
YAIR ROMERO LÓPEZ**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ANNIE PARDO CEMO
FACULTAD DE CIENCIAS**

**COMITÉ TUTOR
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS**

MÉXICO, CDMX

Noviembre, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Al CONACYT que con el número de becario: 365439 y la UNAM me brindaron el apoyo y la oportunidad.

A Annie Pardo y a Moisés Selman por su invaluable contribución que sé de buena tinta que adeudo.

A todos y cada uno de los miembros de los laboratorios (Ciencias-INER) que dejaré sin nombre por injusto que sea pero que tienen la culpa de evitarme muchos fracasos de alto impacto que me merecía.

A los revisores: por su labor en la revisión molecular de la presente tesis y los absuelvo de cualquier error cometido en la misma.

A todos mis amigos

A mis padres y a mi hermano.

ÍNDICE

Índice de ilustraciones.....	5
Índice de figuras	6
Índice de tablas.....	7
Abreviaturas.....	8
Resumen.....	10
Abstract	11
Antecedentes generales	12
Enfermedades pulmonares intersticiales difusas	12
Fibrosis pulmonar idiopática	13
Hipótesis sobre la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática	14
Papel de los fibroblastos en la génesis y la progresión de la fibrosis pulmonar idiopática.....	17
El envejecimiento es el principal factor de susceptibilidad para la fibrosis pulmonar idiopática	19
Mecanismos moleculares asociados al envejecimiento que pueden participar en la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática.....	20
Autofagia.....	21
Tipos de autofagia	21
Inducción y nucleación.....	22
Expansión del fagóforo	23
Selección del cargo del autofagosoma	24
Fusión con el lisosoma y la degradación del cargo	24
Antecedentes específicos	26
Justificación.....	27
Hipótesis.....	28

Objetivo general	29
Objetivos específicos.....	29
Material y métodos	30
Obtención y cultivo de fibroblastos de pulmón humano	30
Obtención y cultivo de fibroblastos de pulmón ratón	30
Reactivos	30
Western blot	30
Obtención de RNA y análisis global de genes de autofagia	31
Evaluación en tiempo-real de la formación de autofagosomas por microscopía de fluorescencia.....	31
Tinción de TUNEL.....	32
Determinación de la actividad de caspasas 3/7	32
Análisis estadístico	32
Resultados	33
Rango de edades en las muestras normales permite evaluar el efecto del envejecimiento en fibroblastos de pulmón derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.....	33
El envejecimiento disminuye el flujo de autofagia en fibroblastos de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.....	34
El envejecimiento previene la respuesta de autofagia inducida por ayuno en fibroblastos pulmonares derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática mediado por la vía de mTOR.....	41
Fibroblastos pulmonares derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática exhiben una activación persistente de la vía de mTOR que les confiere una resistencia a la apoptosis inducida por ayuno	45
Inhibidores de la vía de mTOR modifican la respuesta de autofagia en fibroblastos viejos y de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática	50

Inhibidores de la vía de mTOR modifican la respuesta de apoptosis en fibroblastos de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.....	51
Discusión.....	56
Bibliografía.....	60
Anexos.....	66
Publicación derivada de la tesis.....	66
Publicaciones adicionales generadas durante los estudios de doctorado.....	66

Índice de ilustraciones

Ilustración 1. Clasificación de las neumonías intersticiales difusas	12
Ilustración 2. Características histopatológicas de FPI.....	13
Ilustración 3. Esquema hipotético de los principales eventos en la fisiopatología de la FPI.....	15
Ilustración 4. Gráficas que agrupan diferentes estudios para incidencia (izquierda) y prevalencia (derecha) de la FPI.....	19
Ilustración 5. Esquema de los cambios asociados con el envejecimiento que pueden participar en el desarrollo de la FPI.....	20
Ilustración 6. Tipos de Autofagia.....	21
Ilustración 7. Flujo de autofagia	25

Índice de figuras

Figura 1. Niveles heterogéneos en los marcadores de autofagia en condiciones basales.....	36
Figura 2. El envejecimiento disminuye el flujo de autofagia en fibroblastos derivados de FPI.....	37
Figura 3. Menor formación de autofagosomas en fibroblastos de FPI es causado parcialmente por el envejecimiento	38
Figura 4. p62 muestra menor colocalización en fibroblastos de FPI.....	39
Figura 5. El envejecimiento disminuye el flujo de autofagia en fibroblastos pulmonares de ratón.....	40
Figura 6. Estandarización del flujo de autofagia inducido por ayuno en fibroblastos de pulmón.....	42
Figura 7. El envejecimiento impide el flujo de autofagia inducido por ayuno en fibroblastos derivados de FPI.....	43
Figura 8. El envejecimiento previene la inducción de autofagia por la actividad de la vía de mTORC1 en fibroblastos derivados de FPI	44
Figura 9. Fibroblastos derivados de pacientes con FPI exhiben una activación persistente de la vía de mTOR en condiciones de ayuno	46
Figura 10. Fibroblastos normales pareados por edad y de FPI después de 24 horas de ayuno	47
Figura 11. Genes relacionados con autofagia diferencialmente expresados en fibroblastos de FPI	48
Figura 12. Resistencia a la apoptosis inducida por ayuno en fibroblastos derivados de pacientes con FPI.....	49
Figura 13. Rapamicina y/o PP242 reducen la actividad de la vía de mTOR en fibroblastos derivados de FPI.....	52
Figura 14. Efecto de Rapamicina y/o PP242 en la actividad de autofagia de los tres grupos de fibroblastos pulmonares (jóvenes, viejos y FPI)	53

Figura 15. Efecto de Rapamicina y PP242 en la actividad de mTOR de fibroblastos pulmonares de jóvenes y de FPI 54

Figura 16. Rapamicina y/o PP242 rescata la respuesta de apoptosis inducida por ayuno en fibroblastos derivados de FPI..... 55

Índice de tablas

Tabla 1. Fibroblastos pulmonares humanos 33

Tabla 2. Cambios en la expresión de genes involucrados en autofagia en el envejecimiento..... 40

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
AKT	gen que codifica para la proteína quinasa B
AMPK	proteín quinasa activada por AMP
ARN	ácido ribonucleico
ATG	proteína relacionada con autofagia
CDNK1B	inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina B1
CQ	cloroquina
CTGF	factor de crecimiento del tejido conectivo
CTNNA3	catenina alpha 3
CXCL12	factor derivado de células del estroma (quimiocina 12)
CXCR4	fusina (receptor de quimiocina 4)
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DPP9	dipeptidil peptidasa 9
DSP	desmoplaquina
EPID	enfermedades pulmonares intersticiales difusas
ET1	endotelina 1
FOXO	factores de transcripción de la familia "Forkhead"
FPI	fibrosis pulmonar idiopática
GFP	proteína verde fluorescente
H&E	tinción hematoxilina-eosina
IGF	factor de crecimiento insulínico
IGFBP	proteína de unión al factor de crecimiento insulínico
LAMP	proteína asociada a la membrana del lisosoma
LC3	cadena ligera 3 de la proteína asociada al microtúbulo
ME	matriz extracelular
mTOR	diana de Rapamicina en células de mamífero
MUC5B	mucina 5b

NBR1	vecino del gen BRCA1 (Neighbor of BRCA1)
PCR	reacción en cadena de la polimesara
PI3K	fosfoinositol 3-quinasa
PINK1	quinasa putativa inducida por PTEN
PTEN	fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PVDF	polifluoruro de vinilideno
RFP	proteína roja fluorescente
SNARE	superfamilia de proteínas involucradas en la fusión vesicular
TAC	tomografía axial computarizada
TEM	microscopia electrónica de transmisión
TERC	componente de ARN de la telomerasa
TERT	telomerasa transcriptasa inversa
TGF β	factor de crecimiento transformante beta
TSC2	tuberina
ULK	quinasa asociada a la activación de autofagia (Unc-51 like)
VAMP8	proteína asociada a la membrana vesicular 8
VTI1B	proteína involucrada en transporte vesicular con T-SNAREs 1B

Resumen

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica, progresiva y letal asociada con el envejecimiento. Sin embargo, los mecanismos moleculares del proceso de envejecimiento que contribuyen a la patogénesis de la FPI no han sido dilucidados. La FPI se caracteriza por abundantes focos de fibroblastos/miofibroblastos activos resistentes a la apoptosis. Es importante considerar que no se ha evaluado en la FPI el papel del envejecimiento en la actividad de autofagia de fibroblastos pulmonares y su relación con la apoptosis, como proceso adaptativo. En el presente estudio, analizamos la dinámica de la autofagia en líneas primarias de fibroblastos pulmonares de pacientes con FPI, controles jóvenes y controles pareados por edad. Nuestros resultados muestran que el envejecimiento contribuye a una menor inducción de autofagia en condiciones basales y en ayuno, la cual está mediada por la activación de la vía de mTOR. El tratamiento con Rapamicina y PP242, cuyo objetivo es la inhibición de la vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR, modifica la autofagia y la apoptosis en fibroblastos de FPI inducida por ayuno. Es de destacar que encontramos una activación persistente de esta vía en condiciones de ayuno que promueve la resistencia a apoptosis en fibroblastos de FPI. Estos resultados indican que el envejecimiento afecta las respuestas adaptativas al estrés disminuyendo la actividad de autofagia a través de la activación de mTORC1 en fibroblastos de pulmón. La activación de esta vía también promueve la resistencia a la muerte celular en fibroblastos derivados de pacientes con FPI.

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive and usually lethal disease associated with aging. However, the molecular mechanisms of the aging process that contribute to the pathogenesis of IPF have not been elucidated. IPF is characterized by abundant foci of highly active fibroblasts and myofibroblasts resistant to apoptosis. Remarkably, the role of aging in the autophagy activity of lung fibroblasts and its relationship with apoptosis, as adaptive responses, has not been evaluated previously in the context of IPF. In the present study, we analyzed the dynamics of autophagy in primary lung fibroblasts from IPF compared to young and age-matched normal lung fibroblasts. Our results showed that aging contributes for a lower induction of autophagy on basal conditions and under starvation which is mediated by mTOR pathway activation. Treatment with rapamycin and PP242, that target of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway inhibition, modified starvation-induced autophagy and apoptosis in IPF fibroblasts. Interestingly, we found a persistent activation of this pathway under starvation that contributes to apoptosis resistance in IPF fibroblasts. These findings indicate that aging affects adaptive responses to stress decreasing autophagy through activation of mTORC1 in lung fibroblasts. The activation of this pathway also contributes to the resistance to cell death in IPF lung fibroblasts.

Antecedentes generales

Enfermedades pulmonares intersticiales difusas

La fibrosis pulmonar es la etapa terminal de las enfermedades conocidas como enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) (1,2). Las EPID son un grupo heterogéneo de enfermedades que se agrupan porque todas ellas comprometen difusamente el parénquima pulmonar, lo cual afecta fundamentalmente al intersticio y los espacios alveolares, aunque muchas de ellas también producen lesión de las vías aéreas periféricas con variaciones en el patrón de inflamación y fibrosis. Es complicado clasificarlas debido al gran número de padecimientos implicados; sin embargo, una visión útil para su clasificación es el separar inicialmente a las EPID en dos grupos: aquellas con causa conocida y las de causa desconocida (idiopáticas). Además, es necesario incluir el patrón histopatológico para determinar otras formas que varían lo suficiente en el grado de fibrosis e inflamación por lo que son consideradas entidades diferentes. En esta última categoría se hallan las neumonías intersticiales con patrones característicos, como la linfangioleiomatosis, la histiocitosis de las células de Langerhans o las enfermedades granulomatosas –como la sarcoidosis–. El desarrollo de la fibrosis pulmonar provoca la destrucción de las unidades alveolo-capilares y, en consecuencia, insuficiencia respiratoria progresiva. El prototipo más agresivo de estas enfermedades es la fibrosis pulmonar idiopática.



Ilustración 1. Clasificación de las neumonías intersticiales difusas

Fibrosis pulmonar idiopática

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad progresiva, irreversible y letal de origen desconocido que se presenta en individuos viejos, con una edad promedio de 66 años en el momento del diagnóstico, cuya frecuencia es la más alta dentro de las neumopatías intersticiales idiopáticas. La incidencia y la prevalencia que se estiman para la FPI son de 4.6-16.3 y de 13 a 20 casos por 100,000 personas respectivamente. Se presenta más en hombres que en mujeres (1:5 a 1:7) y su frecuencia incrementa con la edad.

Actualmente, no tiene un tratamiento efectivo y aproximadamente la mitad de los pacientes mueren de la enfermedad entre 2 a 3 años después de que aparecen los primeros síntomas. Este padecimiento de mal pronóstico está definido como una forma específica de neumonía intersticialfibrosante y crónica, con un patrón histopatológico de una neumonía intersticial usual, identificada por medio de biopsia como se muestra en la **ilustración 2 (3)**.

El diagnóstico, además de la biopsia señalada, cuenta con frecuencia de la TAC de tórax que muestra un patrón característico de opacidades reticulares subpleurales, bronquiectasias por tracción y patrón en panal de abeja (3,4). Su manifestación clínica más frecuente es la disnea, la cual se agrava conforme avanza

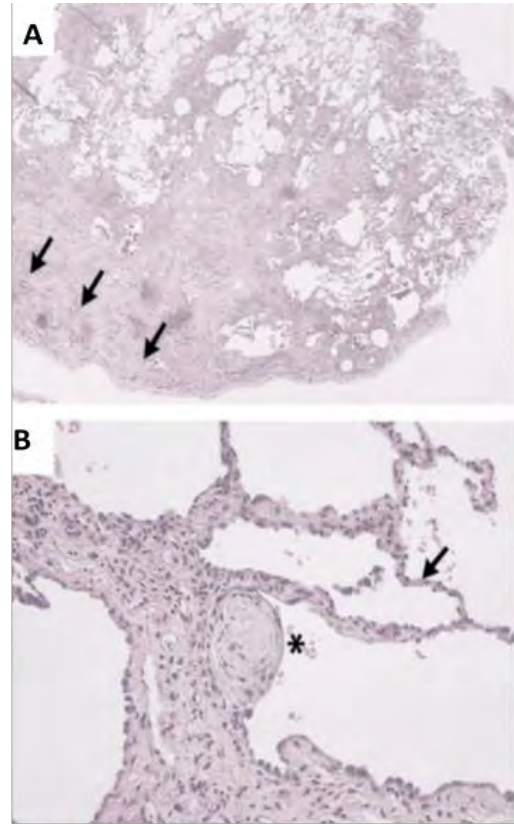


Ilustración 2. Características histopatológicas de FPI

A Tinción de H&E en biopsia de pulmón (15x). Las flechas muestran una densa fibrosis pleural con el colapso de los espacios alveolares. B (40x). Se observa lo heterogéneo de la FPI con un foco de fibroblastos (asterisco) adyacente a espacios alveolares (flecha). No se observa una inflamación excesiva ni necrosis. Imagen modificada del artículo de Gross, T.J. y G.W. Hunninghake, NEJM, 2001.

la enfermedad, acompañada por tos seca. Por la velocidad en la progresión de la enfermedad, los pacientes con FPI se pueden clasificar en “de progresión lenta” y “rápida”. La mayoría de los pacientes advierten una progresión lenta y acuden a consulta cuando aparecen los primeros síntomas. Por otro lado, alrededor del 10% de los pacientes presentan episodios agudos de deterioro clínico que recorta su supervivencia, lo cual se ha asociado con la combinación de fibrosis y enfisema (5).

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad multifactorial, consecuencia de la compleja interacción de factores ambientales y genéticos. Entre los diversos agentes ambientales que incrementan el riesgo a esta enfermedad, el hábito de fumar es el principal de todos ellos. Sin embargo, hasta la fecha no se ha demostrado causalidad en la enfermedad por alguno de tales agentes (6). Por otro lado, los polimorfismos de genes que se han estudiado en estos pacientes se relacionan con el sistema inmune, la adhesión celular, la reparación al ADN, etc. Recientemente, estudios de asociación del genoma completo revelaron variantes de riesgo en genes involucrados en la integridad del epitelio pulmonar (*DSP*, *DPP9* y *CTNNA3*) y en la mucina pulmonar (*MUC5B*) (7). También hay casos de FPI familiar que indican un patrón de transmisión autosómico dominante, pero con una penetración incompleta (8). Los genes para *TERC* y *TERT* involucrados en la extensión de los telómeros han sido reportados en el 15% de los pacientes con FPI familiar (9,10). No obstante, los pacientes con FPI familiar son escasos en comparación con los casos esporádicos de FPI que solamente presentan un caso por familia.

Hipótesis sobre la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática

En un inicio, la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática estaba acotada a la teoría de la inflamación crónica que deriva en fibrosis (11). Es común encontrarse una inflamación prominente en las etapas tempranas de las neumonías intersticiales de causa conocida y con favorables respuestas al tratamiento con glucocorticoides, como en el caso de las neumonías por hipersensibilidad (2). Sin embargo, en el caso de la fibrosis pulmonar idiopática la inflamación está ausente o se presenta mínimamente cuando el patrón fibrótico se encuentra desarrollado.

Muchos marcadores de inflamación están ausentes en los patrones histopatológicos de pacientes con FPI (12). De la misma forma, en modelos experimentales los ratones mutantes deficientes de IL-10, una citocina anti-inflamatoria, mostraron una mayor inflamación pero menor grado de fibrosis en relación con sus respectivos controles (13). Aunado con el fracaso de la terapia con antiinflamatorios en pacientes con FPI, esta hipótesis ha sido paulatinamente desaprobada (14).

Actualmente, la hipótesis apunta a que la FPI es una enfermedad epitelial/fibroblástica, como se muestra en la **ilustración 3** (15). Selman, King y Pardo presentaron en 2001 una nueva hipótesis enfocada en una respuesta aberrante de los mecanismos de recuperación de la lesión, por parte de las células epiteliales, que provoca la migración, proliferación y activación de células mesenquimales, con la formación de un foco de fibroblastos y/o miofibroblastos. Esto lleva a una acumulación exacerbada de proteínas de matriz y, con ello, a la destrucción irreversible de la arquitectura del parénquima pulmonar (4,16).

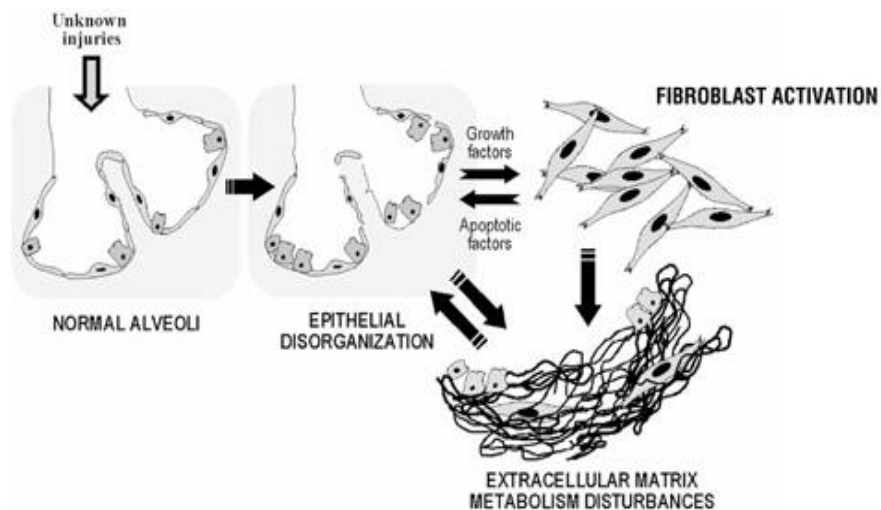


Ilustración 3. Esquema hipotético de los principales eventos en la fisiopatología de la FPI

Modificado del artículo de Selman, M. y A. Pardo, Respiratory Research (2002).

La evidencia que sustenta esta hipótesis es extensa. Las biopsias de pacientes revelan que las células epiteliales sufren cambios severos en la FPI (17). Los neumocitos tipo I son remplazados por neumocitos tipo II que migran al sitio de lesión (18). Además, el análisis por microarreglos de tejidos de pacientes con FPI apunta a la sobreexpresión de un gran número de genes involucrados en procesos de remodelación tisular, integridad del epitelio y vías de desarrollo embrionario (19).

En un análisis más detallado por inmunohistoquímica se demuestra que las células epiteliales son las responsables de la producción de una gran cantidad de reguladores mesenquimales profibrosantes, como TGF β , osteopontina, Twist1, CTGF, ET1, IGFBP, etc. (19-21). Por esta misma técnica se demuestra que las metaloproteinasas encargadas del remodelamiento de la matriz extracelular en los tejidos están expresadas casi exclusivamente en células epiteliales; por ello, se piensa que participan en la progresión de la enfermedad promoviendo la ruptura de la membrana basal así como la activación de factores de crecimiento que inducen procesos implicados en el desarrollo de la fibrosis, como migración y proliferación (22-24). De la misma forma, en células epiteliales se ha demostrado de forma latente la recapitulación aberrante de las vías de desarrollo embrionario, como Wnt, TGF β , Hedgehog, PTEN, entre otras. Estas vías se encuentran normalmente apagadas en tejidos adultos, pero también se han observado en diferentes tipos de cáncer (19). Por lo tanto, las células epiteliales son las responsables de orquestar la activación de fibroblastos así como la consecuente formación de los focos característicos de la fibrosis pulmonar idiopática.

Papel de los fibroblastos en la génesis y la progresión de la fibrosis pulmonar idiopática

El foco de fibroblastos es un sitio activo de fibrogénesis por lo que representa la principal característica histopatológica de la FPI. Los fibroblastos son células mesenquimales que participan en la regulación de la matriz extracelular y su papel es fundamental en procesos de reparación y fibrosis. Por tal, manifiestan un amplio espectro de activación que va desde un estado quiescente e indiferenciado en condiciones normales hasta una diferenciación a células secretorias y con actividad contráctil para reparar una lesión. En su estado completamente activo contienen fibras de estrés, como la actina de músculo liso que les confiere el nombre de “miofibroblastos”. En una lesión normal, los fibroblastos se diferencian de los miofibroblastos para la síntesis, secreción y remodelación de la matriz extracelular, para finalmente dar paso a la reparación de la lesión que coincide con la apoptosis de miofibroblastos.

En su desarrollo, la fibrogénesis está asociada con la acumulación permanente de fibroblastos activos o miofibroblastos (25). El origen de los fibroblastos presentes en la FPI es todavía una incógnita ya que se ha demostrado que, además de la presencia de los fibroblastos residentes en el intersticio pulmonar, existen por lo menos otras dos fuentes de fibroblastos adicionales involucradas. En primer lugar está la migración y maduración de fibrocitos, que vienen desde el torrente sanguíneo y expresan receptores para quimiocinas CXCR4/CXCL12 (26). El segundo fenómeno descrito es la transición de células epiteliales a mesenquimales (TEM). En trabajos *in vitro* se demostró que células epiteliales alveolares incubadas con altas dosis de TGF β se transforman para mostrar características propias de fibroblastos/miofibroblastos (27).

En la literatura hoy en día existen innumerables trabajos que apuntan a que los fibroblastos aislados de pacientes con FPI manifiestan características profibrosantes (28). Por ejemplo, la ausencia de Thy-1 (CD90) se ha reportado en tejido de pacientes con FPI exclusivamente en los fibroblastos. Estudios *in vitro*, además, indican que la pérdida de este marcador les otorga una mayor proliferación,

migración, producción de colágena, activación de la vía de TGFbeta, etc. (29). Modificaciones epigénéticas han sido reportadas para explicar la modificación de estos marcadores en las subpoblaciones de fibroblastos de FPI (29-31), lo que al mismo tiempo sugiere un substancial objetivo terapéutico.

Por lo tanto, se ha propuesto que en la fibrosis pulmonar idiopática los fibroblastos y miofibroblastos, una vez dentro del alveolo, se organizan en focos característicos que representan sitios de producción y depósito de proteínas de matriz extracelular. Este fenómeno culmina en una inevitable expansión de estos focos que, asimismo, se sugiere son resistentes a la apoptosis, lo cual impide el restablecimiento de la arquitectura normal del pulmón (32,33).

El envejecimiento es el principal factor de susceptibilidad para la fibrosis pulmonar idiopática

La fibrosis pulmonar idiopática sólo aparece en individuos adultos y su incidencia y prevalencia aumenta considerablemente después de los 60 años, como se muestra en la **ilustración 4** (34). A pesar de esta clara asociación, aún se desconoce el papel del envejecimiento en la patogénesis de la enfermedad (35).

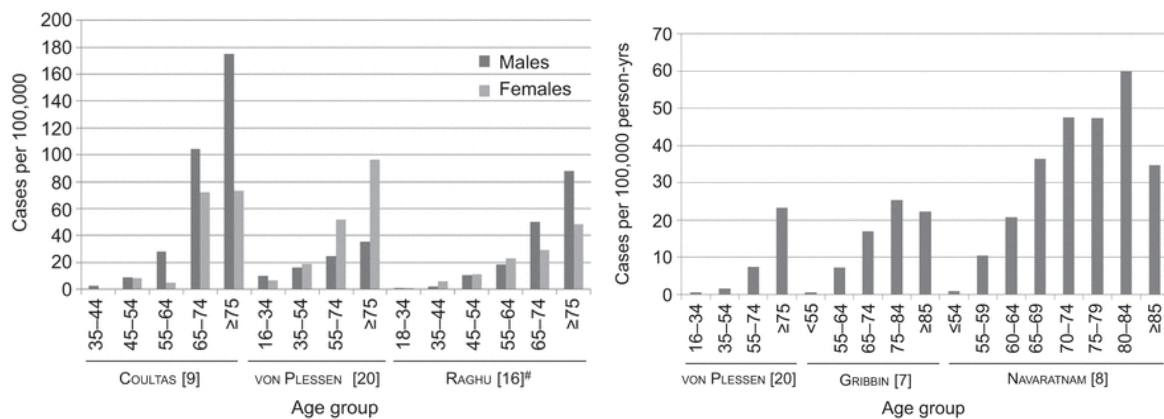


Ilustración 4. Gráficas que agrupan diferentes estudios para incidencia (izquierda) y prevalencia (derecha) de la FPI

Tomado del artículo de Nalysnk L, et al., Respir Rev (2012).

El envejecimiento se caracteriza por la acumulación progresiva de cambios nocivos en células y tejidos que aumentan el riesgo a la enfermedad y la muerte; en este proceso hay una reducción progresiva de las funciones biológicas y una menor resistencia a múltiples formas de estrés que conducen a la acumulación de daños a nivel celular. En este momento no existe una teoría consensual que pueda explicar completamente el proceso de envejecimiento; sin embargo, hay múltiples alteraciones a nivel celular relacionadas: inestabilidad genómica, acortamiento de los telómeros, cambios epigenéticos, pérdida de la proteostasis, desregulación nutricional, disfunción mitocondrial, senescencia, agotamiento de células madre y una alterada comunicación intracelular (36,37).

Mecanismos moleculares asociados al envejecimiento que pueden participar en la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática

Los diversos factores que incrementan la susceptibilidad a la fibrosis pueden ser explicados en el deterioro de las funciones que se observan durante el envejecimiento y que sugieren tener un papel en el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática. En el contexto de la FPI no se conoce el principal mecanismo relacionado con el envejecimiento, pero entre los mecanismos conectados se incluyen: estrés oxidante, disfunción mitocondrial, estrés en el retículo endoplásmico, acortamiento de los telómeros, pérdida de la heterocromatina, senescencia, cambios epigenéticos y autofagia (38,39). Como se muestra en la **ilustración 5**, se propone que la mayoría de estos cambios participan sobre la respuesta aberrante de las células epiteliales. De los cambios observados en fibroblastos, destaca el papel de la autofagia, la cual se ha reportado que puede tener un papel fundamental en la degradación de los elementos dañados así como en la función de respuesta a diferentes tipos de estrés (40).

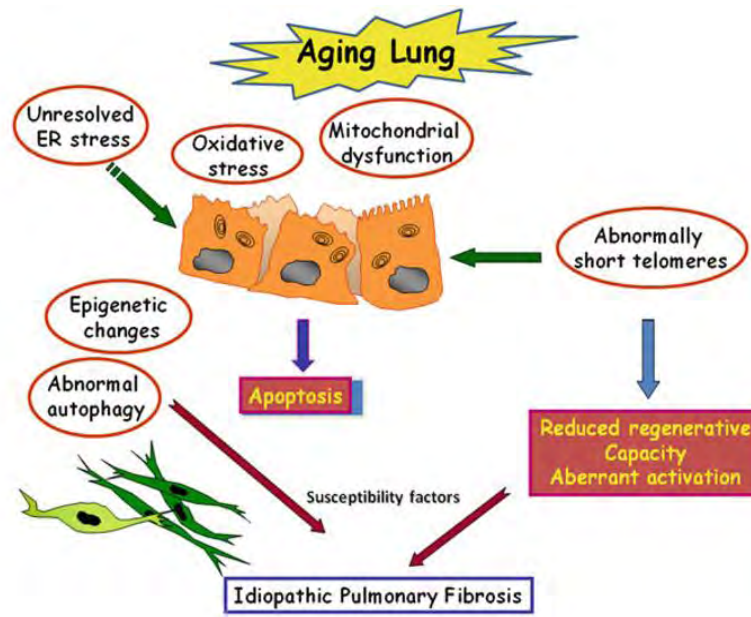


Ilustración 5. Esquema de los cambios asociados con el envejecimiento que pueden participar en el desarrollo de la FPI

Las células epiteliales (color naranja) y fibroblastos (color verde). Tomado del capítulo 12: Aging and IPF What is the link? IPF Selman et al. (2014).

Autofagia

El proceso de autofagia es un objetivo terapéutico capaz de impedir la acumulación de elementos en mal estado característicos del envejecimiento (40,41). En diferentes modelos experimentales se ha demostrado que inducir este mecanismo incrementa la expectativa de vida; inicialmente se reveló que inhibir la vía de IGF aumenta la longevidad con un concomitante aumento de autofagia en *C.elegans*, no obstante la mutación de los genes esenciales para autofagia impide el incremento de la longevidad en este organismo (42). Esto coincide con los reportes de un mal funcionamiento de la actividad autofágica en enfermedades asociadas a la edad, como cáncer, enfermedades neurodegenerativas y metabólicas (43).

Tipos de autofagia

Existen tres principales tipos de autofagia que han sido descritas: microautofagia, autofagia mediada por chaperona y macroautofagia (**ilustración 6**) (44).

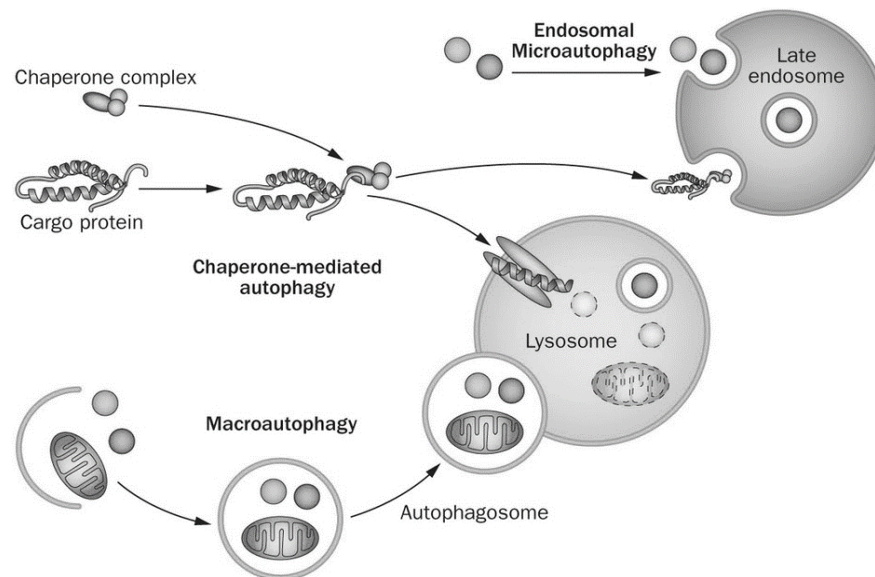


Ilustración 6. Tipos de Autofagia

La figura representa los tipos de autofagia de acuerdo a la forma de entregar el cargo en el lisosoma (microautofagia, autofagia mediada por chaperona y macroautofagia). Tomado del artículo: Schneider, JL y Cuervo AM Nat Rev Gastroenterol Hepatol (2014).

En la microautofagia, la membrana del lisosoma invagina directamente el cargo a degradar. Para la autofagia mediada por chaperona, se requiere que la chaperona (HSC70) pueda reconocer la secuencia (KFERQ) de la proteína mal plegada para ser escoltada al lisosoma donde LAMP2A en complejo pueda translocarla al lumen lisosomal. En el envejecimiento, se ha reportado una disminución de LAMP2A acompañada por una baja actividad de las enzimas que degradan el cargo en el lisosoma (45).

En este trabajo nos enfocaremos principalmente en la macroautofagia (referida solamente como autofagia de ahora en adelante) porque es el principal mecanismo de degradación de la célula y de respuesta al estrés altamente conservado a través de la evolución.

A la fecha, se han descrito alrededor de 35 genes involucrados en el proceso de autofagia que participan en diferentes etapas: inducción, nucleación, expansión del fagóforo (autofagosoma), selección del cargo, fusión con el lisosoma (autofagolisosoma), para finalmente degradar el cargo por enzimas del lisosomales (46).

Inducción y nucleación

El proceso de autofagia inicia con las cinasas que integran diferentes vías, señalización que responde a estrés o a procesos celulares tales como migración o proliferación (AMPK, FOXO, AKT/PI3K, entre otras). Estas cinasas regulan a ULK1 y a BECN1 para crear la membrana inicial. ULK1 a su vez, forma un complejo con ATG 13 y 17 para reclutar otras ATGs (47). El complejo ATG-1-13-17 es regulado negativamente por el complejo 1 de mTOR (principal inhibidor de la actividad autofágica), una cinasa de serina/treonina que puede ser inhibida por el ayuno o por el tratamiento con Rapamicina. Es importante destacar que el fenotipo de las células senescentes está mediado por la actividad de mTOR (48).

Por otro lado, se promueve la formación de fosfatidil-inositol-3-fosfato por parte del complejo PtdIns3K clase III (VPS34, p150, ATG14, y BECN1). VPS34 es

una proteína involucrada en el arreglo de la membrana en la célula y coincide con Beclin exclusivamente para la formación de la membrana del autofagosoma. BECN1 es regulado negativamente por BCL2, una proteína anti-apoptótica y anti-autofágica que es capaz de secuestrar a BECN1 impidiendo su función (49).

Expansión del fagóforo

La expansión del fagóforo se da a través de dos complejos de conjugación: LC3 y el complejo ATG5-12-16. La cascadas de conjugación son semejante a la de sistema de ubiquitina. En síntesis, la ATG4 madura a la proLC3 para generar la forma soluble LC3-I (citoplasmática); ésta es modificada a LC3-II por ATG7 y 3, que son enzimas de conjugación parecidas a ubiquitina E1 y E2 respectivamente. La unión de LC3-II a porciones aisladas de membrana permite la expansión del fagóforo para completar la vesícula de doble membrana o autofagosoma. LC3 es el principal marcador del mecanismo de autofagia debido a que LC3-II está asociada a las membranas del autofagosoma por unión covalente a la fosfatidiletanolamina lo que le confiere una mayor migración en la electroforesis y un peso menor de aprox. 14 kDa por lo tanto esta banda se puede conrrelacionar con el número de autofagosomas en un western blot. Por microscopia de fluorescencia los autofagosomas se observan como puntos de mayor intensidad debido a la acumulación de LC3-II.

El segundo sistema es ATG5-12-16, éste inicia con la activación de ATG12 también por ATG7, la cual lo transfiere a ATG10 (enzima E2) para conjugarla covalentemente con ATG5 y así poder interactuar con ATG16 para formar el complejo ATG5-12-16, que es capaz de oligomerizarse en tetrámeros por sí mismo.

En términos generales, la deficiencia total de cualquiera de los genes –LC3, ATG5 y 7– impide llevar acabo el mecanismo de autofagia, por lo tanto son valorados en muchos casos para reportar el mecanismo en general. Existen varios reportes de la disminución en la función de estos genes durante el envejecimiento y en las enfermedades asociadas (43,50).

Selección del cargo del autofagosoma

En un inicio se describió a la autofagia como un mecanismo no selectivo y por el cual en condiciones de ayuno se induce una degradación rápida e indiscriminada, ya que para las células en ayuno es importante mantener niveles de energía a través de la vía catabólica. Esta rápida respuesta al estrés de nutrientes está regulado principalmente por el complejo 1 de mTOR.

Hoy en día, la evidencia es basta sobre la selección específica de los elementos a degradar y se han definido mecanismos de degradación selectiva para agregados de proteínas (agregofagia), para la mitocondria (mitofagia), para el retículo endoplásmico (reticulofagia), para el núcleo (nucelofagia), etc. En el envejecimiento se reportado una disminución de la actividad del proteosoma, por ello las proteínas dañadas o poli-ubiquitinadas forman agregados con p62 o NBR1, éstas son proteínas que poseen dominios de reconocimiento a ubiquitina y tienen unión a LC3, de esta forma la autofagia es capaz de rescatar a la célula de la deficiencia en la actividad del proteosoma (51). Por ejemplo, en la enfermedad de Huntington se ha reportado que la proteína p62 se halla alterada y es incapaz de llevar al lumen del autofagosoma el cargo de huntingtina (52).

Fusión con el lisosoma y la degradación del cargo

El último paso de la vía de degradación por autofagia es la fusión de la membrana externa del autofagosoma con la membrana del lisosoma (autofagolisosoma) mediante las proteínas de tipo SNARE: VAMP8 y VT11B. Dentro del lisosoma se da la degradación de la vesícula interna con el cargo del autofagolisosoma por medio de las enzimas lisosomales como hidrolasas y catepsinas (53). La acumulación de elementos dañados puede ser explicada tanto por una inadecuada formación de autofagosomas, una falla en la fusión con los lisosomas o por una insuficiente actividad de las enzimas lisosomales. Aunque se desconoce si es causa o efecto del envejecimiento, la acumulación de vacuolas autofágicas y deposiciones de material lisosomal, en especial en la forma de

pigmentos autofluorescentes llamados lipofusina, es el marcador mas frecuentemente observado en las biopsias provenientes de pacientes viejos (45).

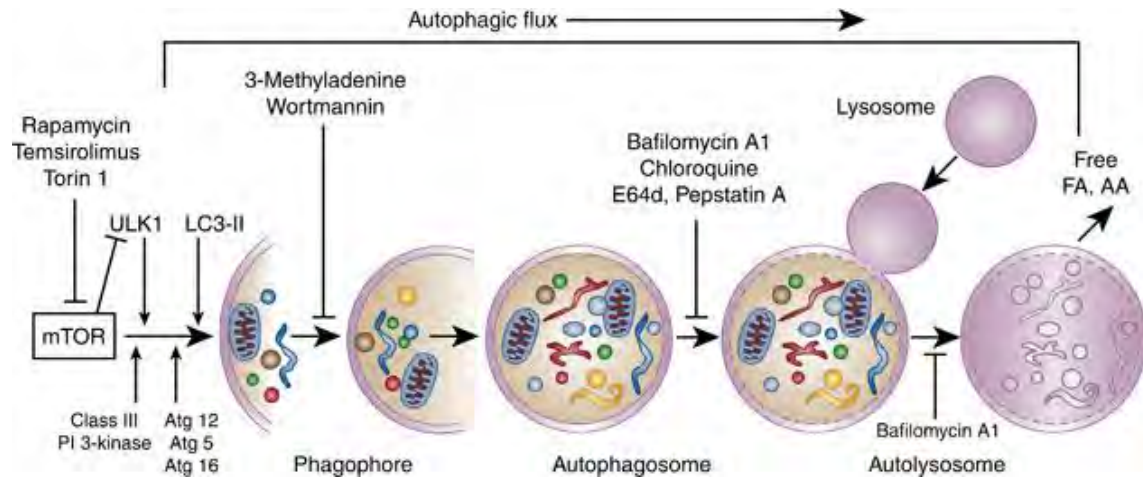


Ilustración 7. Flujo de autofagia

La figura representa los diferentes pasos en proceso: inducción, nucleación o formación del fagóforo “autofagosoma”, fusión con el lisosoma “Autolisosoma” y la degradación del cargo. Tomado del artículo: Kasahl GP Kidney int (2012).

Antecedentes específicos

La fibrosis pulmonar idiopática se caracteriza por daño y activación del epitelio alveolar, proliferación de fibroblastos/miofibroblastos y un depósito exagerado de matriz extracelular (ME) que trae como consecuencia la desorganización de la arquitectura del parénquima pulmonar y la pérdida del intercambio gaseoso (4,15). En esta secuencia de eventos patológicos dichas células, que son las principales responsables del depósito exagerado de ME, se organizan en cúmulos característicos llamados focos de fibroblastos y se ha sugerido que son resistentes a la apoptosis (54,55).

La FPI está claramente asociada al envejecimiento, sin embargo, los mecanismos moleculares que asocian el envejecimiento con esta enfermedad aún se desconocen (35,56). La autofagia y el sistema ubiquitina-proteosoma son los procesos responsables de la degradación favoreciendo el recambio de elementos dañados en las células. En este contexto, se ha demostrado que un mal funcionamiento de estos procesos desempeña un papel importante en cáncer, enfermedades neurodegenerativas y metabólicas (57). En la actualidad existe evidencia de que estos mecanismos se encuentran acoplados funcionalmente (58,59).

En un trabajo enfocado en las células epiteliales derivadas de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática describimos que la disfunción mitocondrial asociada a la deficiencia de PINK1 en el envejecimiento incrementa la susceptibilidad a la fibrosis (60). Sin embargo, esa alteración no fue observada en fibroblastos.

Es importante recalcar que los estudios de la autofagia en pulmón son escasos y a la fecha no se ha explorado el papel de envejecimiento sobre esta actividad en fibroblastos de FPI (61-64). No obstante, existe evidencia que sostiene el papel del envejecimiento sobre la actividad autofágica y su interacción con el sistema ubiquitina-proteosoma.

Justificación

En términos generales, la fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad que aparece en personas adultas y que muestra un patrón progresivo, irreversible y letal que no tiene un tratamiento efectivo hasta ahora. Las diferentes estrategias terapéuticas han fallado debido a que su fisiopatología aún no se encuentra del todo dilucidada. Por ejemplo, a la fecha no se han descrito los mecanismos que se encuentran alterados durante el envejecimiento, aunque éste es el principal factor de riesgo para desarrollar la enfermedad.

La autofagia ha sido estudiada en varios modelos de envejecimiento y ha mostrado que puede incrementar la expectativa de vida cuando se induce. Además, este mecanismo de respuesta al estrés se encuentra comprometido en otras enfermedades asociadas con la edad, tales como cáncer, enfermedades neurodegenerativas y metabólicas.

En los estudios sobre el pulmón se conoce muy poco sobre la significancia de la autofagia en las diferentes enfermedades. Además, se ha destrado que en un mismo tejido pueden existir múltiples mediadores. En el contexto de la fibrosis pulmonar idiopática no hay estudios con controles pareados por edad. Por lo tanto, este estudio se centró inicialmente en una estirpe celular, los fibroblastos, donde se examinaron el mecanismo de autofagia en condiciones basales y de estrés por ayuno evaluando los principales componentes del sistema para posteriormente centrarnos en los mecanismos de los hallazgos principales.

Hipótesis

- Los fibroblastos de pulmón derivados de individuos mayores de 60 años tienen una actividad autofágica menor que los derivados de individuos jóvenes.
- Los fibroblastos de pulmón derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática presentan una actividad de autofagia disminuida, en comparación con fibroblastos pulmonares normales pareados por edad, y su interacción con el sistema ubiquitina-proteosoma está alterada.

Objetivo general

Evaluar los niveles y la interacción de la autofagia y del sistema ubiquitina-proteosoma en fibroblastos normales pareados por edad y derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática

Objetivos específicos

- Cuantificar el nivel de autofagia por LC3 y p62 en condiciones basales en fibroblastos derivados de pulmones humanos normales pareados por edad y de pacientes con FPI.
- Evaluar el mecanismo de la formación de autofagosomas por medio de la colocalización de LC3 y p62.
- Determinar el nivel de expresión global de genes involucrados en autofagia en fibroblastos derivados de pulmones humanos normales pareados por edad y de pacientes con FPI.
- Cuantificar el nivel de autofagia en condiciones de estrés celular en los fibroblastos de las poblaciones en estudio.
- Determinar en las fases temprana y tardía de la respuesta al estrés la participación de la autofagia y la apoptosis en fibroblastos de pulmón normales apareados por edad y de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.

Material y métodos

Obtención y cultivo de fibroblastos de pulmón humano

Se utilizaron fibroblastos de pulmones humanos obtenidos tanto de donadores como de pacientes con FPI, previo consentimiento informado por parte de todos los participantes. Asimismo, el protocolo fue aprobado por University of Pittsburgh Institutional Review Board, PACCM Bio Bank y por el comité de ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Los fibroblastos se establecieron en medio HAM F-12 (Gibco) con 10% de suero fetal bovino (SFB) y una mezcla de antibióticos. Las células se crecieron en cajas T-25 a 37° en una atmósfera de 95% aire y 5% de CO₂ hasta alcanzar confluencia temprana.

Obtención y cultivo de fibroblastos de pulmón ratón

Se extrajeron fibroblastos pulmonares de ratones de la cepa C57BL/6 de 2 y 24 meses de edad provenientes de los laboratorios Jackson y del Instituto Nacional de Envejecimiento (NIA por sus siglas en inglés) respectivamente. Las células se establecieron en medio DMEM (Gibco) con 10% de suero fetal bovino (SFB) y una mezcla de antibióticos. Las células se crecieron en cajas T-25 a 37° en una atmósfera de 95% aire y 5% de CO₂ hasta alcanzar confluencia temprana.

Reactivos

Las células fueron sometidas a estrés celular con medio Hank's (Gibco). Se incubaron con inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) o cloroquina (Sigma-Aldrich) para inducir la acumulación de autofagosomas. Rapamicina 20nM (Sigma-Aldrich) y/o PP242 1uM (Sigma-Aldrich) fueron usados para inhibir los complejos de mTOR 1 y 2.

Western blot

Las proteínas fueron extraídas con RIPA (Sigma), 10-20ug de proteína total fue usada para la electroforesis en un gel de poliacrilamida del 8 al 13.5% de acuerdo al peso molecular de la proteína de interés. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF o nitrocelulosa (BioRad). La membrana se bloqueó con

por una hora. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: LC3 (L7543, Sigma), P62 (aB56416, Abcam), p(S758)ULK (6888, CST), ULK (8054, CST), p(T389)S6K1 (9206, CST), S6K1 (2708, CST), p(S235/236)S6 (2211, CST), S6 (2217, CST), ATG5 (12994, CST), BECN1(3495, CST); β -actina (a5441, Sigma) o β -tubulina (Santa Cruz). fueron utilizados como control de carga Después de la incubación del anticuerpo primario, se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos infrarrojos (Li-Cor) y revelados con un escáner Odyssey scanner (Li-Cor). La cuantificación se realizó con el programa ImageJ (NIH).

Obtención de RNA y análisis global de genes de autofagia

El ARN total se obtuvo con el reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se determinó la expresión por PCR en tiempo real (i-Cycler, BIORAD) utilizando el arreglo comercial *autophagy PCR array* (Qiagen), el cual permite considerar 84 genes que participan en la formación, transporte y fusión del autofagosoma con el lisosoma; éste también permite conocer la expresión de genes del sistema ubiquitina-proteosoma y apoptosis involucrados en autofagia. La reacción se llevó a cabo en el equipo PCR en tiempo real (CFX96 Real Time PCR System, BioRad). Los genes diferencialmente expresados fueron validados con una PCR adicional usando los siguientes *primers*: *CDNK1B* (forward, TGTAACGACGGCCAGT; reverse, CAGGAAACAGCTATGACC) y *DAPK1* (forward, TGTAACGACGGCCAGT; reverse, CAGGAAACAGCTATGACC). *GUSB* fue usado como housekeeping (forward, TGTAACGACGGCCAGT; reverse, CAGGAAACAGCTATGACC). Todos los *primers* fueron adquiridos con Integrated DNA Technologies. El análisis de los datos se basó en el método $2^{-\Delta CT}$ con la normalización de los genes housekeeping.

Evaluación en tiempo-real de la formación de autofagosomas por microscopía de fluorescencia

Para analizar la formación de vesículas autofágicas se infectaron las células con baculovirus que expresan LC3-GFP y/o p62-RFP usando el kit (Premo™ Autophagy sensors, Invitrogen). El análisis se realizó con un microscopio invertido

para epifluorescencia tipo eclipse (NIKON) equipado con un objetivo PlanFLUO 60X. La cuantificación se realizó con el programa NIS (Nikon). Se contaron manualmente los puntos más intensos para cada célula y se graficaron como el promedio de 5 fotos de dos experimentos independientes por línea celular (n>30 células por grupo).

Tinción de TUNEL

El número de células positivas fue determinado por la tinción de TUNEL siguiendo el procedimiento de acuerdo a las instrucciones del fabricante para el kit comercial ApopTag (Millipore). Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 1%. La tinción del núcleo fue mediante DAPI con el medio de montaje VECTASHIEL (Vector). Las fotografías fueron tomadas con el sistema de captura de imágenes Zoe (BioRad). Para la cuantificación se contaron manualmente el número de células positivas para TUNEL y esto se ajustó con el total del número de células teñidas para DAPI tomando un promedio de 5 fotos por línea celular de dos experimentos independientes.

Determinación de la actividad de caspasas 3/7

Las células se sembraron en placas de 96 pozos y se sometieron a diferentes tiempos de ayuno con medio Hank's (Gibco). La actividad de caspasas fue determinada siguiendo las instrucciones del kit comercial Caspase-glo 3/7 (Promega). Brevemente, el sustrato luminiscente fue liberado por acción de las caspasas y la señal de luminiscencia fue determinada en un luminómetro GlowMax (Promega).

Análisis estadístico

El tamaño de la muestra no fue determinado por estadística. Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar. Las diferencias se analizaron mediante la prueba estadística t-de Student con dos colas. Se consideraron los valores de $p < 0.05$ y $p < 0.01$ como * y ** respectivamente.

Resultados

Rango de edades en las muestras normales permite evaluar el efecto del envejecimiento en fibroblastos de pulmón derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática

Para evaluar el efecto de la edad se aislaron fibroblastos pulmonares a partir de biopsias de donantes y de pacientes con FPI. Las muestras fueron obtenidas por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y por la Universidad de Pittsburgh con previo consentimiento informado por parte de los donantes y de los comités de ética de ambas instituciones.

Se obtuvieron 6 líneas de fibroblastos pulmonares “jóvenes” con un promedio de edad de 29 años y 6 líneas de fibroblastos “viejos” con un promedio de 67 años de edad; la edad de los viejos es similar al promedio de 6 líneas de fibroblastos derivadas de pacientes con FPI (**Tabla. 1**).

Tabla 1. Fibroblastos pulmonares humanos

Controles			
	Jóvenes	Viejos	FPI
n	6	6	6
Edad promedio \pmDE	29 \pm 11	67 \pm 7	66 \pm 4

El envejecimiento disminuye el flujo de autofagia en fibroblastos de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática

Para determinar el efecto del envejecimiento en la actividad de autofagia, se utilizaron los marcadores para LC3 y p62 por la técnica de Western blot. LC3, como se menciona en el apartado de autofagia, es un marcador específico porque su forma lipidada (LC3II) se une exclusivamente a la membrana del autofagosoma. p62, por su parte, participa reconociendo a los agregados de proteínas ubiquitinadas y tiene interacción con LC3. Como se muestra en la **Figura 1A-B**, las condiciones basales para LC3 y p62 son heterogéneas. Los niveles basales para LC3-II están aumentados en fibroblastos de FPI. Por otro lado, algunas líneas de fibroblastos viejos y de FPI presentan acumulación de p62, lo que sugiere una interrupción del flujo de autofagia. En ambos casos las líneas de FPI en conjunto muestran un aumento, pero sin significancia estadística.

El flujo de autofagia involucra la síntesis y la degradación de autofagosomas de forma dinámica. Por ello, para evaluar el flujo de autofagia es necesario incubar en presencia y ausencia de inhibidores de la degradación lisosomal (65). La **Figura 2A** ejemplifica un Western blot representativo para una línea de fibroblastos derivados de un joven, una línea de viejo y una de FPI. Las células de los tres grupos de estudio se incubaron con cloroquina (CQ), un inhibidor de autofagia que impide la fusión del autofagosoma con el lisosoma. La **Figura 2B** representa el análisis densitométrico de 3 diferentes líneas para cada condición mostrando el nivel basal y el flujo de ambos marcadores. Después de 24 horas del tratamiento con CQ, se observó un aumento de la banda de LC3II en fibroblastos jóvenes, mientras que el aumento fue significativamente menor en fibroblastos viejos y de FPI, lo que indica menor degradación por la vía de autofagia (**Figura 2A-B**).

Para establecer condiciones iniciales más homogéneas en la formación de autofagosomas, se empleó una infección con baculovirus que expresan LC3-GFP y p62-RFP. Por microscopía de fluorescencia, la proteína de LC3 tiene dos distribuciones dentro de la célula: la LC3-I, la cual está difusa en el citoplasma, y LC3-II, agrupada en puntos mucho más intensos que constituyen autofagosomas.

p62 en este caso tiene una localización con LC3 para su degradación. Los niveles basales después de 16 horas de infección son mucho más homogéneos en comparación con los de Western blot, como se demuestra en la **Figura 3 y 4**.

Después del tratamiento con CQ se encontró un mayor número de autofagosomas, como lo muestra el flujo de LC3 en jóvenes comparado con viejos y en viejos comparados con FPI (**Figura 3A, B**). En el caso de p62 observamos un patrón similar en jóvenes, pero sin diferencias entre viejos y FPI (**Figura 4A, B**). Para entender por qué había diferencias entre los resultados de LC3 y p62 se realizó una colocalización para estas proteínas y se observó que en condiciones con CQ que los fibroblastos de FPI muestran una colocalización incompleta de p62 con LC3 (**Figura 4C**), lo que podría explicar la falta de diferencia en la cantidad total de p62 entre viejos y FPI. Por lo tanto, los fibroblastos de FPI presentan fallas en el reconocimiento del cargo y una menor formación de autofagosomas con respecto de los controles de su misma edad.

La disminución en la actividad de autofagia observada en fibroblastos de pulmón humano por efecto del envejecimiento fue confirmada en un modelo de ratón. Fibroblastos pulmonares de ratones jóvenes de 2 meses y de ratones envejecidos de 24 meses, edades que corresponden con las edades que se obtuvieron en las biopsias de humanos, se aislaron para analizar marcadores de autofagia en condiciones de ayuno y con el tratamiento de cloroquina a 1 y 24 horas. Como se observa en la **Figura 5**, LC3, p62 y ATG5 tienen mayor acumulación a 1 y 24 horas con cloroquina en comparación con los viejos. En condiciones de ayuno solamente se observó una mayor cantidad de LC3 a una hora de estímulo en fibroblastos de ratones de 2 meses contrastado con los de 24 meses.

En relación con estos resultados, el perfil de expresión de los genes involucrados en autofagia revela una sobreexpresión de genes involucrados en la inhibición de la autofagia como *AKT*, *BCL2L1* por parte de los fibroblastos de pulmón humano de donantes viejos comparado con los jóvenes. (**Tabla 2**).

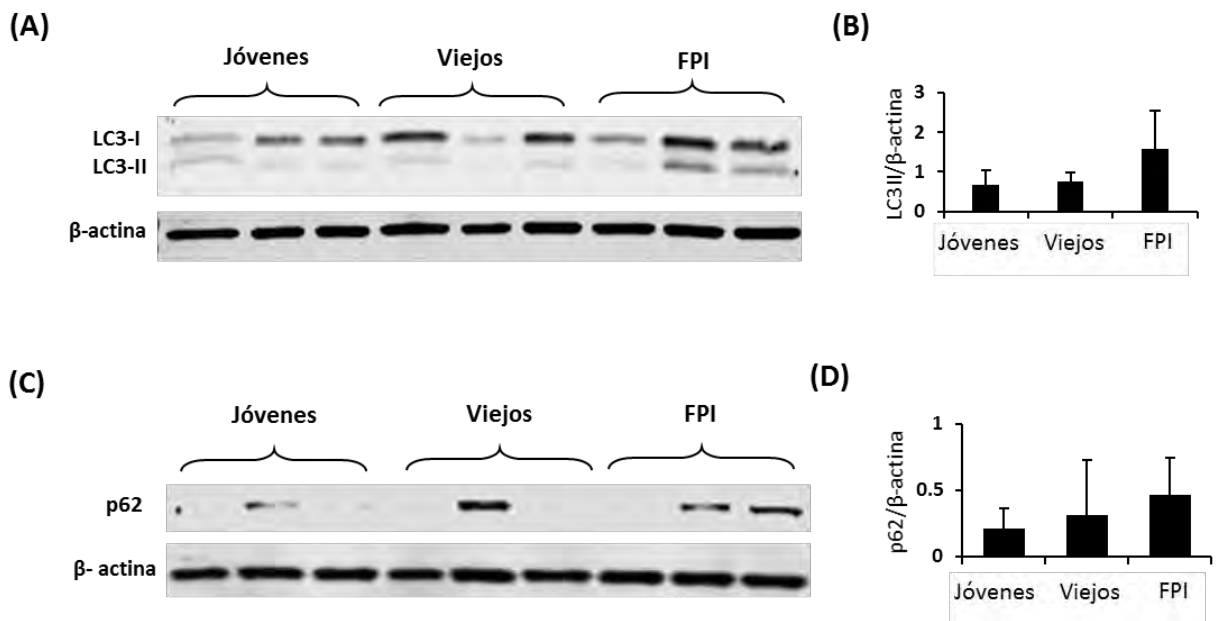


Figura 1. Niveles heterogéneos en los marcadores de autofagia en condiciones basales

Western blots para LC3 (A) y p62 (C) en fibroblastos normales pareados por edad y derivados de pacientes con FPI. β-actina fue utilizado como control de carga. En el panel B se muestra el análisis densitométrico, cada barra representa el promedio ± DE de 6 diferentes líneas de fibroblastos pulmonares. *p<0.05 **p<0.01 prueba t-Student.

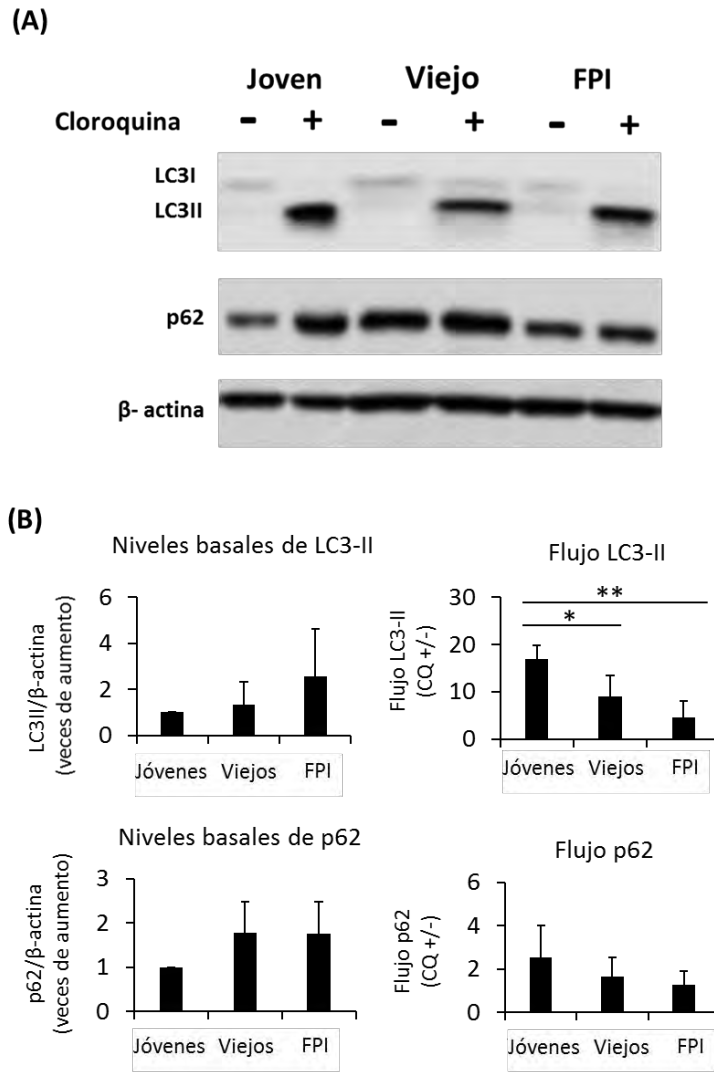


Figura 2. El envejecimiento disminuye el flujo de autofagia en fibroblastos derivados de FPI.

Marcadores de autofagia para LC3 y p62 fueron examinados en fibroblastos normales pareados por edad y derivados de pacientes con FPI. (A) Western blot representativo para una línea derivada de joven, una de viejo y una de FPI después de 24 horas con y sin el tratamiento de cloroquina (20uM). β -actina fue utilizado como control de carga. En el panel B, se muestran el análisis densitométrico de los niveles basales a la izquierda y la cuantificación del flujo de autofagia a la derecha, cada barra representa el promedio \pm DE de 3 diferentes líneas de fibroblastos pulmonares. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ prueba t-Student.

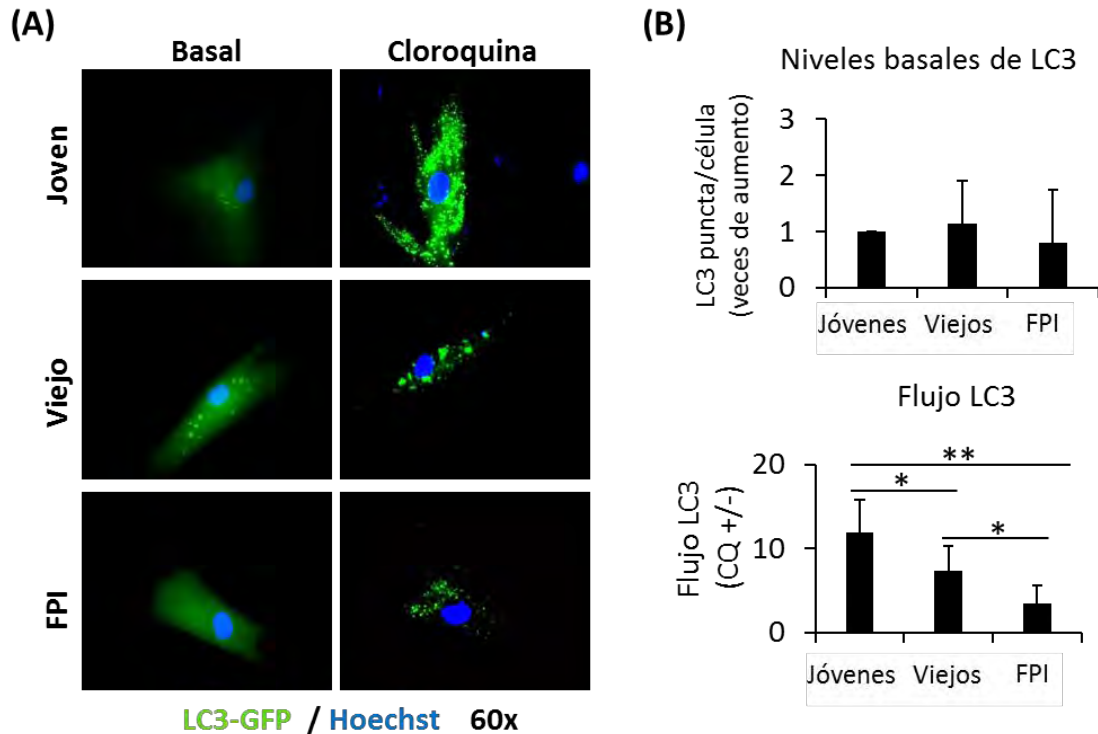


Figura 3. Menor formación de autofagosomas en fibroblastos de FPI es causado parcialmente por el envejecimiento

Se analizó la formación de nuevos autofagosomas por medio de la infección con baculovirus para LC3-GFP en fibroblastos humanos normales pareados por edad y fibroblastos derivados de pacientes con FPI. Las imágenes de microscopía de fluorescencia muestran la distribución de LC3(A) en condiciones basales (izquierda) y después de 24 horas del tratamiento con cloroquina (20uM) (derecha). Hoechst fue utilizado para la tinción del núcleo. La tinción de LC3 se ajustó por célula para el número de autofagosomas en (B). Cada barra representa el promedio \pm DE de 3 diferentes líneas de fibroblastos de pulmón para cada grupo >10 células por cada línea. * P < 0.05, ** p < 0.01 t-Student test.

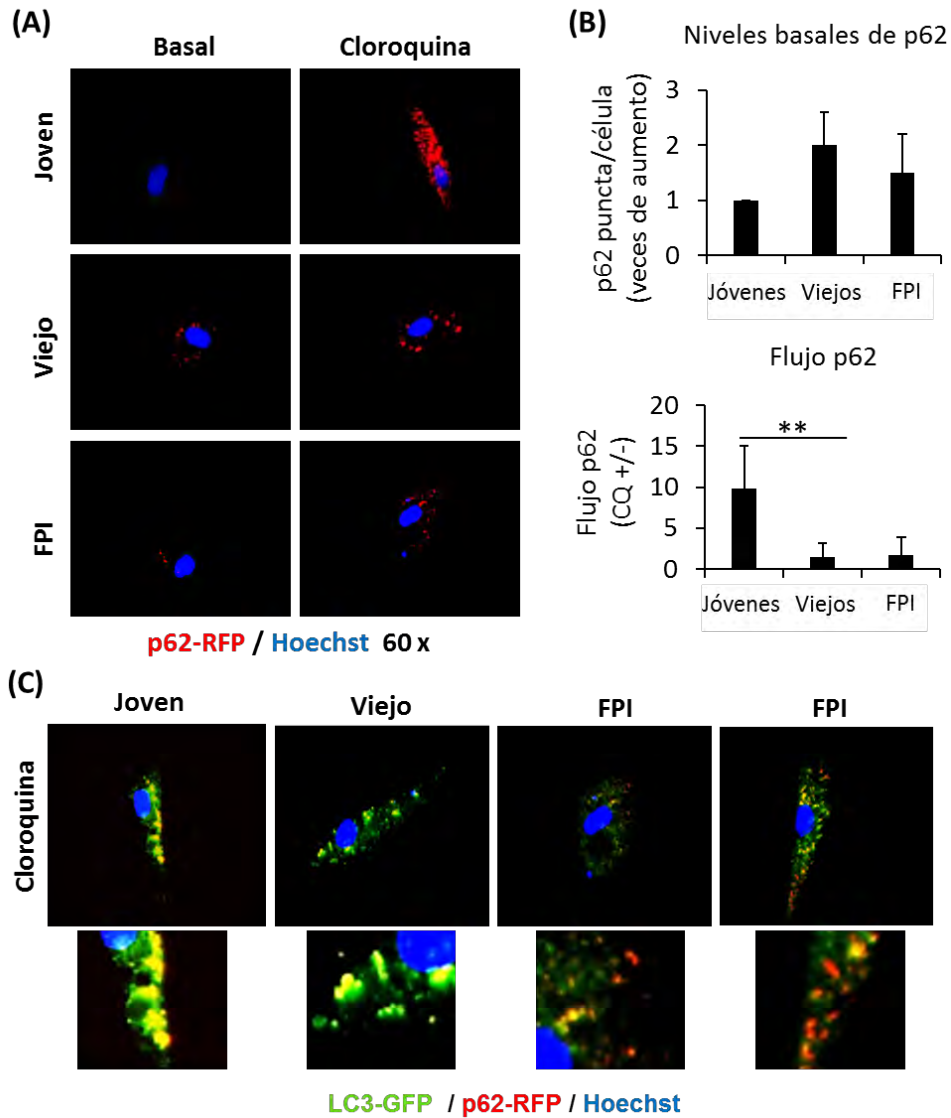


Figura 4. p62 muestra menor colocalización en fibroblastos de FPI

Se analizó la participación de p62 en la formación de nuevos autofagosomas por medio de la infección con baculovirus para p62-RFP en fibroblastos humanos normales pareados por edad y fibroblastos derivados de pacientes con FPI. Las imágenes de microscopía de fluorescencia muestran la distribución de p62 (A) en condiciones basales (izquierda) y después de 24 horas del tratamiento con cloroquina CQ (20uM) (derecha), así como su colocalización con LC3 con el tratamiento con CQ (C). Hoechst fue utilizado para la tinción del núcleo. La tinción de p62 se ajustó por célula para el número de autofagosomas en (B). Cada barra representa el promedio \pm DE de 3 diferentes líneas de fibroblastos de pulmón para cada grupo >10 células por cada línea. * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$ t-Student test.

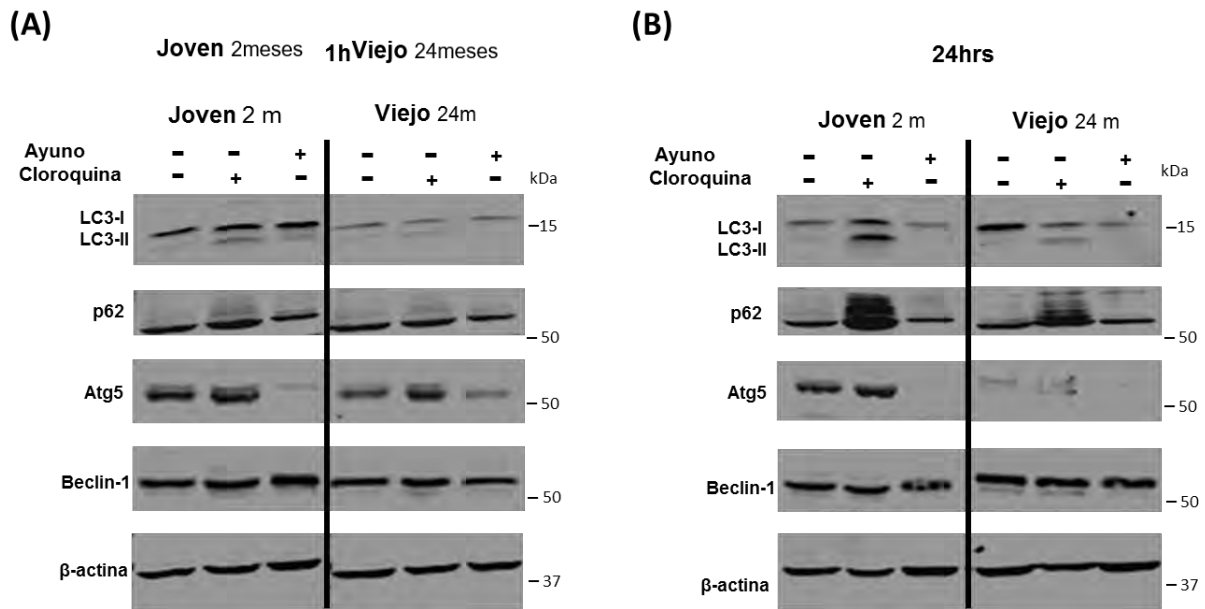


Figura 5. El envejecimiento disminuye el flujo de autofagia en fibroblastos pulmonares de ratón

Marcadores de autofagia fueron analizados en fibroblastos normales de ratones de 2 y 24 meses de edad. Western blots representativos para LC3, p62, Atg5, Beclin-1, en condiciones basales y después de 1 (A) y 24 horas (B) de ayuno y con el tratamiento de cloroquina (20uM). β-actina fue utilizado como control de carga.

Tabla 2. Cambios en la expresión de genes involucrados en autofagia en el envejecimiento

Símbolo del gen	Veces de aumento	Valor de p
<i>AKT1</i>	4.2	0.045
<i>BCL2L1</i>	2.6	0.023
<i>ATG4B</i>	2.5	0.025
<i>HSP90AA1</i>	2.4	0.019
<i>ATG12</i>	2.3	0.020
<i>CASP3</i>	-2.1	0.026

El envejecimiento previene la respuesta de autofagia inducida por ayuno en fibroblastos pulmonares derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática mediado por la vía de mTOR

El ayuno es un estímulo muy potente para inducir la respuesta de autofagia, por esa razón determinamos el flujo de autofagia por LC3 en un medio carente de nutrientes y en un tiempo mucho más corto. Inicialmente, examinamos el estímulo de ayuno a 0, 30 y 60 minutos en presencia y ausencia de inhibidores de proteasas (**Figura 6**). Para los experimentos donde se comparan los diferentes grupos de estudio se escogió el tiempo de 1 hora de ayuno. La **Figura 7A** muestra un inmunoblot representativo de las condiciones en presencia de inhibidores (basal y ayuno), los respectivos controles sin inhibidores no se muestran en el panel A; sin embargo, fueron considerados para la elaboración de la gráfica de la **Figura 7B**. En estas condiciones, el flujo de LC3-II es significativamente más alto en fibroblastos jóvenes en comparación con los fibroblastos viejos y de FPI.

La inducción de autofagia tiene una correlación inversa con la actividad de mTOR. El complejo de mTOR puede reprimir la activación de autofagia fosforilando a la proteína ULK1 en el sitio de la serina 758 (66). Esta fosforilación fue examinada para explorar el mecanismo por el que fibroblastos derivados de individuos viejos muestran una actividad de autofagia disminuida. Como se demuestra en la **Figura 8**, en las condiciones iniciales la fosforilación está presente en jóvenes, viejos y FPI. Después del estímulo con ayuno solamente los fibroblastos jóvenes inhiben la fosforilación de ULK1 en S758, mientras que la fosforilación es persistente en células derivadas de viejos y de FPI. Además, se observa que otra parte de la vía de mTOR que fosforila a las cinasas S6K1 y S6 está presente después del estímulo en viejos y FPI. Por lo tanto, la actividad de la vía de mTORC1 es responsable de la inhibición de autofagia y corresponde a una falla en la adaptación de las células al estrés también observado en otras enfermedades asociadas con el envejecimiento (67). La fosforilación de S235/236 se redujo en jóvenes después del estímulo, aunque también en el grupo de fibroblastos viejos, lo que sugiere un posible retraso en la activación de la vía de mTOR. No se observaron cambios en los fibroblastos de FPI **Figura 8**.

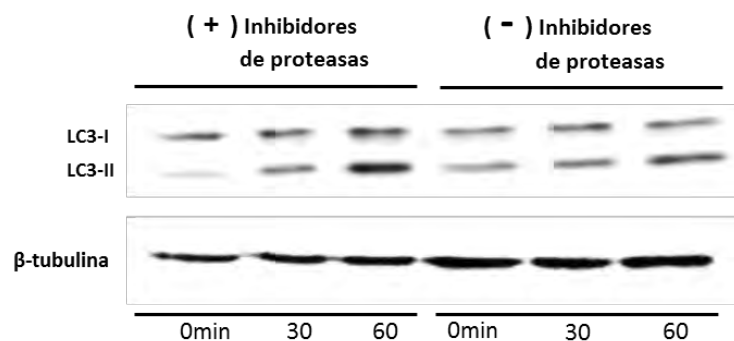


Figura 6. Estandarización del flujo de autofagia inducido por ayuno en fibroblastos de pulmón

El flujo de autofagia fue examinado a través de western blots para LC3 a 0, 30 y 60 minutos de ayuno con y sin inhibidores de proteasas en fibroblastos normales (A) Western blot representativo de LC3 y β -actina como control de carga.

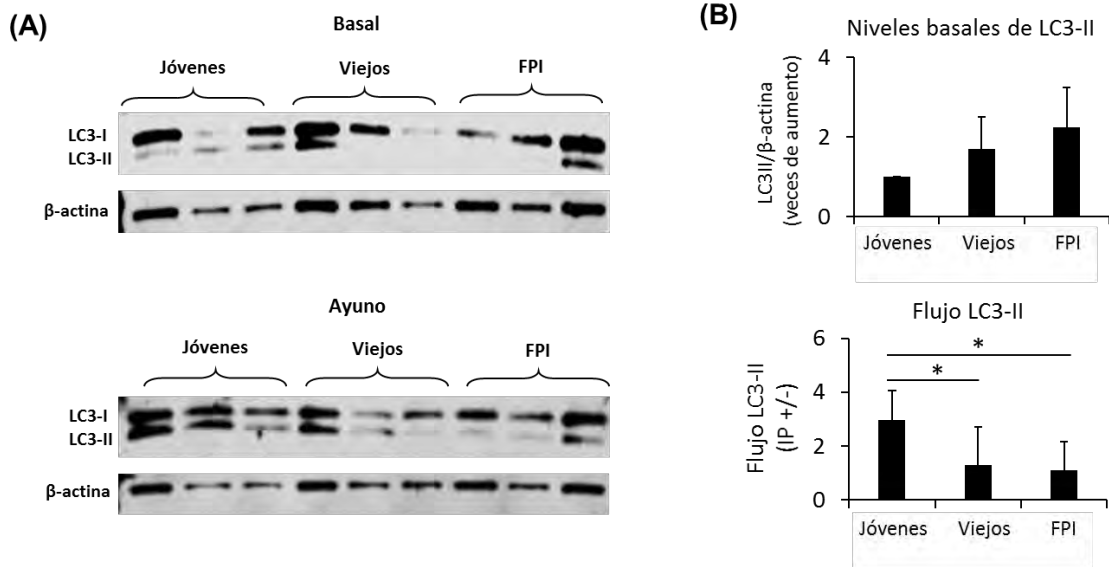


Figura 7. El envejecimiento impide el flujo de autofagia inducido por ayuno en fibroblastos derivados de FPI

El flujo de autofagia inducido por ayuno (HBSS) fue examinado en fibroblastos normales pareados por edad y derivados de pacientes con FPI. (A) Western blots representativos de LC3 y β -actina como control de carga, en condiciones basales y después de 1 hora de ayuno con inhibidores de proteasas. (B) Análisis densitométrico que muestra los niveles basales (arriba) y la cuantificación del flujo de autofagia (abajo), cada barra representa el promedio \pm DE de 3 diferentes líneas de fibroblastos pulmonares. * $p < 0.05$ prueba t-Student.

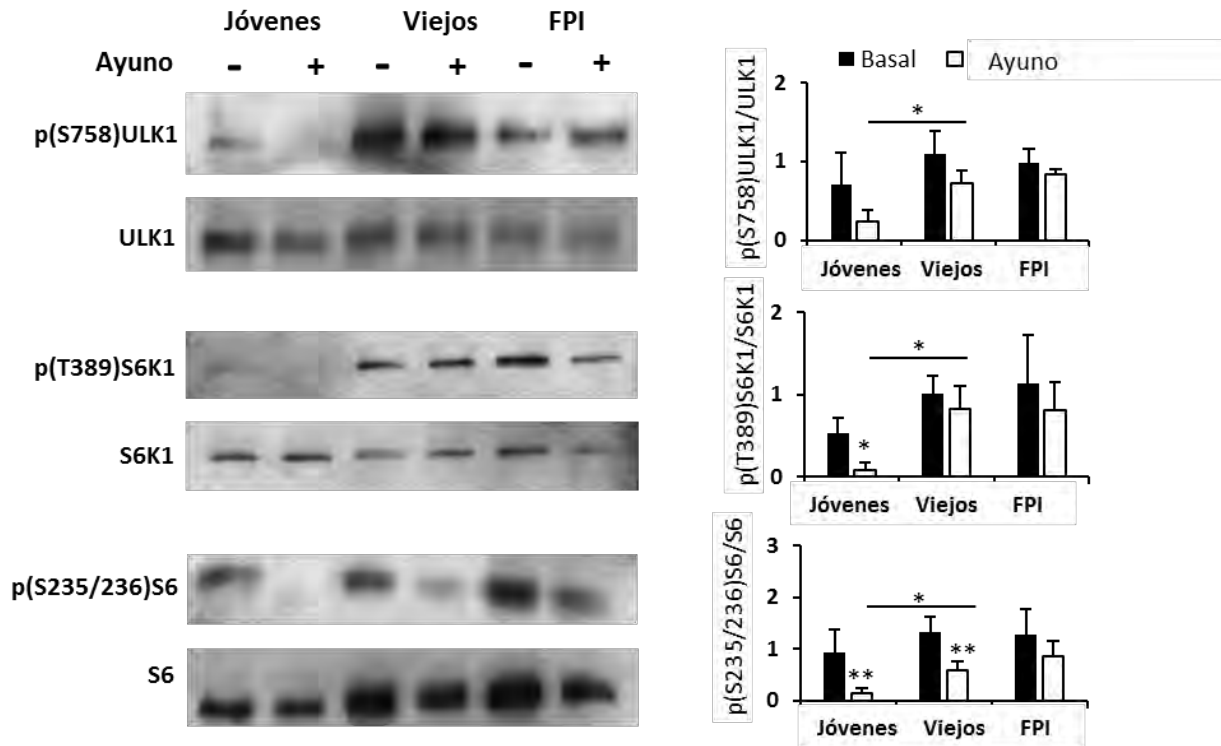


Figura 8. El envejecimiento previene la inducción de autofagia por la actividad de la vía de mTORC1 en fibroblastos derivados de FPI

Marcadores de la vía de mTORC1 fueron determinados en fibroblastos normales pareados por edad y derivados de pacientes con FPI. Western blots para pULK1, ULK1 pS6K1, S6K1, pS6, S6 en condiciones basales y después de 1 hora de ayuno. β -actina fue utilizado como control de carga. Análisis densitométrico, cada barra representa el promedio \pm DE de 3 diferentes líneas de fibroblastos pulmonares para el caso de ULK y S6K1 así como 6 diferentes líneas para S6. * $p < 0.05$ prueba t-Student.

Fibroblastos pulmonares derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática exhiben una activación persistente de la vía de mTOR que les confiere una resistencia a la apoptosis inducida por ayuno

Se incrementó el tiempo de ayuno en las líneas celulares de viejos y de FPI para encontrar un estímulo capaz de inhibir la actividad de mTOR. Los fibroblastos jóvenes inhiben la actividad de mTOR por completo después de una hora de estímulo. A las 6 horas de estímulo los fibroblastos viejos inhiben la actividad de la vía de mTOR, pero no los fibroblastos de FPI. Esta actividad se observó incluso después de 24 horas de estímulo (**Figura 9**).

El complejo de mTOR es un regulador crucial en las respuestas de adaptación al estrés por la privación de nutrientes, por lo que la activación persistente de esta vía podría participar en los cambios necesarios para la sobrevivencia celular. Por medio de micrografías de campo claro se revela que la incubación prolongada en condiciones de ayuno induce la muerte celular en fibroblastos jóvenes y viejos, pero no en fibroblastos de paciente de FPI (**Figura 10**). De acuerdo con la expresión de los genes relacionados con autofagia mediante el arreglo para PCR (Profile PCR Array Human Autophagy), los fibroblastos de pacientes con FPI exhiben una menor expresión de genes involucrados tanto en autofagia como apoptosis: *CDKN1B* y *DAPK1* (**Figura 11A**). Estos resultados fueron confirmados por qPCR en 4 diferentes líneas de fibroblastos jóvenes, viejos y de FPI (**Figura 11B-C**). *CDKN1B* participa en la respuesta de autofagia inducida por estrés de nutrientes principalmente glucosa, y puede desencadenar apoptosis por medio de la regulación del ciclo celular (68). Por otro lado, *DAPK1* participa en la muerte celular inducida por interferón-gamma y se sugirió que puede inhibir a mTOR por su interacción con TSC2 (69,70).

Se examinó por la tinción de TUNEL y la actividad de caspasas 3/7 el mecanismo de apoptosis en las células de los tres grupos después de someterlas a condiciones de ayuno. Los resultados de la tinción de TUNEL muestran que

fibroblastos jóvenes y viejos despliegan un mayor número de células apoptóticas, mientras que la tinción está casi ausente en las células de FPI (**Figura 12A-B**). Estos resultados concuerdan con la actividad de las caspasas 3/7 que incrementan de manera tiempo dependiente en fibroblastos jóvenes y viejos, pero no en fibroblastos de FPI (**Figura 12C**).

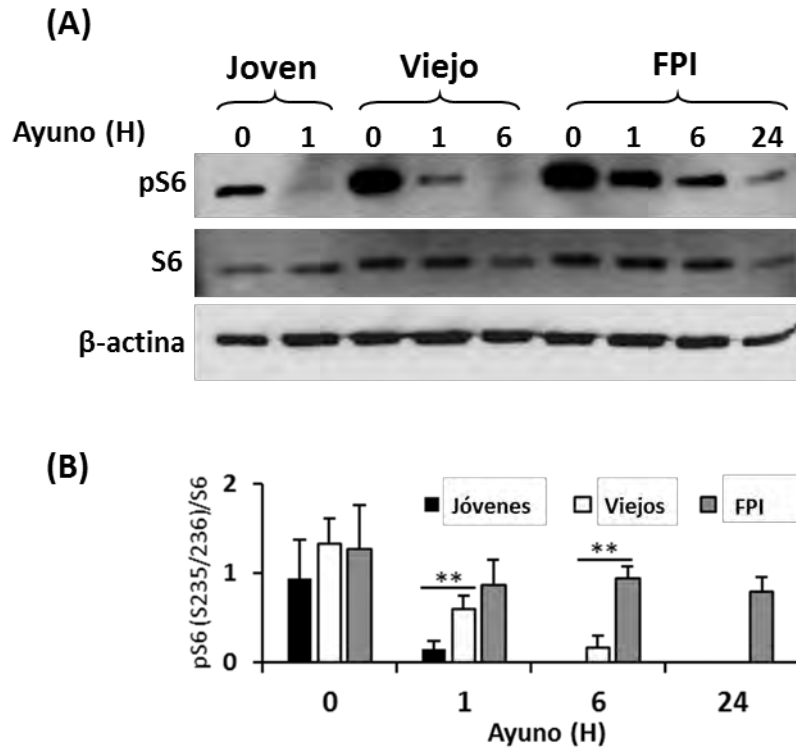


Figura 9. Fibroblastos derivados de pacientes con FPI exhiben una activación persistente de la vía de mTOR en condiciones de ayuno

(A) Western blot para pS6 24 S6 en condiciones basales y después de diferentes tiempos de ayuno en fibroblastos normales pareados por edad y derivados de pacientes con FPI. β -actina fue utilizado como control de carga. (B) Análisis densitométrico, cada barra representa el promedio \pm DE de 6 diferentes líneas de fibroblastos pulmonares de cada grupo para el caso de 0 y 1 hora así como 3 diferentes líneas para 6 y 24 horas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ prueba t-Student.

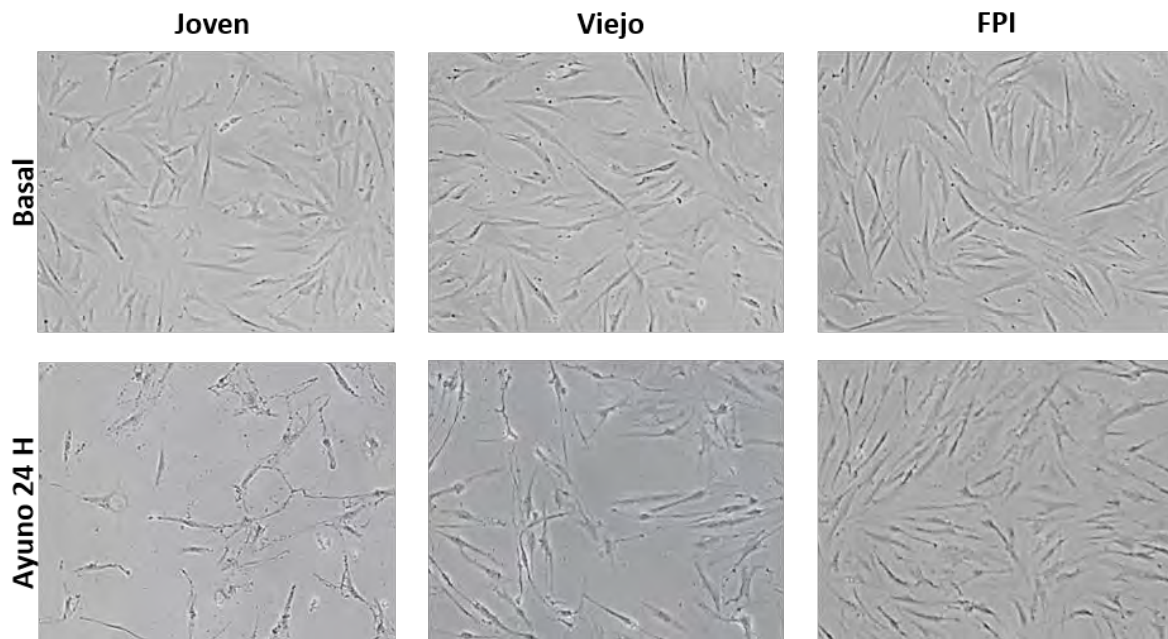


Figura 10. Fibroblastos normales pareados por edad y de FPI después de 24 horas de ayuno

Micrografías representativas de fibroblastos normales pareados por edad y derivados de pacientes con FPI en condiciones basales y después de 24 horas de ayuno con medio Hank's.

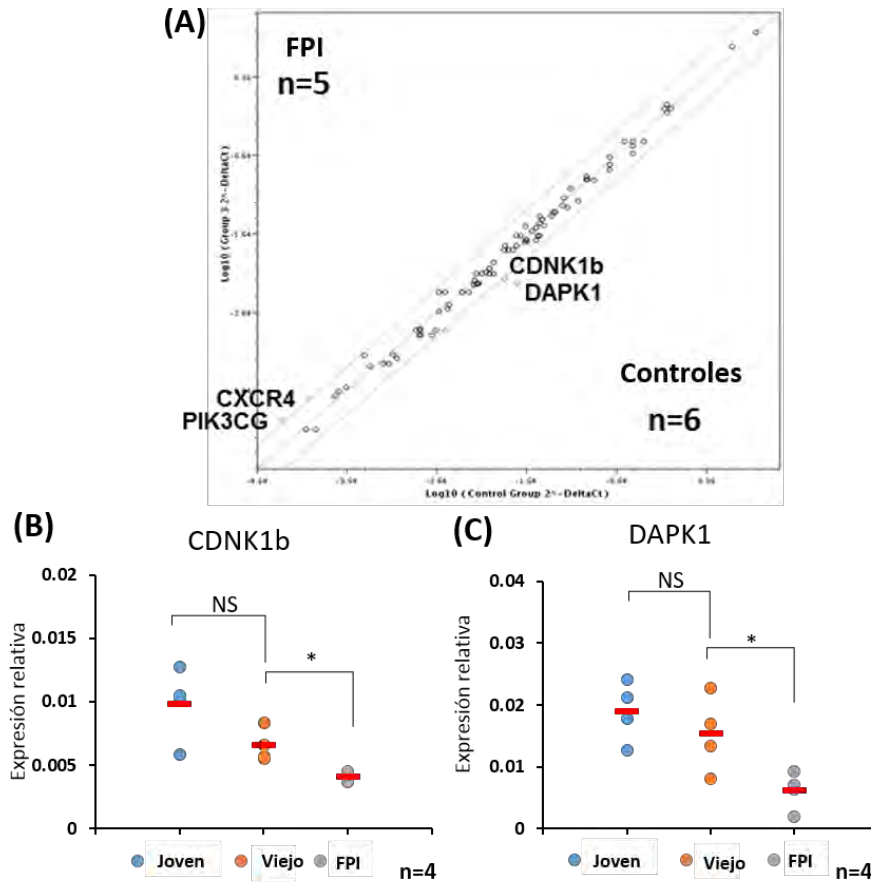


Figura 11. Genes relacionados con autofagia diferencialmente expresados en fibroblastos de FPI

(A) Gráfica de dispersión que muestra 84 genes involucrados en el mecanismo de autofagia en fibroblastos pulmonares humanos normales (jóvenes y viejos n=6) y derivados de pacientes con FPI (n=5). Validación por qPCR de *CDNK1B* (B) y *DAPK1* (C) en fibroblastos jóvenes, viejos y de FPI. Cada punto representa el promedio de los triplicados para los valores de $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$. Se evaluaron cuatro diferentes líneas celulares primarias para cada grupo. El promedio del grupo se representa con una línea roja. * $p < 0.05$, prueba t-Student para dos colas.

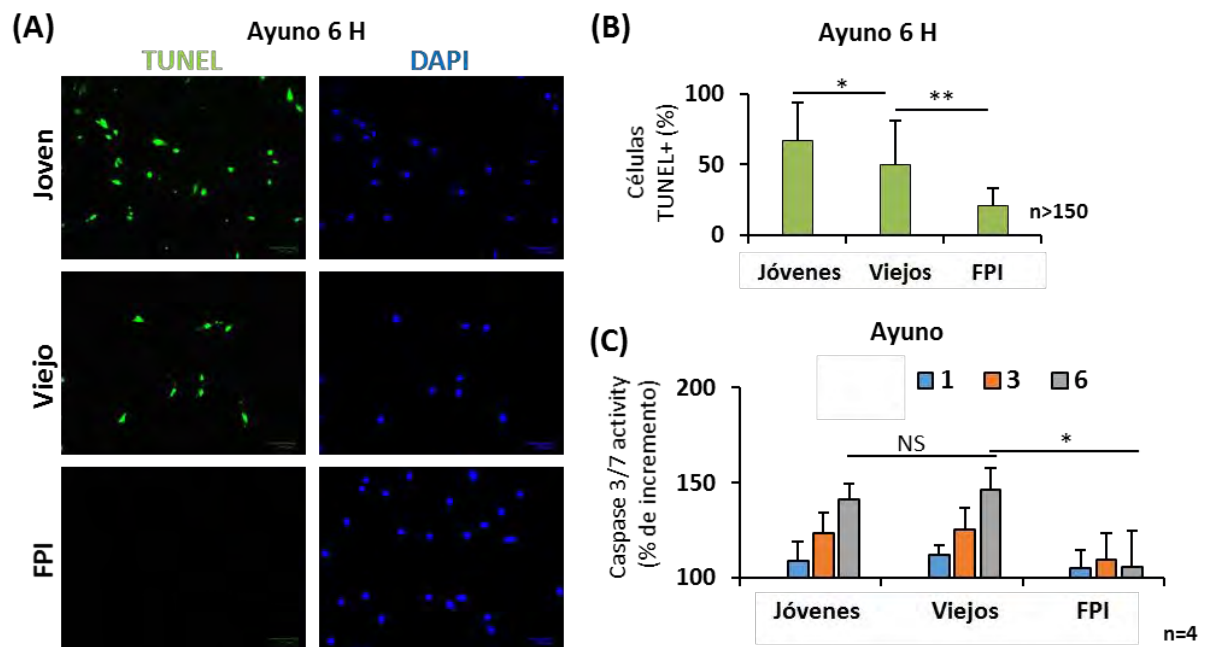


Figura 12. Resistencia a la apoptosis inducida por ayuno en fibroblastos derivados de pacientes con FPI

Las células de los tres diferentes grupos fueron expuestas a condiciones de ayuno incubándolas con medio Hank's para inducir apoptosis. (A) Detección de células apoptóticas usando la tinción de TUNEL y la tinción nuclear con DAPI en fibroblastos después de 6 horas de estímulo. (B) Porcentaje de las células positivas a la tinción de TUNEL ajustadas por el número total de células determinado por DAPI. Cada barra representa el promedio \pm DE de tres diferentes líneas celulares en cada grupo (n>150 células por grupo). (C) Actividad de caspasas 3/7 después de 1, 3, y 6 horas de ayuno (Hank's) ajustados con el tiempo 0. Cada barra representa el promedio \pm DE de tres diferentes líneas celulares en dos experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.01 prueba t-Student para dos colas.

Inhibidores de la vía de mTOR modifican la respuesta de autofagia en fibroblastos viejos y de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática

Los complejos de mTOR 1 y 2 regulan las respuestas de estrés por la privación de nutrientes. El complejo de mTORC1 incrementa la traducción de proteínas y procesos anabólicos con una directa inhibición del proceso de autofagia (71). El complejo de mTORC2 regula a AKT, SGK1 y PKC α (72). Existe evidencia que indica la retroalimentación entre ambos complejos. La Rapamicina es un inhibidor alostérico de mTORC1. PP242 es una nueva droga con un efecto inhibitorio potente y selectivo sobre el dominio ATP de mTOR que suprime su actividad en ambos complejos (73).

Preliminarmente, se probaron Rapamicina y PP242 por separado y en combinación por 24 horas en fibroblastos de pacientes con FPI. Se observó un efecto modesto por parte de Rapamicina (20nM) en la reducción de la actividad de mTOR, mientras que PP242 (1 μ M) causó una inhibición mayor de la actividad de mTOR demostrado por la disminución significativa de la fosforilación de S6K1 y S6 (**Figura 13**).

Los experimentos con el tratamiento de los inhibidores farmacológicos sobre la actividad de autofagia corroboraron que en condiciones de ayuno los fibroblastos derivados de individuos jóvenes incrementan el nivel de LC3II. Resultados similares fueron observados con el pretratamiento de Rapamicina, PP242 y, primordialmente, cuando ambos se encuentran en combinación (**Figura 14A-B**). La notable disminución de LC3II con los inhibidores en condiciones de ayuno puede ser explicada por la reactivación de mTORC, como se muestra en la **Figura 15**. Esta reactivación se ha observado después de que se llevo acabo la degradación dentro del lisosoma y hay una aumento en la concetracion de aminoácidos (74). Fibroblastos viejos, como previamente se demostró, no incrementan la autofagia en condiciones de ayuno; sin embargo, con el pretratamiento de los inhibidores responden de manera similar a los fibroblastos jóvenes (**Figura 14C-D**). En el caso de los fibroblastos de FPI, que son incapaces de incrementar la autofagia en condiciones de ayuno, el pretratamiento con los inhibidores y fundamentalmente

con la combinación de los inhibidores y el ayuno resultan en el incremento de LC3II (**Figura 14E-F**). En contraste con los fibroblastos jóvenes y viejos, la actividad de mTOR en fibroblastos de FPI no fue reactivada con la combinación de Rapamicina y PP242 en condiciones de ayuno (**Figura 15**).

Inhibidores de la vía de mTOR modifican la respuesta de apoptosis en fibroblastos de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática

Finalmente, evaluamos si la disminución en la respuesta apoptótica observada en fibroblastos de FPI, como se muestra en la **Figura 12**, fue afectada por el tratamiento con los inhibidores de mTOR. Después de 6 horas de ayuno, la inhibición de mTOR con PP242 solo o en combinación con Rapamicina induce un incremento en el número de células positivas para la señal apoptótica por la tinción de TUNEL (**Figura 16A**), mientras que en condiciones basales sin ayuno no se observaron diferencias (**Figura 16B**). De la misma forma, un incremento significativo de la actividad de las caspasas 3/7 fue detectado en fibroblastos de FPI después de 6 horas de ayuno, principalmente con el pretratamiento con la combinación de PP242 y Rapamicina (**Figura 16C**); no se detectaron diferencias en las condiciones basales (**Figura 16D**). El tratamiento con Rapamicina induce un incremento marginal, pero no significativo, en la actividad de las caspasas.

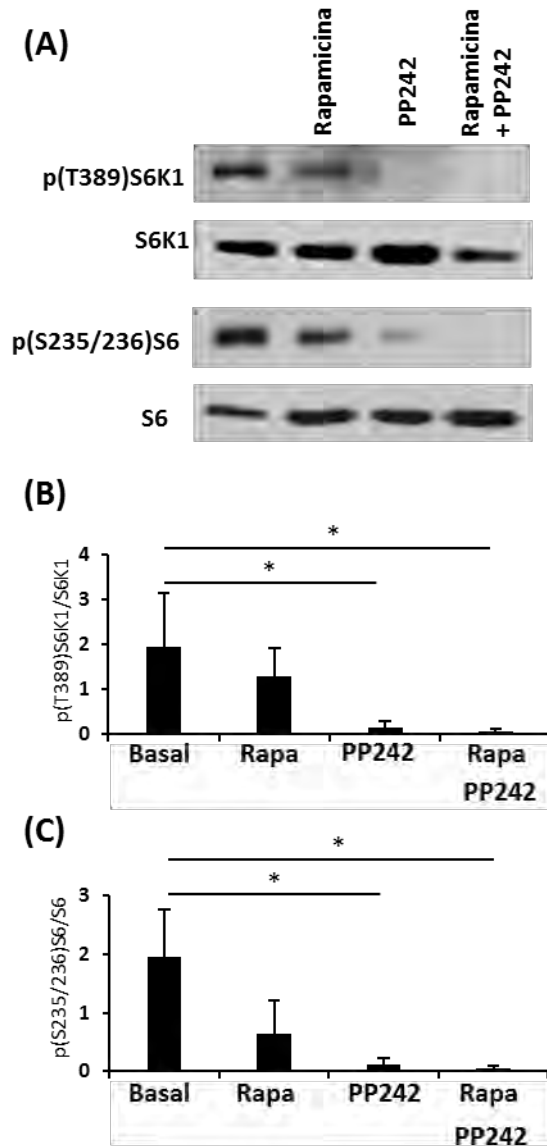


Figura 13. Rapamicina y/o PP242 reducen la actividad de la vía de mTOR en fibroblastos derivados de FPI

Marcadores de la vía de mTOR fueron examinados en fibroblastos derivados de pacientes con FPI después de 24 horas con Rapamicina (20nM) y/o PP242 (1uM). (A) Western blots para pS6K1, S6K1, pS6, S6 en condiciones basales y después del tratamiento. β -actina fue utilizado como control de carga. Análisis densitométrico para pS6K1 (B) y pS6 (C), cada barra representa el promedio \pm DE de tres diferentes líneas celulares. * $p < 0.05$ prueba t-Student para dos colas.

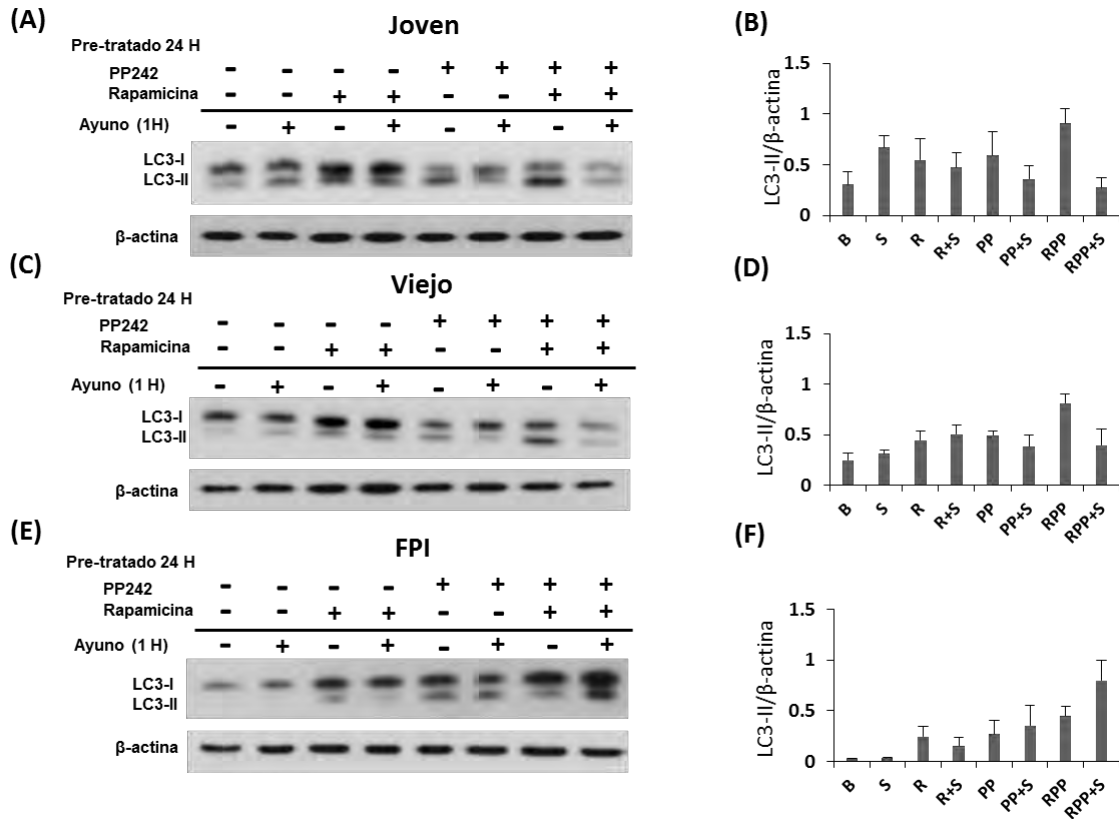


Figura 14. Rapamicina y/o PP242 modifican la actividad de autofagia de los tres grupos de fibroblastos pulmonares (jóvenes, viejos y FPI)

El efecto sobre la actividad autofágica con y sin ayuno fue analizada por Western blots para LC3 y β -actina como control de carga en fibroblastos jóvenes (A), viejos (C) y derivados de pacientes con FPI (E). (B, D, F) Análisis densitométrico, cada barra representa el promedio \pm DE de dos diferentes líneas celulares.

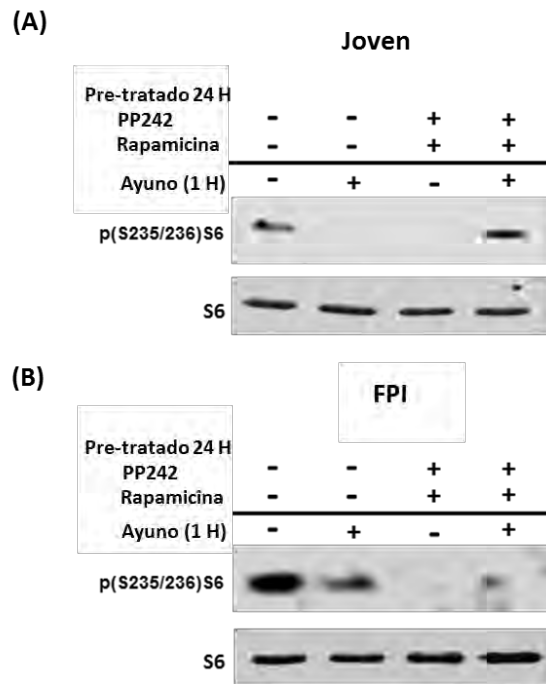


Figura 15. Efecto de Rapamicina y PP242 en la actividad de mTOR de fibroblastos pulmonares de jóvenes y de FPI

Fibroblastos pulmonares derivados de individuos jóvenes (A) y de pacientes con FPI (B) después de 24 horas con Rapamicina (20nM) y PP242 (1uM) con y sin ayuno fueron analizados para determinar la actividad del complejo 1 de mTOR por Western blots para fosforilación de (S235/236)S6.

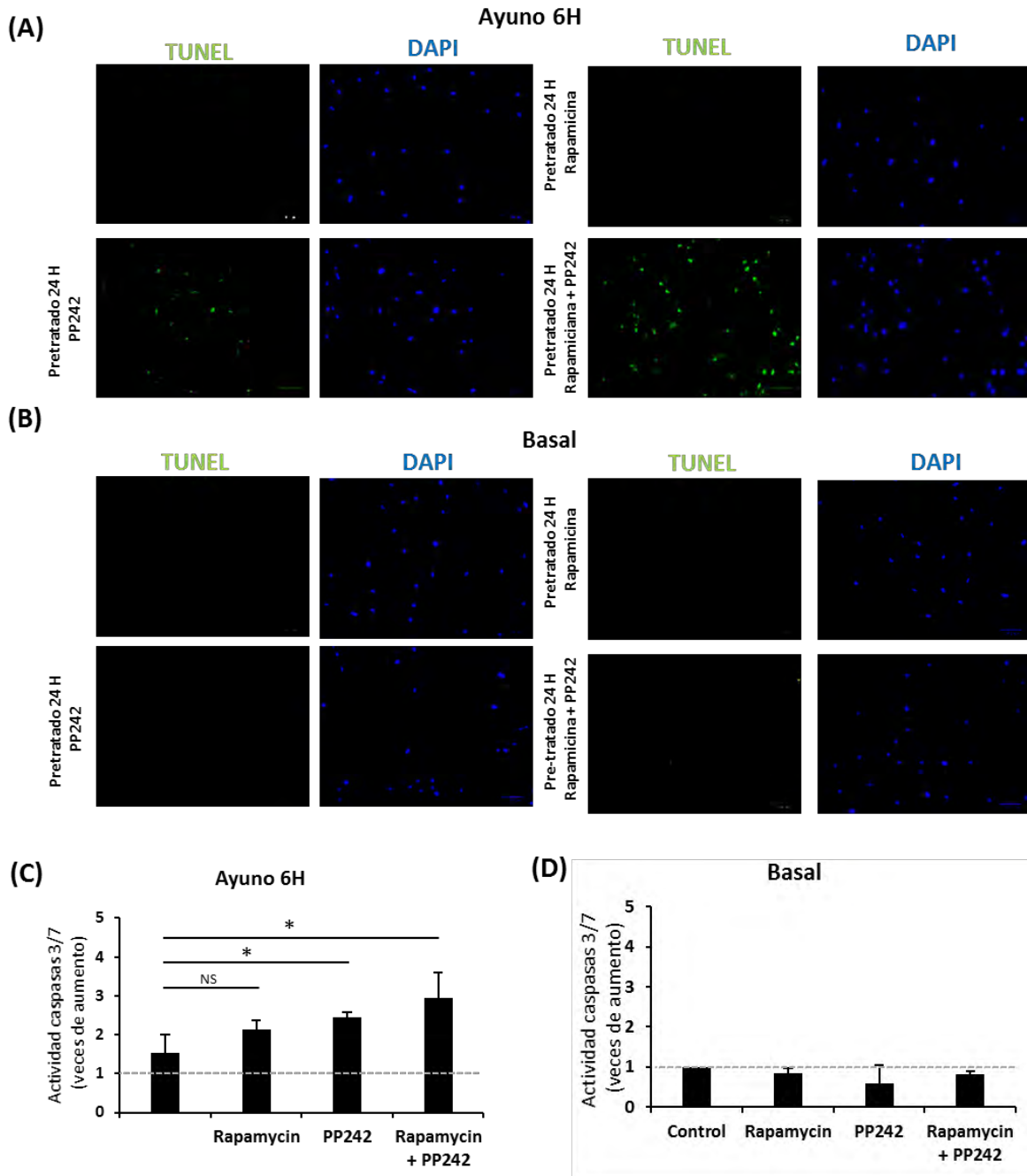


Figura 16. Rapamicina y/o PP242 rescata la respuesta de apoptosis inducida por ayuno en fibroblastos derivados de FPI

La apoptosis fue determinada en fibroblastos derivados de pacientes con FPI después de 24 horas con Rapamicina (20nM) y/o PP242 (1uM). Micrografías representativas de la tinción para TUNEL y tinción nuclear para DAPI después del tratamiento con Rapamicina ± PP242 con ayuno de 6 horas (A) y en condiciones control (B) n=3. Actividad de caspasas 3/7 después del tratamiento con Rapamicina ±PP242 en condiciones control (C) y con ayuno de 6 horas (B) n=3.

Discusión

El envejecimiento no es una enfermedad, pero los procesos biológicos que cambian con la edad tienen un papel crucial en numerosas enfermedades crónicas degenerativas (36,37). Una característica común en las enfermedades relacionadas con la edad, como cáncer, desórdenes cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas, es la disfunción del mecanismo de autofagia (75,76). Además, hay evidencia que sostiene que la deficiencia en autofagia recapitula el fenotipo del envejecimiento (40,77).

En las enfermedades pulmonares, el envejecimiento incrementa la morbilidad y mortalidad de enfermedades como EPOC, neumonías y FPI; sin embargo, los mecanismos involucrados no han sido completamente dilucidados (35,38,56). En esta misma línea, la FPI es el prototipo de una enfermedad asociada con el envejecimiento ya que usualmente ocurre en individuos mayores de 50 años e incrementa considerablemente con el envejecimiento (78,79). En la actualidad, el envejecimiento es el principal factor de riesgo demográfico para la FPI. Diversos mecanismos parecen estar implicados, no obstante han sido estudiados principalmente en células epiteliales como el acortamiento de los telómeros, inestabilidad genómica y senescencia (38). Recientemente, hemos mostrado que la disfunción mitocondrial asociada con la deficiencia de PINK1 en células epiteliales alveolares durante el envejecimiento así como en el estrés de retículo endoplásmico promueve la fibrosis (60). Sin embargo, el efecto del envejecimiento en fibroblastos de FPI aún no está claro.

En este contexto, el presente estudio fue diseñado para examinar el papel que puede tener el envejecimiento en la actividad de autofagia de fibroblastos pulmonares tanto normales como de pacientes con FPI. Se encontró que el envejecimiento inhibe la autofagia de fibroblastos pulmonares normales de humano y de ratón. Sin embargo, se encontraron pocas diferencias entre fibroblastos viejos y de FPI, ejemplificado por la detección de las acumulaciones de LC3 puncta por

célula. Comparados con los fibroblastos normales viejos, los fibroblastos de FPI muestran una menor cantidad de autofagosomas recién sintetizados con una incorrecta localización de p62. En condiciones de estrés, la vía de mTOR en fibroblastos viejos se mantiene activa por un periodo más largo de tiempo, el cual fue más prominente en fibroblastos de FPI. Esta activación persistente de las células derivadas de FPI coincide con un incremento en la resistencia a apoptosis.

El flujo de autofagia es crítico para mantener la homeostasis celular. Los resultados demuestran que fibroblastos derivados de pulmones normales de individuos viejos y de FPI tienen una disfunción en la actividad de autofagia. En condiciones basales, algunos casos de viejos y FPI tienen un flujo de autofagia interrumpido. Cuando la acumulación es inducida por cloroquina hay menor número de autofagosomas en fibroblastos viejos y FPI, analizado por dos diferentes métodos y en un modelo murino de envejecimiento. Además, genes que participan en la regulación de autofagia están desregulados en fibroblastos viejos. Por ejemplo, AKT, el cual está involucrado en la activación de mTOR, y BCL2L1, que tiene un papel secuestrado a BECN1: ambos están sobreexpresados en fibroblastos viejos con un efecto negativo en la regulación de autofagia (80,81). La sobreexpresión del gen para ATG4B en fibroblastos viejos, el cual está involucrado en la lipidación de LC3, puede representar un mecanismo compensatorio que previene la fibrosis. De hecho, un estudio realizado en nuestro laboratorio demuestra que ATG4B tiene un papel protector en la fibrosis experimental (82).

La hormesis se define como un estrés no letal que puede proteger a la célula incrementando su resistencia al comprometer a los mecanismos de protección (83,84). Por ejemplo, ha sido reportado que la restricción calórica incrementa la longevidad mediada por autofagia (85). Basándonos en estos estudios, se indujo el estrés por ayuno en un periodo corto y se encontró que fibroblastos jóvenes mostraron un incremento esperado en la actividad de autofagia así como una inhibición de la actividad de mTOR. En contraste, fibroblastos viejos y de FPI tienen una activación persistente de mTOR y una debilitada actividad de autofagia. Es importante destacar que la fosforilación (S235/236) de S6 fue reducida

significativamente en fibroblastos viejos después de una hora de ayuno y que después de 6 horas fue suprimida por completo, lo que sugiere un posible retraso en la inactivación de la vía de mTOR. Esto contrasta con las células derivadas de pacientes con FPI que mostraron una activación persistente de mTOR incluso después de 24 horas de ayuno, lo que puede contribuir a la resistencia a la apoptosis. Aunque no se detalló el mecanismo por el que mTORC1 induce la resistencia a la apoptosis, se sabe que esta vía participa en la supervivencia y se ha reportado en diferentes tipos de cáncer (72).

El pretratamiento de Rapamicina y de PP242 por separado o en combinación inducen un incremento de la autofagia en fibroblastos jóvenes, viejos y de FPI. Mientras que Rapamicina mostró un efecto modesto en la inhibición de la vía de mTOR, PP242 por separado y en combinación exhibió un efecto mayor. PP242 es un nuevo y específico inhibidor competitivo para el sitio de ATP de la cinasa mTOR, capaz de inhibir al complejo 1 y 2; su inhibición del complejo 1 es más eficiente que el de la Rapamicina (86). Se requieren más experimentos para determinar qué complejo específico de mTOR está involucrado.

La autofagia y la apoptosis son procesos interconectados en las respuestas de estrés. Normalmente, en condiciones de estrés estos procesos tienen una respuesta sincrónica con una etapa temprana de autofagia y una tardía de apoptosis (87,88). Siguiendo este contexto, la apoptosis fue determinada bajo condiciones prolongadas de ayuno. Destacadamente, fibroblastos de FPI mostraron una persistente activación de mTOR que les confirió una resistencia a apoptosis.

Estos resultados en conjunto sugieren que en fibroblastos de FPI ambos procesos, la disminución de autofagia y el incremento en la resistencia a apoptosis, pueden estar relacionados. Así, cuando la actividad de mTOR fue inhibida, la autofagia fue rescatada y de la misma forma la apoptosis. Más aún, una mayor inducción de autofagia fue acompañada de una fuerte inducción de apoptosis. Sin embargo, como la regulación de autofagia y la muerte celular están regulados por la vía de mTOR, no se descarta que estos procesos puedan no estar relacionados mecanísticamente.

Está ampliamente descrito que la autofagia y la apoptosis son procesos que se regulan a sí mismos, usualmente en una forma inhibitoria. Por lo tanto, la autofagia reduce la susceptibilidad de las células para iniciar apoptosis. No obstante, hay diferentes ejemplos en los cuales la inducción de autofagia facilita la activación de apoptosis (89). Los resultados obtenidos sugieren que esto ocurre en fibroblastos de FPI.

Se propone que la falla en la respuesta al ayuno puede ser clave en la fisiopatología de la FPI, que está caracterizada por la persistencia de fibroblastos activos organizados en focos. Estos focos representan sitios activos de fibrogénesis y son esenciales para la progresión de la fibrosis. Efectivamente, la disminución de la degradación intracelular por autofagia y la interrupción de apoptosis, ambos mediados por la activación aberrante de la vía de mTOR, son consistentes con el fenotipo de los fibroblastos de FPI. Apoyando la noción de que la disminución de la actividad de autofagia contribuye a la fibrosis, hemos reportado que el ratón con mutación nula para la MMP19, cuando se expone a la instilación de Bleomicina para inducir fibrosis, muestra un aumento de la respuesta fibrótica con la formación de focos de fibroblastos. Estos fibroblastos exhiben una baja expresión de la proteína ATG4C, otro miembro involucrado en las respuestas de estrés por autofagia que ha sido asociado con envejecimiento (23,90).

En conjunto, los resultados indican que la edad es un factor determinante en la respuesta de autofagia de fibroblastos pulmonares. Las evidencias apuntan que la deficiencia en las respuestas adaptativas al estrés, mediada por la actividad de mTOR, incrementa la vulnerabilidad a la fibrosis pulmonar.

Las perspectivas de este trabajo están encaminadas a entender desde niveles basales la acumulación de p62 y LC3II por falla en la degradación en el interior del lisosoma. Recientemente ha destacado el papel del lisosoma por ser capaz de regular la autofagia y a mTOR (91). Esta estrecha relación se debe a que la actividad de mTOR puede ser manipulada en la superficie del lisosoma (92).

Bibliografía

1. (2002) American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **165**, 277-304
2. Xaubet, A., Ancochea, J., Blanquer, R., Montero, C., Morell, F., Rodríguez Becerra, E., Sueiro, A., and Villena, V. (2003) Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas. *Archivos de Bronconeumología* **39**, 580-600
3. Gross, T. J., and Hunninghake, G. W. (2001) Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine* **345**, 517-525
4. King, T. E., Pardo, A., and Selman, M. (2011) Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet* **378**, 1949-1961
5. Selman, M., Carrillo, G., Estrada, A., Mejia, M., Becerril, C., Cisneros, J., Gaxiola, M., Pérez-Padilla, R., Navarro, C., Richards, T., Dauber, J., King, T. E., Jr., Pardo, A., and Kaminski, N. (2007) Accelerated Variant of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Clinical Behavior and Gene Expression Pattern. *PLoS ONE* **2**, e482
6. Taskar, V. S., and Coultas, D. B. (2006) Is Idiopathic Pulmonary Fibrosis an Environmental Disease? *Proceedings of the American Thoracic Society* **3**, 293-298
7. Fingerlin, T. E., Murphy, E., Zhang, W., Peljto, A. L., Brown, K. K., Steele, M. P., Loyd, J. E., Cosgrove, G. P., Lynch, D., Groshong, S., Collard, H. R., Wolters, P. J., Bradford, W. Z., Kossen, K., Seiwert, S. D., du Bois, R. M., Garcia, C. K., Devine, M. S., Gudmundsson, G., Isaksson, H. J., Kaminski, N., Zhang, Y., Gibson, K. F., Lancaster, L. H., Cogan, J. D., Mason, W. R., Maher, T. M., Molyneaux, P. L., Wells, A. U., Moffatt, M. F., Selman, M., Pardo, A., Kim, D. S., Crapo, J. D., Make, B. J., Regan, E. A., Walek, D. S., Daniel, J. J., Kamatani, Y., Zelenika, D., Smith, K., McKean, D., Pedersen, B. S., Talbert, J., Kidd, R. N., Markin, C. R., Beckman, K. B., Lathrop, M., Schwarz, M. I., and Schwartz, D. A. (2013) Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nat Genet* **45**, 613-620
8. Grutters, J. C., and du Bois, R. M. (2005) Genetics of fibrosing lung diseases. *European Respiratory Journal* **25**, 915-927
9. Armanios, M. Y., Chen, J. J.-L., Cogan, J. D., Alder, J. K., Ingersoll, R. G., Markin, C., Lawson, W. E., Xie, M., Vulto, I., Phillips, J. A., Lansdorp, P. M., Greider, C. W., and Loyd, J. E. (2007) Telomerase Mutations in Families with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine* **356**, 1317-1326
10. Armanios, M., de Cabo, R., Mannick, J., Partridge, L., van Deursen, J., and Villeda, S. (2015) Translational strategies in aging and age-related disease. *Nat Med* **21**, 1395-1399
11. (2000) Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **161**, 646-664
12. Dreisin, R. B., Schwarz, M. I., Theofilopoulos, A. N., and Stanford, R. E. (1978) Circulating Immune Complexes in the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *New England Journal of Medicine* **298**, 353-357
13. Huaux, F., Louahed, J., Hudspith, B., Meredith, C., Delos, M., Renauld, J.-C., and Lison, D. (1998) Role of Interleukin-10 in the Lung Response to Silica in Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **18**, 51-59

14. Selman, M., Thannickal, V. J., Pardo, A., Zisman, D. A., Martinez, F. J., and Lynch, J. P. (2004) Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Drugs* **64**, 405-430
15. Selman, M., and Pardo, A. (2002) Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respiratory Research* **3**, 3-3
16. Selman, M. s., King, J. T. E., and Pardo, A. (2001) Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy. *Annals of Internal Medicine* **134**, 136-151
17. Kuhn, C., Boldt, J., King, T. E., Crouch, E., Vartio, T., and McDonald, J. A. (1989) An Immunohistochemical Study of Architectural Remodeling and Connective Tissue Synthesis in Pulmonary Fibrosis. *American Review of Respiratory Disease* **140**, 1693-1703
18. Pardo, A., and Selman, M. (2002) Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **34**, 1534-1538
19. Selman, M., Pardo, A., and Kaminski, N. (2008) Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Aberrant Recapitulation of Developmental Programs? *PLoS Med* **5**, e62
20. Xu, Y. D., Hua, J., Mui, A., O'Connor, R., Grotendorst, G., and Khalil, N. (2003) Release of biologically active TGF- β 1 by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **285**, L527-L539
21. Pardo, A., Gibson, K., Cisneros, J., Richards, T. J., Yang, Y., Becerril, C., Yousem, S., Herrera, I., Ruiz, V., Selman, M., and Kaminski, N. (2005) Up-Regulation and Profibrotic Role of Osteopontin in Human Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS Med* **2**, e251
22. Pardo, A., Selman, M., and Kaminski, N. (2008) Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 1141-1155
23. Jara, P., Calyeca, J., Romero, Y., Placido, L., Yu, G., Kaminski, N., Maldonado, V., Cisneros, J., Selman, M., and Pardo, A. (2015) Matrix metalloproteinase (MMP)-19-deficient fibroblasts display a profibrotic phenotype. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **308**, L511-522
24. Herrera, I., Cisneros, J., Maldonado, M., Ramírez, R., Ortiz-Quintero, B., Anso, E., Chandel, N. S., Selman, M., and Pardo, A. (2013) Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 Induces Lung Alveolar Epithelial Cell Migration and Proliferation, Protects from Apoptosis, and Represses Mitochondrial Oxygen Consumption. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 25964-25975
25. Huang, S. K., and Horowitz, J. C. (2014) Outstaying their Welcome: The Persistent Myofibroblast in IPF. *Austin journal of pulmonary and respiratory medicine* **1**, 3
26. Andersson-Sjöland, A., de Alba, C. G., Nihlberg, K., Becerril, C., Ramírez, R., Pardo, A., Westergren-Thorsson, G., and Selman, M. (2008) Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 2129-2140
27. Zavadil, J., and Bottinger, E. P. (2005) TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24**, 5764-5774
28. Ramos, C., Montaña, M., García-Alvarez, J., Ruiz, V. c., Uhal, B. D., Selman, M., and Pardo, A. (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**, 591-598
29. Sanders, Y. Y., Pardo, A., Selman, M., Nuovo, G. J., Tollefsbol, T. O., Siegal, G. P., and Hagood, J. S. (2008) Thy-1 Promoter Hypermethylation: A Novel Epigenetic Pathogenic Mechanism in Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **39**, 610-618

30. Cisneros, J., Hagood, J., Checa, M., Ortiz-Quintero, B., Negreros, M., Herrera, I., Ramos, C., Pardo, A., and Selman, M. (2012) Hypermethylation-mediated silencing of p14 ARF in fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **303**, L295-L303
31. Huleihel, L., Ben-Yehudah, A., Milosevic, J., Yu, G., Pandit, K., Sakamoto, K., Yousef, H., LeJeune, M., Coon, T. A., Redinger, C. J., Chensny, L., Manor, E., Schatten, G., and Kaminski, N. (2014) Let-7d microRNA affects mesenchymal phenotypic properties of lung fibroblasts. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **306**, L534-L542
32. Cool, C. D., Groshong, S. D., Rai, P. R., Henson, P. M., Stewart, J. S., and Brown, K. K. (2006) Fibroblast foci are not discrete sites of lung injury or repair: the fibroblast reticulum. *Am J Respir Crit Care Med* **174**, 654-658
33. Pardo, A., and Selman, M. (2012) Role of matrix metalloproteases in idiopathic pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair* **5**, S9-S9
34. Nalysnyk, L., Cid-Ruzafa, J., Rotella, P., and Esser, D. (2012) Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *European Respiratory Review* **21**, 355-361
35. Selman, M., Rojas, M., Mora, A. L., and Pardo, A. (2010) Aging and Interstitial Lung Diseases: Unraveling an Old Forgotten Player in the Pathogenesis of Lung Fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* **31**, 607-617
36. Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013) The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194-1217
37. Kennedy, B. K., Berger, S. L., Brunet, A., Campisi, J., Cuervo, A. M., Epel, E. S., Franceschi, C., Lithgow, G. J., Morimoto, R. I., Pessin, J. E., Rando, T. A., Richardson, A., Schadt, E. E., Wyss-Coray, T., and Sierra, F. (2014) Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell* **159**, 709-713
38. Selman, M., and Pardo, A. (2014) Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. an integral model. *Am J Respir Crit Care Med* **189**, 1161-1172
39. Selman, M., Romero, Y., and Pardo, A. (2014) Aging and IPF: What Is the Link? in *Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Comprehensive Clinical Guide* (Meyer, C. K., and Nathan, D. S. eds.), Humana Press, Totowa, NJ. pp 259-279
40. Cuervo, A. M., Bergamini, E., Brunk, U. T., Dröge, W., Ffrench, M., and Terman, A. (2005) Autophagy and Aging: The Importance of Maintaining "Clean" Cells. *Autophagy* **1**, 131-140
41. Koga, H., Kaushik, S., and Cuervo, A. M. (2011) Protein Homeostasis and Aging: the importance of exquisite quality control. *Ageing research reviews* **10**, 205-215
42. Meléndez, A., Tallóczy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.-L., Hall, D. H., and Levine, B. (2003) Autophagy Genes Are Essential for Dauer Development and Life-Span Extension in *C. elegans*. *Science* **301**, 1387
43. Levine, B., and Kroemer, G. (2008) Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* **132**, 27-42
44. Schneider, J. L., and Cuervo, A. M. (2014) Liver autophagy: much more than just taking out the trash. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**, 187-200
45. Cuervo, A. M., and Dice, J. F. (2000) Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* **275**, 31505-31513
46. Glick, D., Barth, S., and Macleod, K. F. (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology* **221**, 3-12

47. He, C., and Klionsky, D. J. (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* **43**, 67-93
48. Laberge, R.-M., Sun, Y., Orjalo, A. V., Patil, C. K., Freund, A., Zhou, L., Curran, S. C., Davalos, A. R., Wilson-Edell, K. A., Liu, S., Limbad, C., Demaria, M., Li, P., Hubbard, G. B., Ikeno, Y., Javors, M., Desprez, P.-Y., Benz, C. C., Kapahi, P., Nelson, P. S., and Campisi, J. (2015) mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nature cell biology* **17**, 1049-1061
49. Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., and Levine, B. (2005) Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell* **122**, 927-939
50. Lipinski, M. M., Zheng, B., Lu, T., Yan, Z., Py, B. F., Ng, A., Xavier, R. J., Li, C., Yankner, B. A., Scherzer, C. R., and Yuan, J. (2010) Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 14164-14169
51. Myeku, N., and Figueiredo-Pereira, M. E. (2011) Dynamics of the Degradation of Ubiquitinated Proteins by Proteasomes and Autophagy: ASSOCIATION WITH SEQUESTOSOME 1/p62. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 22426-22440
52. Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., de Vries, R., Arias, E., Harris, S., Sulzer, D., and Cuervo, A. M. (2010) Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci* **13**, 567-576
53. Settembre, C., and Ballabio, A. (2014) Lysosome: regulator of lipid degradation pathways. *Trends in Cell Biology* **24**, 743-750
54. Kazufumi, M., Sonoko, N., Masanori, K., Takateru, I., and Akira, O. (1997) Expression of bcl-2 protein and APO-1 (Fas antigen) in the lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Microscopy Research and Technique* **38**, 480-487
55. Lappi-Blanco, E., Soini, Y., and Pääkkö, P. Apoptotic Activity is Increased in the Newly Formed Fibromyxoid Connective Tissue in Bronchiolitis Obliterans Organizing Pneumonia. *Lung* **177**, 367-376
56. Thannickal, V. J., Murthy, M., Balch, W. E., Chandel, N. S., Meiners, S., Eickelberg, O., Selman, M., Pardo, A., White, E. S., Levy, B. D., Busse, P. J., Tuder, R. M., Antony, V. B., Sznajder, J. I., and Budinger, G. R. (2015) Blue journal conference. Aging and susceptibility to lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* **191**, 261-269
57. Yen, W. L., and Klionsky, D. J. (2008) How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. *Physiology (Bethesda)* **23**, 248-262
58. Ding, W.-X., Ni, H.-M., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D. B., Ron, D., and Yin, X.-M. (2007) Linking of Autophagy to Ubiquitin-Proteasome System Is Important for the Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Viability. *The American Journal of Pathology* **171**, 513-524
59. Wong, E., and Cuervo, A. M. (2010) Integration of Clearance Mechanisms: The Proteasome and Autophagy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a006734
60. Bueno, M., Lai, Y. C., Romero, Y., Brands, J., St Croix, C. M., Kamga, C., Corey, C., Herazo-Maya, J. D., Sembrat, J., Lee, J. S., Duncan, S. R., Rojas, M., Shiva, S., Chu, C. T., and Mora, A. L. (2015) PINK1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes lung fibrosis. *J Clin Invest* **125**, 521-538
61. Araya, J., Kojima, J., Takasaka, N., Ito, S., Fujii, S., Hara, H., Yanagisawa, H., Kobayashi, K., Tsurushige, C., Kawaishi, M., Kamiya, N., Hirano, J., Odaka, M., Morikawa, T., Nishimura, S. L., Kawabata, Y., Hano, H., Nakayama, K., and Kuwano, K. (2013) Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **304**, L56-69

62. Nho, R. S., and Hergert, P. (2014) IPF fibroblasts are desensitized to type I collagen matrix-induced cell death by suppressing low autophagy via aberrant Akt/mTOR kinases. *PLoS One* **9**, e94616
63. Patel, A. S., Lin, L., Geyer, A., Haspel, J. A., An, C. H., Cao, J., Rosas, I. O., and Morse, D. (2012) Autophagy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS ONE* **7**, e41394
64. Ricci, A., Cherubini, E., Scozzi, D., Pietrangeli, V., Tabbi, L., Raffa, S., Leone, L., Visco, V., Torrisi, M. R., Bruno, P., Mancini, R., Ciliberto, G., Terzano, C., and Mariotta, S. (2013) Decreased expression of autophagic beclin 1 protein in idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts. *J Cell Physiol* **228**, 1516-1524
65. Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., and Kominami, E. (2005) Lysosomal Turnover, but Not a Cellular Level, of Endogenous LC3 is a Marker for Autophagy. *Autophagy* **1**, 84-91
66. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**, 132-141
67. Johnson, S. C., Rabinovitch, P. S., and Kaeberlein, M. (2013) mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature* **493**, 338-345
68. Liang, J., Shao, S. H., Xu, Z.-X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D. J., Gutterman, J. U., Walker, C. L., Slingerland, J. M., and Mills, G. B. (2007) The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* **9**, 218-224
69. Singh, P., Ravanan, P., and Talwar, P. (2016) Death Associated Protein Kinase 1 (DAPK1): A Regulator of Apoptosis and Autophagy. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **9**, 46
70. Stevens, C., Lin, Y., Harrison, B., Burch, L., Ridgway, R. A., Sansom, O., and Hupp, T. (2009) Peptide Combinatorial Libraries Identify TSC2 as a Death-associated Protein Kinase (DAPK) Death Domain-binding Protein and Reveal a Stimulatory Role for DAPK in mTORC1 Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 334-344
71. Galluzzi, L., Pietrocola, F., Levine, B., and Kroemer, G. (2014) Metabolic control of autophagy. *Cell* **159**, 1263-1276
72. Laplante, M., and Sabatini, D. M. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274-293
73. Lamming, D. W., Ye, L., Sabatini, D. M., and Baur, J. A. (2013) Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. *J Clin Invest* **123**, 980-989
74. Zhou, J., Tan, S.-H., Nicolas, V., Bauvy, C., Yang, N.-D., Zhang, J., Xue, Y., Codogno, P., and Shen, H.-M. (2013) Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion. *Cell Research* **23**, 508-523
75. He, L. Q., Lu, J. H., and Yue, Z. Y. (2013) Autophagy in ageing and ageing-associated diseases. *Acta Pharmacol Sin* **34**, 605-611
76. Rubinsztein, D. C., Codogno, P., and Levine, B. (2012) Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 709-730
77. Cuervo, A. M. (2008) Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends in genetics : TIG* **24**, 604-612
78. Gribbin, J., Hubbard, R. B., Le Jeune, I., Smith, C. J. P., West, J., and Tata, L. J. (2006) Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. *Thorax* **61**, 980-985
79. Raghu, G., Collard, H. R., Egan, J. J., Martinez, F. J., Behr, J., Brown, K. K., Colby, T. V., Cordier, J. F., Flaherty, K. R., Lasky, J. A., Lynch, D. A., Ryu, J. H., Swigris, J. J., Wells, A. U., Ancochea, J., Bouros, D., Carvalho, C., Costabel, U., Ebina, M., Hansell, D. M., Johkoh, T., Kim, D. S., King, T. E., Jr., Kondoh, Y., Myers, J., Muller, N. L., Nicholson, A. G., Richeldi, L.,

- Selman, M., Dudden, R. F., Griss, B. S., Protzko, S. L., Schunemann, H. J., and Fibrosis, A. E. J. A. C. o. I. P. (2011) An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* **183**, 788-824
80. Shaw, R. J., and Cantley, L. C. (2006) Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**, 424-430
 81. Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.-C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., Hickman, J. A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007) Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO Journal* **26**, 2527-2539
 82. Cabrera, S., Maciel, M., Herrera, I., Nava, T., Vergara, F., Gaxiola, M., Lopez-Otin, C., Selman, M., and Pardo, A. (2015) Essential role for the ATG4B protease and autophagy in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Autophagy* **11**, 670-684
 83. Matus, S., Castillo, K., and Hetz, C. (2012) Hormesis: Protecting neurons against cellular stress in Parkinson disease. *Autophagy* **8**, 997-1001
 84. Martins, I., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2011) Hormesis, cell death and aging. *Aging (Albany NY)* **3**, 821-828
 85. Kroemer, G. (2015) Autophagy: a druggable process that is deregulated in aging and human disease. *J Clin Invest* **125**, 1-4
 86. Feldman, M. E., Apsel, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z. A., Ruggiero, D., and Shokat, K. M. (2009) Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biology* **7**, e1000038
 87. Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 741-752
 88. Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., and Kroemer, G. (2014) Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 81-94
 89. Mattiolo, P., Yuste, V. J., Boix, J., and Ribas, J. (2015) Autophagy exacerbates caspase-dependent apoptotic cell death after short times of starvation. *Biochemical Pharmacology* **98**, 573-586
 90. Fernandez, A. F., and Lopez-Otin, C. (2015) The functional and pathologic relevance of autophagy proteases. *J Clin Invest* **125**, 33-41
 91. Settembre, C., and Ballabio, A. (2014) Cell metabolism: Autophagy transcribed. *Nature* **516**, 40-41
 92. Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D. L., and Ballabio, A. (2013) Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 283-296

Anexos

Publicación derivada de la tesis

- mTORC1 activation decreases autophagy in aging and idiopathic pulmonary fibrosis and contribute to apoptosis resistance in IPF fibroblasts
Yair Romero, Marta Bueno, Remedios Ramirez, Diana Álvarez, John C. Sembrat, Elena A. Goncharova, Mauricio Rojas, Moisés Selman, Ana L. Mora & Annie Pardo
Aging Cell 2016

Publicaciones adicionales generadas durante los estudios de doctorado

- Aging and IPF: What Is the Link?
Selman M, Romero Y, Pardo A.
Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Comprehensive Clinical Guide. Respiratory Medicine Volume (9) 2014. Pages 259-279 Editors: Keith C. Meyer, Steven D. Nathan
- Matrix metalloproteinase (MMP)-19-deficient fibroblasts display a profibrotic phenotype.
Jara P, Calyeca J, Romero Y, Plácido L, Yu G, Kaminski N, Maldonado V, Cisneros J, Selman M, Pardo A.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2015 Mar 15;308(6):L511-22.
- PINK1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes lung fibrosis.
Bueno M, Lai YC, Romero Y, Brands J, St Croix CM, Kamga C, Corey C, Herazo-Maya JD, Sembrat J, Lee JS, Duncan SR, Rojas M, Shiva S, Chu CT, Mora AL.
J Clin Invest. 2015 Feb;125(2):521-38.
- Reviving Lonidamine and 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine to Be Used in Combination for Metabolic Cancer Therapy
Cervantes-Madrid D, Romero Y and Dueñas-González A. R
BioMed Research International, vol. 2015, Article ID 690492, 13 pages, 2015.

mTORC1 activation decreases autophagy in aging and idiopathic pulmonary fibrosis and contributes to apoptosis resistance in IPF fibroblasts

Yair Romero,^{1,†} Marta Bueno,^{2,3} Remedios Ramirez,¹ Diana Álvarez,² John C. Sembrat,² Elena A. Goncharova,^{2,3} Mauricio Rojas,² Moisés Selman,⁴ Ana L. Mora^{2,3,*} and Annie Pardo^{1,*}

¹Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Av Universidad 3000, México, DF CP 04510, México

²Division of Pulmonary, Allergy and Critical Care Medicine, University of Pittsburgh, 200 Lothrop St, Pittsburgh, PA 15261, USA

³Vascular Medicine Institute, Pulmonary Division, University of Pittsburgh, 200 Lothrop St, Pittsburgh, PA 15261, USA

⁴Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, México, Tlalpan 4502, DF CP 14080, México

Summary

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive, and usually lethal disease associated with aging. However, the molecular mechanisms of the aging process that contribute to the pathogenesis of IPF have not been elucidated. IPF is characterized by abundant foci of highly active fibroblasts and myofibroblasts resistant to apoptosis. Remarkably, the role of aging in the autophagy activity of lung fibroblasts and its relationship with apoptosis, as adaptive responses, has not been evaluated previously in this disease. In the present study, we analyzed the dynamics of autophagy in primary lung fibroblasts from IPF compared to young and age-matched normal lung fibroblasts. Our results showed that aging contributes for a lower induction of autophagy on basal conditions and under starvation which is mediated by mTOR pathway activation. Treatment with rapamycin and PP242, that target the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, modified starvation-induced autophagy and apoptosis in IPF fibroblasts. Interestingly, we found a persistent activation of this pathway under starvation that contributes to the apoptosis resistance in IPF fibroblasts. These findings indicate that aging affects adaptive responses to stress decreasing autophagy through activation of mTORC1 in lung fibroblasts. The activation of this pathway also contributes to the resistance to cell death in IPF lung fibroblasts.

Key words: aging; apoptosis; autophagy; idiopathic pulmonary fibrosis; lung fibroblast; mTOR pathway.

Correspondence

Annie Pardo, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, DF, Mexico CP 04510, USA. Tel.: 5255 56224824; fax: 5255 56224910; e-mail: apardos@unam.mx

*These authors shared senior authorship.

†This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program Doctorado en Ciencias Biomédicas of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Yair Romero acknowledges the scholarship and financial support provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT), and UNAM.

Accepted for publication 13 July 2016

Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a highly lethal lung disease of unknown etiology characterized by activation of alveolar epithelial cells, fibroblast/myofibroblast proliferation, and activation with exacerbated deposit of extracellular matrix (ECM) resulting in the gradual destruction of the lung architecture (Selman *et al.*, 2001; King *et al.*, 2011). In this sequence of pathological events, fibroblasts/myofibroblasts are usually organized in a distinctive foci and it has been suggested to be resistant to apoptosis (Kazufumi *et al.*, 1997).

IPF is a multifactorial disease that likely results from complex interactions between genetic and environmental factors (Taskar & Coultas, 2006) (Fingerlin *et al.*, 2013). The most important environmental risk factors are cigarette smoking and exposure to metal and wood dust, while several gene variants associated with host defense, cell–cell adhesion, and DNA repair contribute to IPF risk. Importantly, IPF occurs in middle-aged and elderly adults and the incidence and prevalence increase markedly with each decade of life; actually, two-thirds of patients with sporadic IPF are older than 60 years at the time of presentation with a mean age of 66 years at the time of diagnosis (King *et al.*, 2011) (Raghu *et al.*, 2006). Likewise, patients with familial IPF display autosomal dominant inheritance with age-dependent penetrance, and abnormally short telomeres have been observed in both familial IPF with telomerase mutations and sporadic IPF (Armanios & Blackburn, 2012). Importantly, telomerase deficiency and telomere attrition trigger telomere dysfunction-mediated alveolar stem cell replicative senescence, thereby driving pulmonary premature aging, reducing the regenerative capacity, and increasing myofibroblast activity and fibrosis (Chen *et al.*, 2015). Furthermore, senescence of alveolar epithelial cells and fibroblasts has been found in this disease strengthening the mechanistic links between telomere shortening, cell senescence, and IPF (Minagawa *et al.*, 2011; Hecker *et al.*, 2014).

Although age is a determinant factor of the pathogenesis of IPF, the molecular mechanisms of the aging process that influence the susceptibility to develop this disease and its clinical progression are still uncertain (Selman *et al.*, 2010; Selman & Pardo, 2014).

Aging is characterized by increasing the risk of disease and death. In this process, there is a progressive reduction of biological functions and less resistance to multiple stressors. In this context, a pivotal anti-aging pathway is autophagy (Lopez-Otin *et al.*, 2013). Macroautophagy (referred as autophagy) is a highly conserved process that participates in maintaining the energy resources and quality control by degradation of unnecessary elements. As an adaptive response, autophagy is able to relief stressful conditions as starvation, hypoxia, endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, etc. (He & Klionsky, 2009). Among the sensors that regulate autophagy, the serine/threonine protein kinase mammalian target of rapamycin (mTOR) plays a central role in promoting growth in the presence of nutrients and maintaining low levels of autophagy. But, when cells are under starvation condition, mTORC1 is switched off and autophagy is activated (Laplante & Sabatini, 2012). Importantly, it has been recently shown that mTOR pathway drives the senescence-



associated secretory phenotype which is suppressed by rapamycin (Laberge *et al.*, 2015).

There are few reports that evaluate the relationship between autophagy and IPF and most of them agree that autophagy activity is reduced in IPF lungs, suggesting that this decrease may contribute to the activation of pro-fibrotic responses (Patel *et al.*, 2012; Araya *et al.*, 2013; Ricci *et al.*, 2013; Nho & Hergert, 2014). However, these studies lack the corresponding age-matched controls and shelve the dynamic connection between autophagy and apoptosis in the stress responses. In the present study, we explored the effect of aging in autophagy activity and its implication in the pathogenesis of IPF.

Results

Aging decreases autophagy activity in fibroblasts from patients with IPF

To evaluate the effect of aging on autophagy, normal human lung fibroblasts were sorted out among 'young' normal donors [mean \pm SD 29 \pm 11 years ($n = 6$)] and 'old' normal donors [67 \pm 7 years ($n = 6$)].

IPF fibroblasts were obtained from 6 patients with a mean age of 66 \pm 4 years (Table S1).

Autophagy flux involves a dynamic autophagosome formation and degradation that can be estimated by monitoring the protein levels of LC3 in the presence and absence of lysosomal inhibitors (Tanida *et al.*, 2005). LC3 has two forms in the cell: LC3-I in the cytosol and LC3-II which is associated specifically with the autophagosome membrane. We cultured the fibroblasts from the three groups in the presence of the lysosomal inhibitor, chloroquine (CQ), to determine the level of autophagy through the amount of LC3-II. Figure 1A exemplifies a representative Western blot of one young, one old, and one IPF cell lines. Figure 1B represents the densitometric analysis of three different cell lines for each condition showing the steady-state LC3-II levels and the LC3-II flux. A significantly higher LC3-II flux was observed in normal young human lung fibroblasts compared to normal old and IPF fibroblasts after 24 h of CQ treatment ($P < 0.05$).

Another marker of autophagy is p62, an autophagic cargo involved in the recognition of aggregated proteins. No significant differences were observed in the p62 steady-state levels or in p62 flux (Fig. 1A,B).

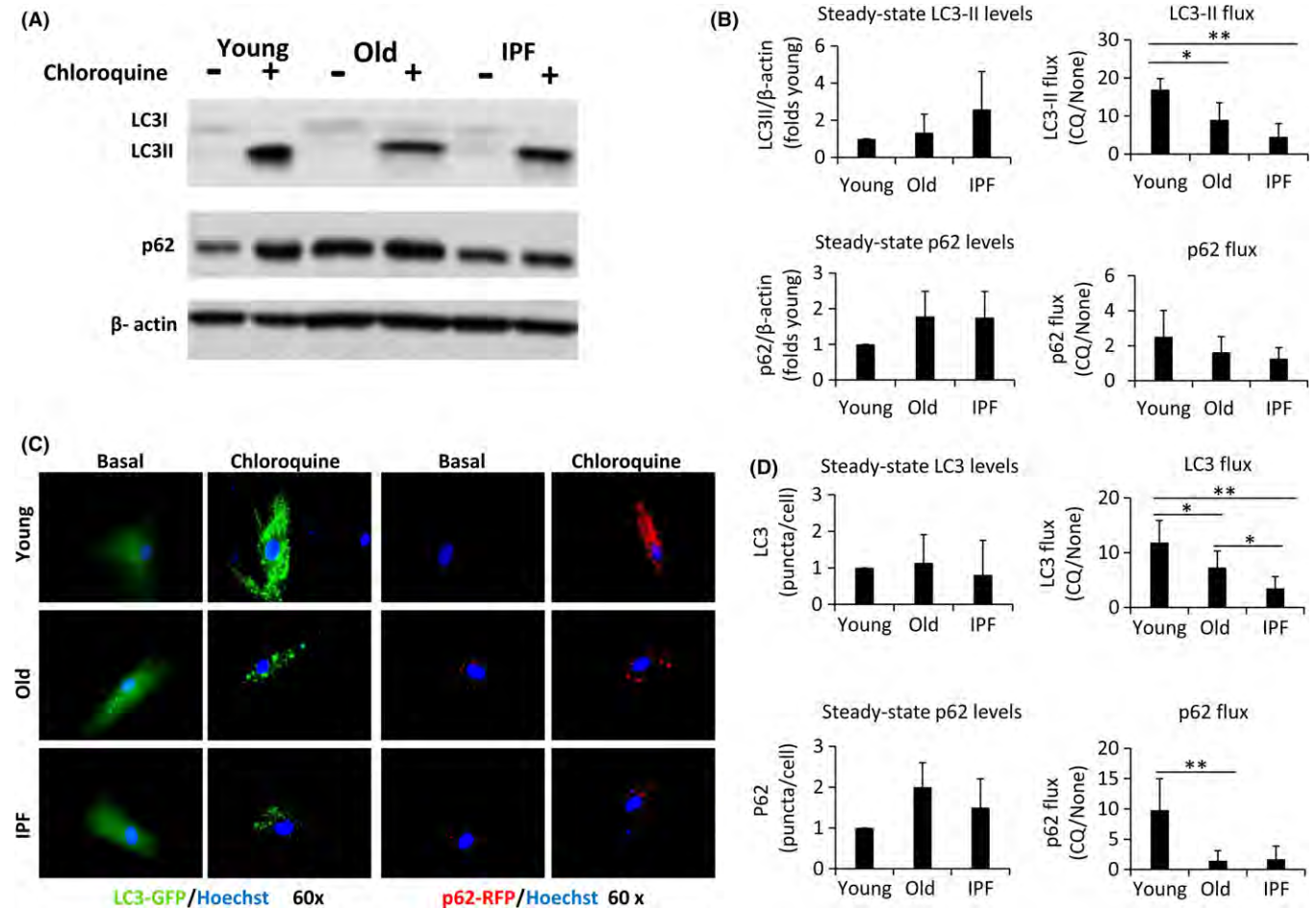


Fig. 1 Aging decreases autophagy flux in IPF fibroblasts. (A) Western blots of LC3 and p62 after 24 h with/without chloroquine treatment (20 μ M) in human fibroblasts derived from young, old, and IPF lungs. β -actin was used as a loading control. (B) Densitometric analysis representing LC3-II and p62 steady-state and flux levels. Each bar represents the mean \pm SD of 3 different lines of lung fibroblasts. (C) Fluorescence microscopic images show LC3 and p62 distribution. Baculovirus infection of LC3-GFP and p62-RFP in human fibroblasts from young, old, and IPF lungs under basal conditions and after 24 h with chloroquine treatment (20 μ M). Hoechst was added to nuclei stain. LC3 and p62 puncta were quantified in D; each bar represents the mean \pm SD of 3 different cell lines for each group ($n > 30$). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ two-tailed Student's *t*-test.

Table 1 Changes in the expression of autophagy-related genes with aging*

Gene symbol	Fold regulation	p value
AKT1	4.2	0.045
BCL2L1	2.6	0.023
ATG4B	2.5	0.025
HSP90AA1	2.4	0.019
ATG12	2.3	0.020
CASP3	-2.1	0.026

*Complete list in Table S2.

Autophagy was further examined using GFP-LC3 and RFP-p62 expressed in a baculovirus expression system. Recombinant proteins expressed in the three different groups of primary human lung fibroblasts showed similar levels of autophagosomes at steady state. After 24 h of CQ treatment, young fibroblasts displayed significantly higher number of autophagosomes compared to old fibroblasts (Fig. 1C, D). Fibroblasts from patients with IPF showed significantly less LC3-II flux compared to those of normal controls of the same age as shown for levels of LC3 puncta per cell (Fig. 1C and D). p62 flux measured by this method was significantly lower in old and IPF fibroblasts compared with young fibroblasts although no differences were detected between them. In Fig. S1, we show that fibroblasts from IPF seem to have an incomplete colocalization of p62 with LC3, suggesting that p62 is accumulating out of the autophagosome which might explain the lack of difference in total p62 among old and IPF fibroblasts. However, no quantification was performed.

In addition, expression profile of autophagy-related genes through Profiler PCR Array Human Autophagy revealed that lung fibroblasts from 'old' normal donors have upregulated genes with an inhibitory effect on the autophagy pathway compared with young fibroblasts such as AKT, BCL2L1 (Morselli *et al.*, 2009) (Table 1; the complete list of genes are shown in Table S2). Therefore, in human fibroblasts, aging is related to defective autophagy. The inhibitory effect of aging in autophagy was confirmed in old mice (24 months) lung fibroblasts compared to younger (2 months) counterparts (Fig. S2).

Aging decreases starvation-induced autophagy through mTOR activity in fibroblasts from patients with IPF

Starvation is the most potent inducer of autophagy (Galluzzi *et al.*, 2014), and accordingly, we used starvation to analyze LC3 turnover. Initially, we examined starvation at 0, 30, and 60 min with and without inhibitors of proteases. We choose for our experiments 1-h starvation. Figure 2A illustrates a representative immunoblot of basal and starvation conditions with inhibitors. The basal and starvation levels without inhibitors (data not shown) were considered for the graphical representation (Fig. 2B). Under these conditions, LC3-II flux was significantly higher in young fibroblasts, compared with old and IPF fibroblasts.

Autophagy induction follows an inverse correlation with the activity of mTOR complex 1. mTOR directly prevents autophagy activation through phosphorylation of Ser 758 in ULK1 (Kim *et al.*, 2011). This phosphorylation was evaluated to explore the mechanism by which fibroblasts derived from old individuals and IPF patients show decreased induction of autophagy. At baseline, although phosphorylation is present in young, old, and IPF fibroblasts, after 1 h of starvation, this phosphorylation was inhibited in young fibroblasts, while it was maintained in old and IPF fibroblasts (Fig. 2C–D). These findings suggest

that in these fibroblasts, mTOR activation persists as also demonstrated by phosphorylation of (T389) S6K1 (Fig. 2C–E). The deficiency in mTOR inhibition might be responsible for the decrease in autophagy flux observed in old and IPF fibroblasts, and corresponds to a failure of adaptation to stress, as it has been observed in other diseases associated with aging (Johnson *et al.*, 2013). The phosphorylation of (S235/236) S6 was reduced in young but also in the group of old fibroblasts, suggesting a possible delay in the inactivation of mTOR pathway. No changes were observed in IPF fibroblasts (Fig. 2C–F).

Fibroblasts from patients with IPF show a persistent activation of mTOR, which contributes to apoptosis resistance

Next, we investigated the effect of increased exposure time of starvation on mTOR pathway in old and IPF fibroblasts. As previously shown, at 1 h of starvation mTOR activity determined by phosphorylation of S6 was abolished in young fibroblasts. At 6 h under these conditions, complete abrogation of mTOR activity was observed in old normal fibroblasts, but not in IPF-derived cells, which exhibited a persistent activation even at 24 h of starvation (Fig. 3A–B). mTOR is a key regulator in the adaptation to nutrients stress and persistent mTOR activity under nutrient deprivation can mediate changes in cell survival. Microscopic observation of fibroblasts suggested that prolonged exposure to starvation induces cell death in young and old normal fibroblasts, but not in IPF fibroblasts (Fig. 3C). The decreased apoptotic response in IPF fibroblasts was confirmed by TUNEL assay and activity of caspases 3/7 after starvation. As illustrated in Fig. 4A,B, young and old fibroblasts showed abundant apoptotic positive signal, whereas the signal was almost undetectable in IPF fibroblasts. Paralleling these results, the activity of caspase increased in a time-dependent manner in young and old but not in IPF fibroblasts (Fig. 4C).

mTOR inhibitors modify starvation-induced autophagy in old and IPF fibroblasts

mTOR complexes 1 and 2 regulate the starvation-stress response. mTORC1 activation increases protein translation and other anabolic processes with direct inhibition of autophagy (Galluzzi *et al.*, 2014). mTORC2 regulates Akt, SGK1, and PKC α (Laplante & Sabatini, 2012). Evidence indicates that there is a feedback between both complexes. Rapamycin is an allosteric inhibitor of mTORC1 and PP242 is a new drug with potent and selective inhibitory effect on ATP domain of mTOR that suppresses its activity in both complexes (Lamming *et al.*, 2013).

The effect of both inhibitors was analyzed through the phosphorylation of S6K1 and S6 in IPF fibroblasts. When treated with rapamycin for 24 h, IPF fibroblasts displayed a modest reduction of mTOR activity, while PP242 showed a marked effect as demonstrated by the strong decrease in phosphorylation of S6K1 and S6 (Fig. S3).

Treatment with the pharmacological inhibitors on the autophagy activity corroborated that under starvation, fibroblasts from young lungs exhibited an increase in the LC3-II/ β -actin and in LC3-II/LC3-I ratios. Similar results were observed with the pretreatment of rapamycin, PP242, and mainly with the combination of both (Fig. 5A,B). The noticeable decrease in LC3-II/ β -actin and LC3-II/LC3-I ratios with the combination of inhibitors under starvation may be explained by the reactivation of mTORC activity as shown in Fig. S4. Old fibroblasts, as previously demonstrated, do not increase autophagy under starvation; however, with the pretreatment of the inhibitors, they performed a similar response as young fibroblasts (Fig. 5C–D). In the case of IPF

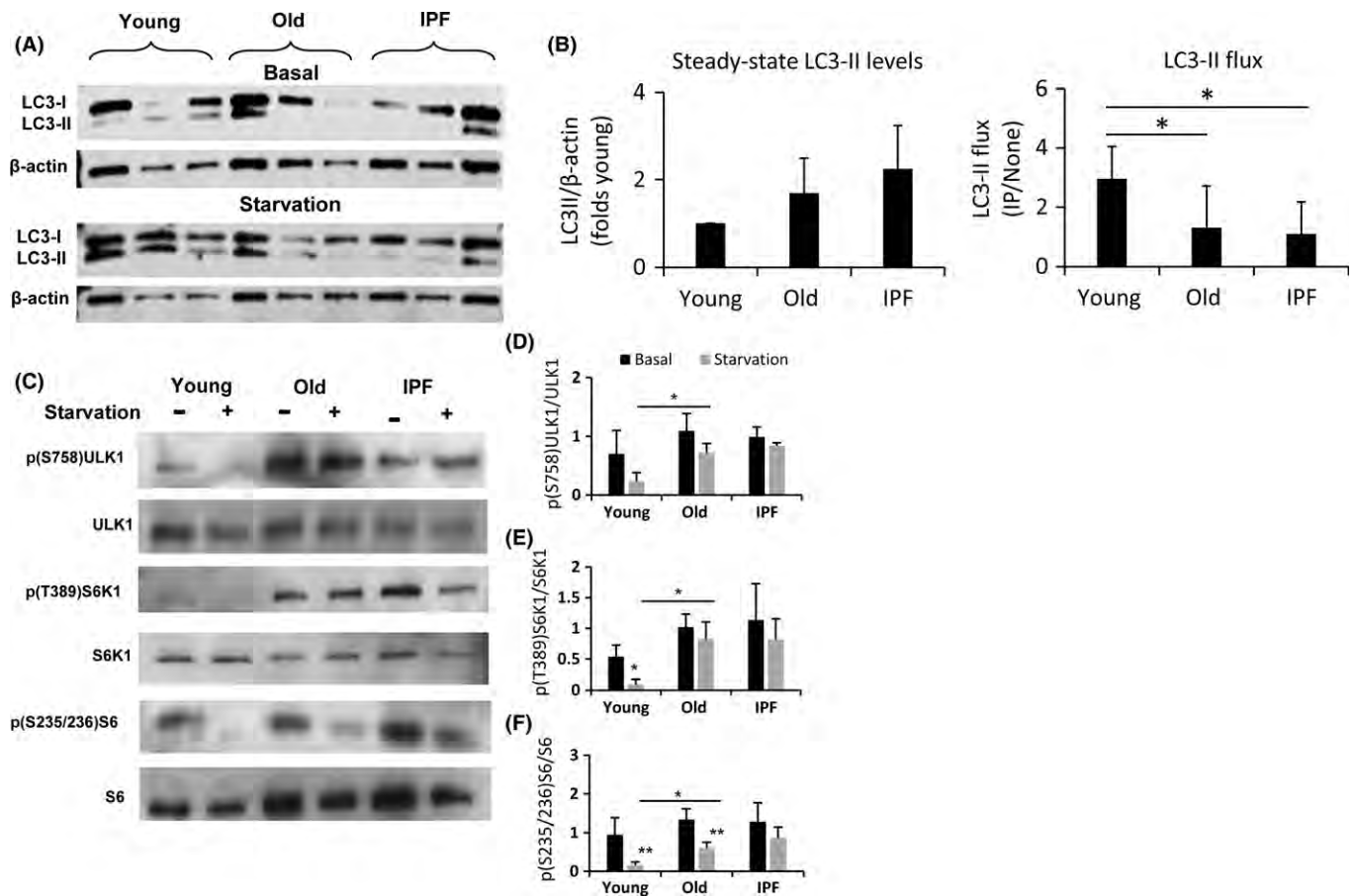


Fig. 2 Aging prevents autophagy induction mediated by mTOR pathway. Autophagy and mTOR pathway activity were examined in human fibroblasts derived from young, old, and IPF lungs. (A): Representative Western blot of LC3 and β -actin as loading control, under basal conditions and after 1 h of starvation with inhibitors of proteases (IP). (B) Densitometric analysis showing steady-state levels and LC3-II flux. Each bar represents the mean \pm SD of 6 different lines of lung fibroblasts. * $P < 0.05$ two-tailed Student's *t*-test. The activity of mTOR complex 1 was examined by the phosphorylation of ULK1, S6K1, and S6. (C) Immunoblots of p(S758)ULK1, ULK1, p(T389)S6K1, S6K1, p(S235/236)S6, S6 at baseline and after 1 h of starvation. (D, E, F) Densitometric analysis of the phosphorylation ratio of ULK1, S6K1, and S6 shown in C. Each bar represents the mean \pm SD of 3 different cell lines for each group in D and E and 6 different cell lines for each group in F. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ two-tailed Student's *t*-test.

fibroblasts, which are unable to increase autophagy under starvation, pretreatment with the inhibitors mainly with the combination of both and starvation resulted in an increase in LC3-II/ β -actin and in LC3-II/LC3-I ratios (Fig. 5E–F). By contrast to young and old fibroblasts, mTORC activity in IPF fibroblasts was not reactivated with the combination of rapamycin plus PP242 under starvation (Fig. S4).

mTOR pathway inhibitors modify the apoptotic response in IPF fibroblasts

Next, we evaluated whether the decreased apoptotic response observed in IPF fibroblasts as shown in Fig. 4 was affected by mTOR inhibitors. After 6-h starvation, the inhibition of mTOR with PP242 alone or in combination with rapamycin induced an increase in the number of cells showing positive apoptotic signal by TUNEL (Fig. 6A), while on basal nonstarving conditions, no differences were observed (Fig. 6B). Likewise, a significant increase in caspase 3/7 activity in IPF fibroblasts was detected after 6 h of starvation, mainly with the combination of PP242 and rapamycin (Fig. 6C), whereas no differences were noticed under basal conditions (Fig. 6D). Rapamycin alone induced a marginal but nonsignificant increase in these caspases.

Discussion

Aging is not a disease itself, but the biological processes that change with age have a crucial role in numerous chronic degenerative diseases (Kennedy *et al.*, 2014). One common feature in age-related diseases such as cancer, cardiovascular disorders, and neurodegenerative diseases is autophagy dysfunction (Rubinsztein *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013). Moreover, there is growing evidence supporting that autophagy deficiency recapitulates aging phenotype (Cuervo *et al.*, 2005; Rubinsztein *et al.*, 2011).

In lung diseases, aging increases morbidity and mortality of chronic obstructive pulmonary disease, pneumonias, and IPF, but the involved mechanisms are not fully elucidated (Ryter & Choi, 2010; Selman & Pardo, 2014; Thannickal *et al.*, 2015). Along this line, IPF is the prototype of age-associated disease since usually occurs in individuals older than 50 years old, and increases remarkably with aging (Gribbin *et al.*, 2006; Raghu *et al.*, 2011). Actually, aging is the higher demographic risk factor for IPF. Several mechanisms seem to be implicated, but all of them have been revealed in alveolar epithelial cells including abnormal shortening of telomeres, genomic instability, and senescence (Selman & Pardo, 2014). More recently, we have

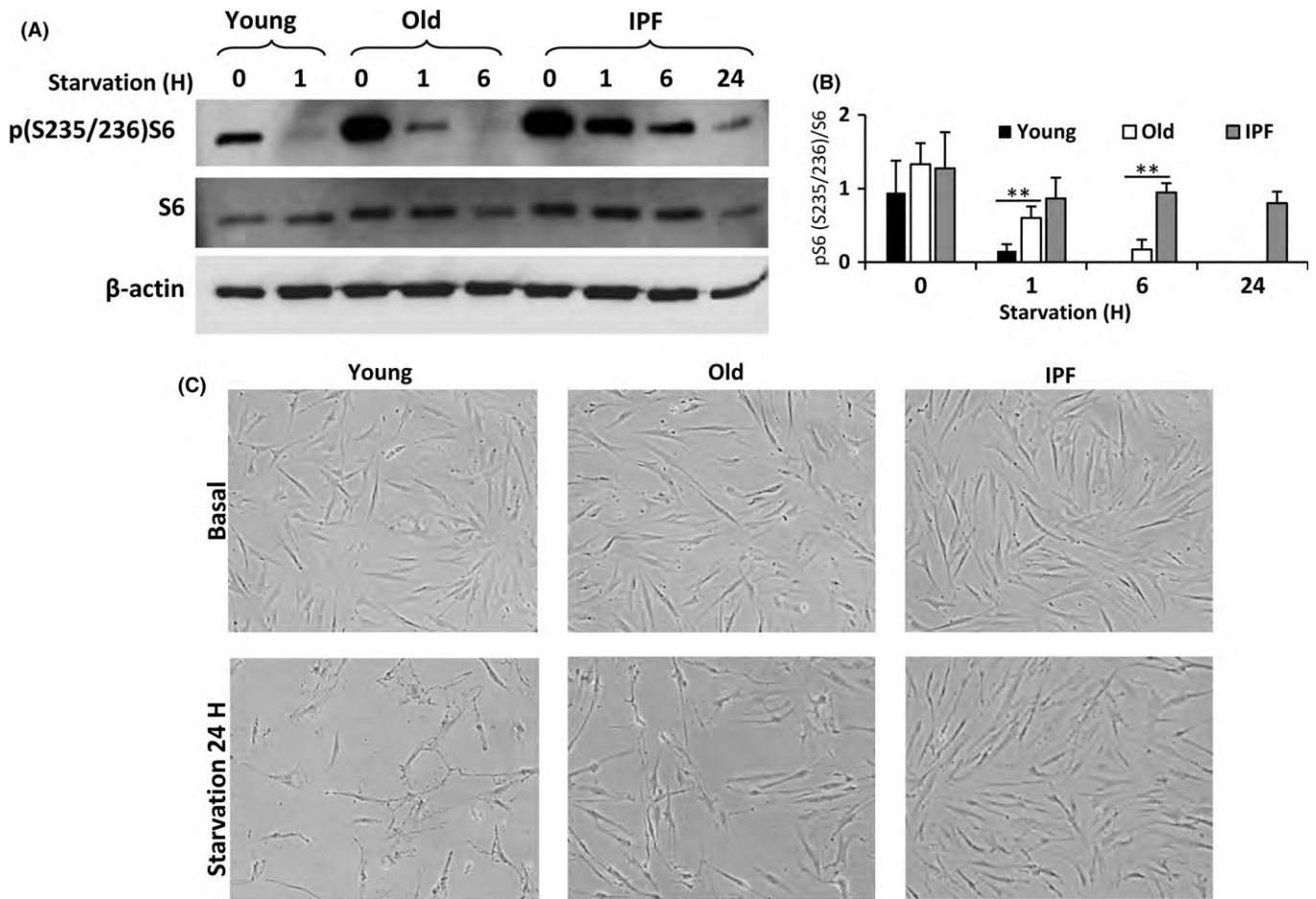


Fig. 3 IPF fibroblasts exhibit a persistent activation of mTOR. mTOR pathway activity was examined in normal lung fibroblasts sorted by age and IPF fibroblasts after starvation. (A) Representative Western blot of p(S235/236)S6, S6, and β-actin as a loading control in fibroblasts exposed for different hours of HBSS media to induce starvation. (B) Densitometric analysis of the immunoblot showing the phosphorylation of S6. Each bar represents the mean ± SD of 6 different cell lines for each group in the time 0 and 1 h; and 3 different cell lines for each group in the time 6 and 24 h. ** $P < 0.01$ two-tailed Student's *t*-test. (C) Representative micrographs of cells from young, old, and IPF fibroblasts at baseline and after 24 of starvation.

shown that mitochondrial dysfunction associated with PINK1 deficiency in alveolar epithelial cells with age and ER stress promotes fibrosis (Bueno *et al.*, 2015). However, the effect of aging in IPF fibroblasts remains unclear.

In this context, the present study was designed to examine the putative role of aging in autophagy on normal lung fibroblasts as well as on IPF fibroblasts. We found that aging inhibits autophagy of human and mouse lung normal fibroblasts. However, we observed few differences between old and IPF fibroblasts exemplified by the detection of LC3 puncta per cell. Compared with old normal lung fibroblasts, IPF fibroblasts showed less amount of autophagosomes with a possible improper p62 localization. Under stress conditions, mTOR pathway in old fibroblast stays active for a longer period which was even more accentuated in IPF fibroblasts. This persistent activity in IPF cells match with an increased resistance to apoptosis.

Autophagy flux is critical to maintain cell homeostasis. Our results show that aged normal lung and IPF fibroblasts have a dysfunction in autophagy activity. On basal conditions, some cases of old and IPF fibroblasts have an interrupted autophagy flux. When accumulation is induced, there is less activity of autophagy in old and IPF fibroblasts, analyzed by two different methods and confirmed in lung fibroblasts

from aging mice. In addition, genes that participate in the regulation of autophagy are dysregulated in old fibroblasts. For example, AKT, which is involved in activation of mTOR, and BCL2L1 that sequesters beclin 1, are overexpressed in old fibroblasts with a negative regulation of autophagy (Shaw & Cantley, 2006; Maiuri *et al.*, 2007). The upregulation of ATG4b in old fibroblasts, which is involved in lipidation of LC3, may represent a 'compensatory' mechanism that prevents fibrosis. Actually, a recent study performed in our laboratory demonstrates that ATG4b has a protective role in experimental fibrosis (Cabrera *et al.*, 2015).

Hormesis is a beneficial approach because it engages in the protective mechanisms to overcome stress (Matus *et al.*, 2012). For instance, caloric restriction has been reported that increases longevity mediated by autophagy (Kroemer, 2015). Based on these studies, we induced stress by a short period of starvation. We found that young fibroblasts show the expected increase in autophagy activity and inhibition of mTOR activity, while old and IPF fibroblasts showed persistent activation of mTOR and amelioration of autophagy. Interestingly, the phosphorylation of (S235/236) S6 was reduced in old fibroblasts, from the first hour of starvation and abolished at 6 h, suggesting a possible delay in the inactivation of mTOR pathway. In

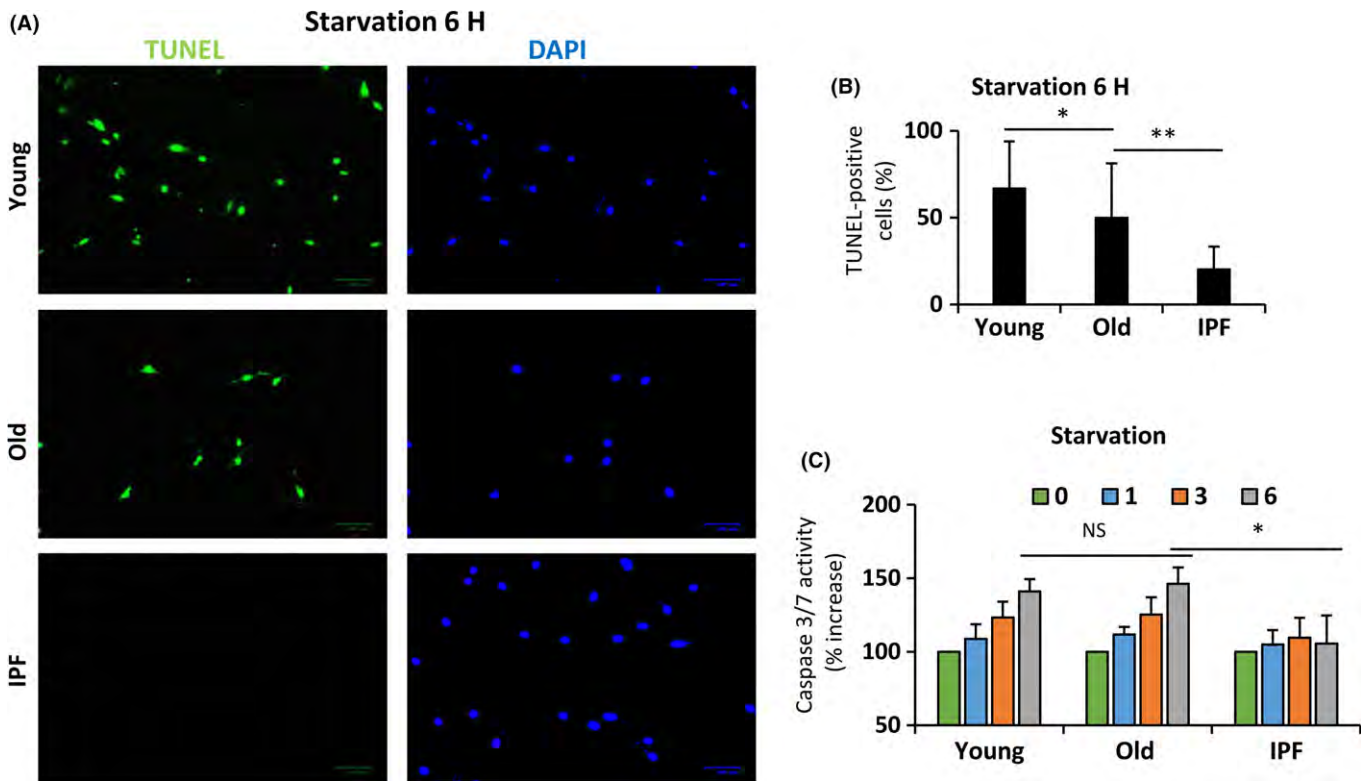


Fig. 4 IPF fibroblasts show diminished induction of apoptosis after starvation. Normal human lung fibroblasts sorted by age and IPF fibroblasts were exposed to HBSS media to evaluate the induction of apoptosis. (A) Detection of apoptotic cells using TUNEL stain and DAPI for nuclear staining in fibroblasts exposed to 6 h of starvation. (B) Percentage of TUNEL-positive cells adjusted by the total number of cells quantified by DAPI. Each bar represents the mean \pm SD of 3 different cell lines in each group ($n > 150$ cells per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ two-tailed Student's *t*-test. (C) Activity of caspases 3/7 under basal conditions (0) and after 1, 3, and 6 h of starvation. Data are expressed as mean \pm SD of 3 different cell lines from two independent experiments. * $P < 0.05$, two-tailed Student's *t*-test.

sharp contrast, IPF-derived cells exhibited a persistent activation of mTOR even at 24 h of starvation which may contribute to apoptosis resistance.

Pretreatment with rapamycin, PP242, or in combination resulted in an increase in autophagy in young, old, and IPF fibroblasts. While rapamycin had a modest inhibition of mTOR pathway, PP242 or the combination of both inhibitors showed a stronger effect. PP242 is a novel and specific ATP competitive inhibitor of mTOR kinase that is a dual inhibitor of TORC1 and TORC2 and inhibits more efficiently TORC1 than rapamycin (Feldman *et al.*, 2009). Further studies are necessary to investigate the specific mTOR complex involved.

Autophagy and apoptosis are processes interconnected in stress responses. Normally under stress, these processes have a synchronous response with an early autophagic stage and a late apoptotic stage (Marino *et al.*, 2014). Following this approach, apoptosis was determined under prolonged starvation. Remarkably, IPF fibroblasts displayed persistent activation of mTOR pathway that confers them resistance to apoptosis.

Altogether, our results suggest that in IPF fibroblasts, both processes decreased autophagy activity and increased resistance to apoptosis may be linked. Thus, when mTOR activity was inhibited, autophagy was increased and also apoptosis, and moreover, stronger increase in autophagy was accompanied by stronger induction of apoptosis. However, as regulation of autophagy and death are both downstream of mTOR, we cannot rule out that these two processes might not be mechanically linked.

It is well known that autophagy and apoptosis cross-regulate each other, usually in an inhibitory manner. Thus, autophagy reduces the susceptibility of cells to undergo apoptosis, while apoptosis suppresses autophagy (Mattiolo *et al.*, 2015). However, there are also several examples in which the induction of autophagy facilitates the activation of apoptosis, and our findings suggest that this is what occurs in IPF fibroblasts.

We propose that this failure in the response to starvation could play a key role in the pathophysiology of IPF which is characterized by the persistence of the fibroblasts organized in the fibroblastic foci. These foci represent sites of active fibrogenesis and are critical for the fibrotic progression. Actually, the decrease in intracellular degradation by autophagy and the interruption of apoptosis both mediated by aberrant activation of mTOR pathway are consistent with the IPF fibroblast phenotype. Supporting the notion that decreased autophagy activity contributes to fibrosis, we have found that knockout mice for MMP-19, when exposed to bleomycin instillation, develop a stronger lung fibrotic response with the formation of fibroblasts foci. These fibroblasts exhibited a decrease in the expression of Atg4c, other member involved in autophagy stress response that has been associated with aging (Fernandez & Lopez-Otin, 2015; Jara *et al.*, 2015).

Altogether, our results indicate that age is a determinant factor in the autophagy response of lung fibroblasts. Our data support that age-related deficiency in adaptive responses to stress, together with an increased resistance to apoptosis of IPF lung fibroblasts, mediated by mTOR activity, enhances the vulnerability to lung fibrosis.

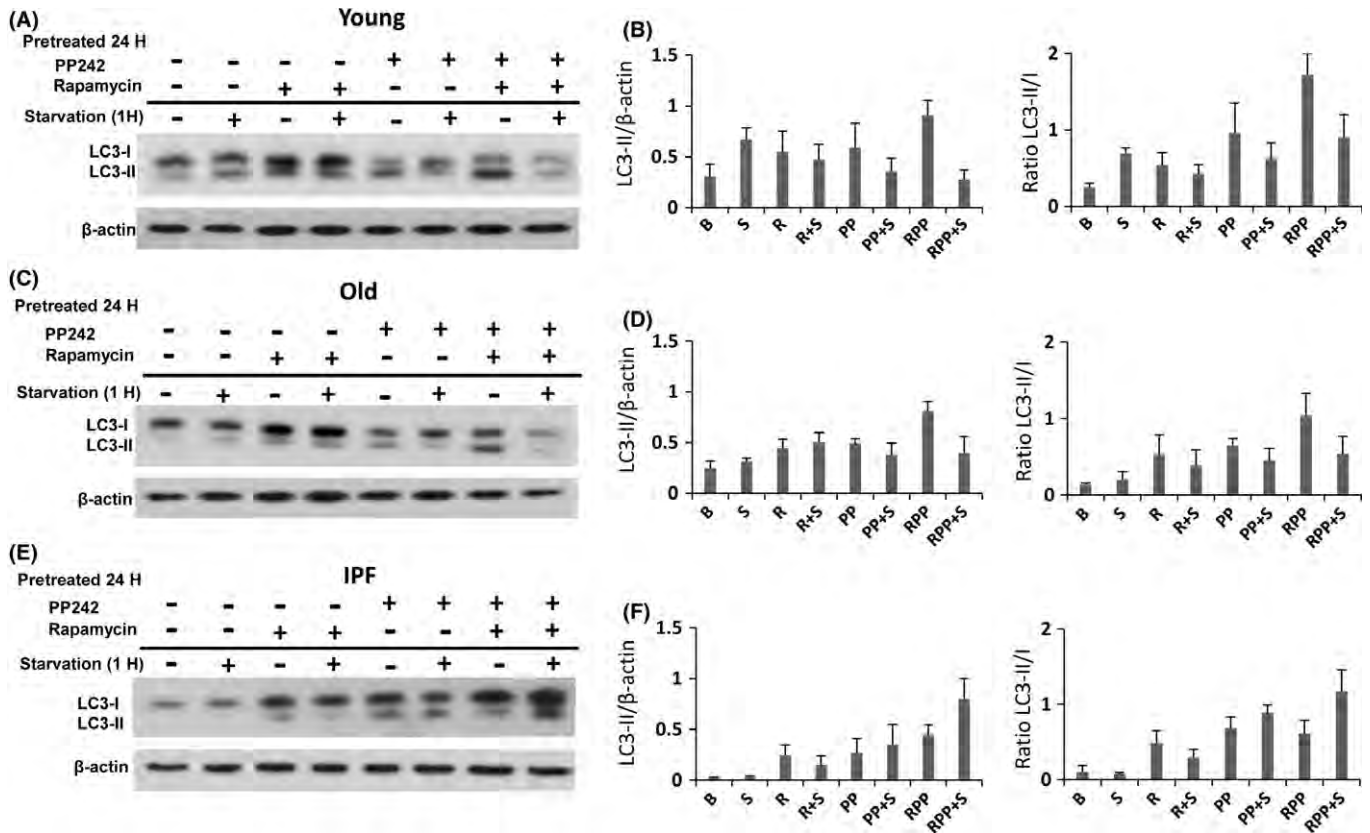


Fig. 5 Effect of rapamycin (20 nM) and/or PP242 (1 μ M) for 24 h on autophagy activity in the three groups of lung fibroblasts (young, old, and IPF). The effect on autophagy with and without starvation was evaluated by Western blot for LC3 using β -actin as a loading control in young (A), old (C), and IPF-derived fibroblast (E). (B, D, F) Densitometric analysis of LC3II Western blots presented in A, C, and E. Each bar represents the mean \pm SD of 2 different cell lines for each group.

Experimental procedures

Human lung fibroblasts culture

The study was approved by the University of Pittsburgh Institutional Review Board and. Lung tissues from normal controls were provided by the PACCM Bio-Bank and Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) under protocols approved by the University of Pittsburgh Institutional Review Board and the ethics committees of INER with a written informed consent obtained from all participating individuals. Lung fibroblasts were isolated by enzymatic dispersion with trypsin (Sigma-Aldrich). Cells were grown with Ham's F-12 (Gibco) add 10% FBS (Gibco) at 37 $^{\circ}$ C in an atmosphere of 95% air and 5% CO₂ until reaching early confluence from the passage 4 to 8.

Reagents

To induce starvation, cells were incubated in Hank's balanced salt solution (HBSS) (Gibco). Protease inhibitors (Sigma-Aldrich) 1:500 or chloroquine (Sigma-Aldrich) 20 μ M were used to induce the accumulation of autophagosomes. Rapamycin 20 nM (Sigma-Aldrich) and/or PP242 1 μ M (Sigma-Aldrich) were used to inhibit mTOR complexes 1 and 2.

Western blot

Proteins were extracted using RIPA (Sigma), and 20 μ g of total protein was used for electrophoresis in a polyacrylamide gel. Proteins were

transferred to PVDF membrane and blocked for 1 h. Primary antibodies for LC3 (Sigma), P62 (Abcam), p(S758)ULK1, ULK1, p(T389)S6K1, S6K1, p(S235/236)S6, S6 (cell signaling), and beta-actin as loading control (Sigma) were incubated overnight. Finally, secondary antibodies (Licor) and Odyssey scanner (Licor) were used. Quantification was performed using ImageJ software (NIH).

Quantitative PCR (qPCR)

About 5 μ g of total RNA was isolated with Trizol (Sigma), according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis and genomic DNA elimination were done with RT² First Strand Kit (Qiagen). Gene expression analysis was performed using RT² Profiler PCR Array Human Autophagy (Qiagen) with 84 autophagy-related genes simultaneously with CFX96 Real Time PCR System (Bio-Rad). Data analysis was based on the 2^{- Δ CT} method with normalization of the housekeeping genes.

Analysis of autophagy activity by fluorescence microscopy

Cells were incubated overnight with a baculovirus for LC3B-GFP and p62-RFP (PremoTM Autophagy Sensors, Invitrogen). To induce the accumulation of autophagosomes, CQ (20 μ M) was used for 24 h. The microphotographs were taken of live cells with an inverted epifluorescence microscope (eclipse, NIKON) with an objective PlanFLUO 60X. Quantification was performed using NIS software (Nikon), and LC3 intense dots were quantified for each cell and plotted as the average of 5 photos of two independent experiments per cell line ($n > 30$ cells per group).

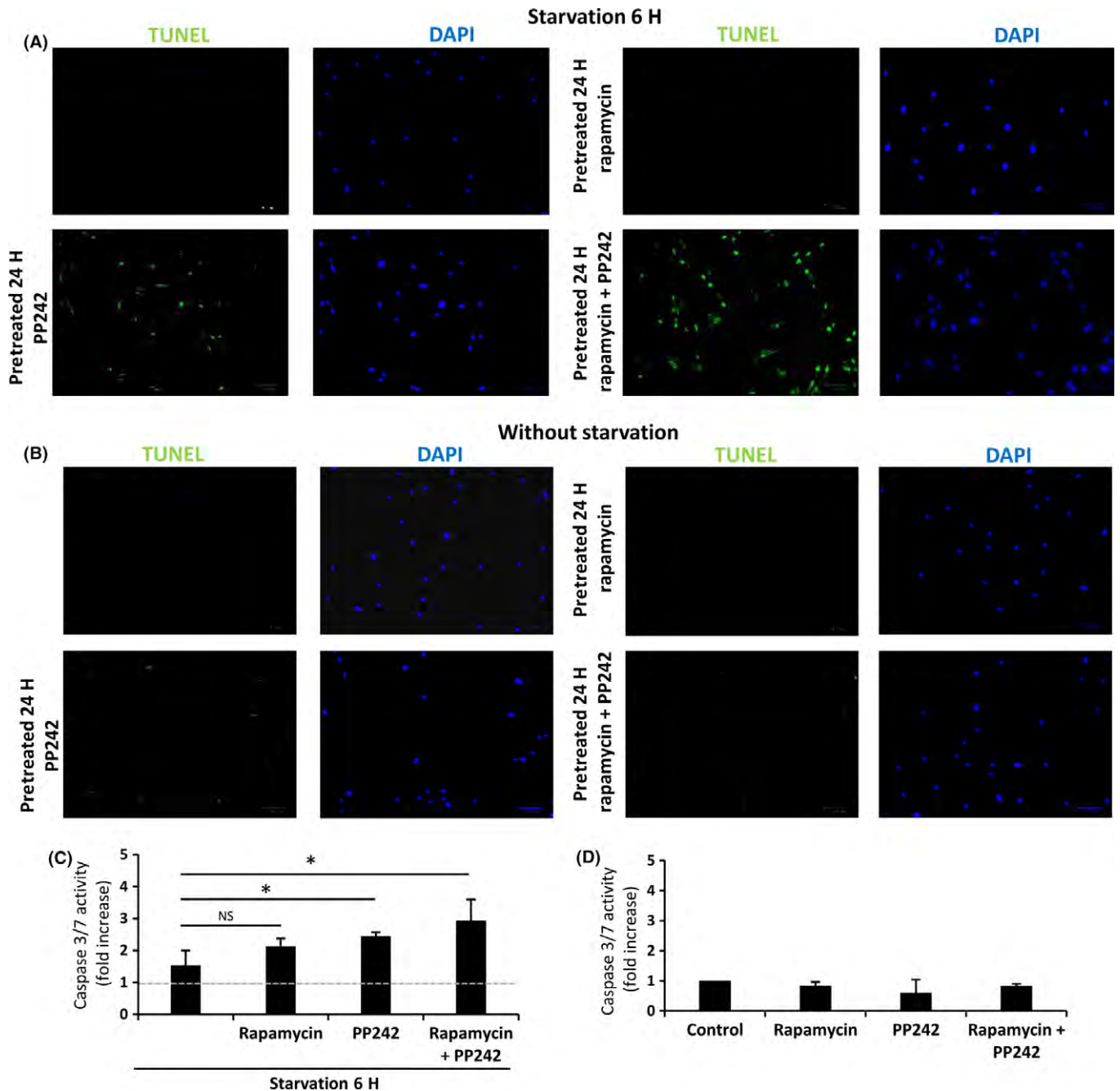


Fig. 6 mTOR pathway inhibitors increase the apoptotic response in IPF fibroblasts. Detection of apoptotic cells using TUNEL stain and DAPI for nuclear staining under 6 h of starvation (A) and basal conditions (B). (C, D) Activity of caspases 3/7 with and without starvation in IPF fibroblasts. Data are expressed as mean \pm SD of 2 different lines of IPF fibroblasts. * $P < 0.05$, two-tailed Student's *t*-test.

Apoptosis

The cells were incubated with HBSS (Gibco) to induce starvation. Number of apoptotic cells was determined with TUNEL stain. Cells were fixed with 1% paraformaldehyde and ApopTag kit (Millipore) was used according to manufacturer's instructions. Nuclear stain was through VECTASHIELD mounting media with DAPI (Vector). The microphotographs were taken using ZOE™ Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad). Positive cells for TUNEL and DAPI were quantified and plotted as the

average of 5 photographs of two independent experiments per cell line ($n > 150$ cells per group).

Caspase 3/7 activity assay

The activity of caspases 3 and 7 was evaluated using the caspase-glo 3/7 assay (Promega) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the luminescent substrate is released by the cleavage of caspases and the luminescent signal was measured in a GloMax luminometer (Promega).

Statistical analysis

Two-tailed Student's *t*-test was used to determine statistical significance.

Funding

The present study was supported by PAPIIT IN214612-3, CONACYT 251636, NIH RHL131789A, and NIH R01 HL123766-01A1 and by Vascular Medicine Institute, University of Pittsburgh, the Institute for Transfusion Medicine, and the Hemophilia Center of Western Pennsylvania.

Author contributions

All authors participated in the revision of the manuscript. YR, ALM, and AP performed study conception and design; YR, RR, DA, and JS carried out acquisition of data; YR, MB, EAG, MR, MS, ALM, and AP carried out analysis and interpretation of data; YR, MR, MS, ALM, and AP drafted the manuscript.

Conflict of interest

None declared.

References

- Araya J, Kojima J, Takasaka N, Ito S, Fujii S, Hara H, Yanagisawa H, Kobayashi K, Tsurushige C, Kawaiishi M, Kamiya N, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Kawabata Y, Hano H, Nakayama K, Kuwano K (2013) Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **304**, L56–L69.
- Armanios M, Blackburn EH (2012) The telomere syndromes. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 693–704.
- Bueno M, Lai YC, Romero Y, Brands J, St Croix CM, Kamga C, Corey C, Herazo-Maya JD, Sembrat J, Lee JS, Duncan SR, Rojas M, Shiva S, Chu CT, Mora AL (2015) PINK1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes lung fibrosis. *J. Clin. Invest.* **125**, 521–538.
- Cabrera S, Maciel M, Herrera I, Nava T, Vergara F, Gaxiola M, Lopez-Otin C, Selman M, Pardo A (2015) Essential role for the ATG4B protease and autophagy in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Autophagy* **11**, 670–684.
- Chen R, Zhang K, Chen H, Zhao X, Wang J, Li L, Cong Y, Ju Z, Xu D, Williams BRG, Jia J, Liu J-P (2015) Telomerase deficiency causes alveolar stem cell senescence-associated low-grade inflammation in lungs. *J. Biol. Chem.* **290**, 30813–30829.
- Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Dröge W, French M, Terman A (2005) Autophagy and aging: the importance of maintaining “Clean” cells. *Autophagy* **1**, 131–140.
- Feldman ME, Apse B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D, Shokat KM (2009) Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol.* **7**, e1000038.
- Fernandez AF, Lopez-Otin C (2015) The functional and pathologic relevance of autophagy proteases. *J. Clin. Invest.* **125**, 33–41.
- Fingerlin TE, Murphy E, Zhang W, Peljto AL, Brown KK, Steele MP, Loyd JE, Cosgrove GP, Lynch D, Groshong S, Collard HR, Wolters PJ, Bradford WZ, Kossen K, Seiwert SD, du Bois RM, Garcia CK, Devine MS, Gudmundsson G, Isaksson HJ, Kaminski N, Zhang Y, Gibson KF, Lancaster LH, Cogan JD, Mason WR, Maher TM, Molyneaux PL, Wells AU, Moffatt MF, Selman M, Pardo A, Kim DS, Crapo JD, Make BJ, Regan EA, Walek DS, Daniel JJ, Kamatani Y, Zelenika D, Smith K, McKean D, Pedersen BS, Talbert J, Kidd RN, Markin CR, Beckman KB, Lathrop M, Schwarz MI, Schwartz DA (2013) Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nat. Genet.* **45**, 613–620.
- Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G (2014) Metabolic control of autophagy. *Cell* **159**, 1263–1276.
- Gribbin J, Hubbard RB, Le Jeune I, Smith CJP, West J, Tata LJ (2006) Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. *Thorax* **61**, 980–985.
- He C, Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 67–93.
- He LQ, Lu JH, Yue ZY (2013) Autophagy in ageing and ageing-associated diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 605–611.
- Hecker L, Logsdon NJ, Kurundkar D, Kurundkar A, Bernard K, Hock T, Meldrum E, Sanders YY, Thannickal VJ (2014) Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 Redox Imbalance. *Sci. Transl. Med.* **6**, 231ra247–231ra247.
- Jara P, Calyeca J, Romero Y, Placido L, Yu G, Kaminski N, Maldonado V, Cisneros J, Selman M, Pardo A (2015) Matrix metalloproteinase (MMP)-19-deficient fibroblasts display a profibrotic phenotype. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **308**, L511–L522.
- Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaeberlein M (2013) mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature* **493**, 338–345.
- Kazufumi M, Sonoko N, Masanori K, Takateru I, Akira O (1997) Expression of bcl-2 protein and APO-1 (Fas antigen) in the lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Microsc. Res. Tech.* **38**, 480–487.
- Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, Franceschi C, Lithgow GJ, Morimoto RI, Pessin JE, Rando TA, Richardson A, Schadt EE, Wyss-Coray T, Sierra F (2014) Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell* **159**, 709–713.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **13**, 132–141.
- King TE, Pardo A, Selman M (2011) Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet* **378**, 1949–1961.
- Kroemer G (2015) Autophagy: a druggable process that is deregulated in aging and human disease. *J. Clin. Invest.* **125**, 1–4.
- Laberge R-M, Sun Y, Orjalo AV, Patil CK, Freund A, Zhou L, Curran SC, Davalos AR, Wilson-Edell KA, Liu S, Limbad C, Demaria M, Li P, Hubbard GB, Ikeno Y, Javors M, Desprez P-Y, Benz CC, Kapahi P, Nelson PS, Campisi J (2015) MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1049–1061.
- Lamming DW, Ye L, Sabatini DM, Baur JA (2013) Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. *J. Clin. Invest.* **123**, 980–989.
- Laplante M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274–293.
- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194–1217.
- Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain J-C, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G (2007) Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO Journal* **26**, 2527–2539.
- Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G (2014) Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 81–94.
- Mattiolo P, Yuste VJ, Boix J, Ribas J (2015) Autophagy exacerbates caspase-dependent apoptotic cell death after short times of starvation. *Biochem. Pharmacol.* **98**, 573–586.
- Matus S, Castillo K, Hetz C (2012) Hormesis: protecting neurons against cellular stress in Parkinson disease. *Autophagy* **8**, 997–1001.
- Minagawa S, Araya J, Numata T, Nojiri S, Hara H, Yumino Y, Kawaiishi M, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Nakayama K, Kuwano K (2011) Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF- β -induced senescence of human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **300**, L391–L401.
- Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio J-M, Criollo A, Maiuri MC, Kroemer G (2009) Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 1524–1532.
- Nho RS, Hergert P (2014) IPF fibroblasts are desensitized to type I collagen matrix-induced cell death by suppressing low autophagy via aberrant Akt/mTOR kinases. *PLoS ONE* **9**, e94616.
- Patel AS, Lin L, Geyer A, Haspel JA, An CH, Cao J, Rosas IO, Morse D (2012) Autophagy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS ONE* **7**, e41394.
- Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G (2006) Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174**, 810–816.
- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bourros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE Jr, Kondoh Y, Myers J, Muller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schunemann HJ, Fibrosis AEJACoIP. (2011) An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 788–824.
- Ricci A, Cherubini E, Scozzi D, Pietrangeli V, Tabbi L, Raffa S, Leone L, Visco V, Torrisi MR, Bruno P, Mancini R, Ciliberto G, Terzano C, Mariotta S (2013) Decreased expression of autophagic beclin 1 protein in idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **228**, 1516–1524.
- Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G (2011) Autophagy and aging. *Cell* **146**, 682–695.

- Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B (2012) Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov.* **11**, 709–730.
- Ryter SW, Choi AM (2010) Autophagy in the lung. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **7**, 13–21.
- Selman M, Pardo A (2014) Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis: an integral model. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 1161–1172.
- Selman MS, King JTE, Pardo A (2001) Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy. *Ann. Intern. Med.* **134**, 136–151.
- Selman M, Rojas M, Mora AL, Pardo A (2010) Aging and interstitial lung diseases: unraveling an old forgotten player in the pathogenesis of lung fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med.* **31**, 607–617.
- Shaw RJ, Cantley LC (2006) Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**, 424–430.
- Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E (2005) Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* **1**, 84–91.
- Taskar VS, Coultas DB (2006) Is Idiopathic Pulmonary Fibrosis an Environmental Disease? *Proc. Am. Thorac. Soc.* **3**, 293–298.
- Thannickal VJ, Murthy M, Balch WE, Chandel NS, Meiners S, Eickelberg O, Selman M, Pardo A, White ES, Levy BD, Busse PJ, Tudor RM, Antony VB, Sznajder JI, Budinger GR (2015) Blue journal conference. Aging and susceptibility to lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **191**, 261–269.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Fig. S1 IPF fibroblasts show an incomplete LC3 and p62 colocalization after chloroquine treatment. Fluorescence micrographs of baculovirus infection of

LC3-GFP and p62-RFP in the three groups of fibroblasts after chloroquine treatment (20uM). Hoechst was added to nuclei stain.

Fig. S2 Aging decreases autophagy markers in lung fibroblasts from old (24 months) compared with young (2 months) mice. Western blots of LC3, p62, Atg5, Beclin-1 after 1 h of starvation or chloroquine treatment (20uM) (A). (B): Same treatment for 24 h. β -actin was used as a loading control. Densitometric analysis of (A) and (B) blots are showed in C and D, respectively. Each bar represents the mean \pm SD of two different cell lines.

Fig. S3 Rapamycin and/or PP242 reduce the activity of mTOR in IPF fibroblasts. (A) Fibroblasts from IPF patients were stimulated with rapamycin (20 nM) and/or PP242 (1uM) for 24 h and the activity of mTOR complex 1 was examined by Western blot through the phosphorylation of (T389) S6K1 and (S235/236) S6. (B, C): Densitometric analysis. Each bar represents the mean \pm SD of 3 different cell lines for each group. * $P < 0.05$ two-tailed Student's *t*-test.

Fig. S4 Effect of rapamycin plus PP242 and starvation on mTOR activity in young and IPF fibroblasts. Fibroblasts from young lungs (A) and IPF patients (B) were stimulated with rapamycin (20 nM) and PP242 (1uM) for 24 h with and without starvation and the activity of mTOR complex 1 was examined by Western blot through the phosphorylation of (S235/236) S6.

Table S1 Age and sex of enrolled subjects and patients with IPF.

Table S2 Changes in the expression of autophagy-related genes with aging (complete list).

Data S1 Supplementary experimental procedures.