



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**La ausencia de ZNF365 promueve la senescencia y
exacerba la fibrosis pulmonar experimental**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JUAN MANUEL PÉREZ HUACUJA URISTA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO CEMO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. FÉLIX RECILLAS TARGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

OCTUBRE, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**La ausencia de ZNF365 promueve la senescencia y
exacerba la fibrosis pulmonar experimental**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JUAN MANUEL PÉREZ HUACUJA URISTA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO CEMO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. FÉLIX RECILLAS TARGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

OCTUBRE, 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/446/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité de Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de marzo de 2023 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del estudiante PÉREZ HUACUJA URISTA JUAN MANUEL con número de cuenta 305619875 con la tesis titulada: "La ausencia de ZNF365 promueve la senescencia y exacerba la fibrosis pulmonar experimental", realizada bajo la dirección de la **DRA. ANNIE PARDO CEMO**:

Presidente: **DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE**
Vocal: **DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ**
Vocal: **DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN**
Vocal: **DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA**
Secretario: **DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 28 de agosto de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/AAC/GEMF/EARR/ipp

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.

Al programa de Posgrado en Ciencias Biológicas.

Incluyo en este mismo al Programa de Apoyo de Estudiantes de Posgrado (PAEP), por permitirme acudir a un Congreso Nacional y uno Internacional para presentar los avances de mi proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca número 581180, así como el apoyo del proyecto número 281074.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo #IN201520.

A mi tutora, la Dra. Annie Pardo Cemo, por su invaluable apoyo, por la paciencia y por los conocimientos brindados; además de su siempre crítico punto de vista, su agudeza y experiencia que fueron fundamentales durante mi formación desde la licenciatura.

Un enorme agradecimiento a mi Comité Tutor, conformado por la Dra, Annie Pardo Cemo, el Dr. Félix Recillas Targa y el Dr. Jorge Meléndez Zajgla por sus observaciones, sus consejos y todo el conocimiento aportado, que sin duda fueron pieza clave en mi formación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

Mi más profundo agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a la Facultad de Ciencias y a todo el personal que ahí labora; investigadores, docentes, personal administrativo e intendentes. Mi profundo agradecimiento por todos los conocimientos transmitidos, el apoyo, así como todo el trabajo que hay detrás y que, sin este, mi formación como biólogo y como Doctor en Ciencias Biológicas no sería posible.

A la Unidad de Posgrado por todo el apoyo brindado durante mis estudios. Agradezco a todo el personal académico y administrativo adscrito a este posgrado y al Comité Académico del Posgrado un especial agradecimiento.

Al Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT-CONACyT), ubicado en el edificio de Física Biomédica de la UNAM.

Al Dr. Moisés Selman Lama por su apoyo, sus consejos, sus atinadas opiniones en torno a mi proyecto, además de ser el puente para colaborar con el INER y hacer uso de su material y sus instalaciones. También agradezco mucho su apoyo para que los ratones transgénicos pudieran llegar desde Francia hasta el bioterio del INER. Gracias por facilitar y abrir las puertas, trámites y demás logística para que esto fuera una realidad.

Agradezco al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER) y a todo el personal que ahí labora por su invaluable ayuda y las colaboraciones establecidas que fueron clave para la realización de mi proyecto de doctorado. A la Dra. Martha Montaña Ramírez y al Dr. Carlos Ramos Abraham por su calidad humana y por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar algunos experimentos. Agradezco a la Dra. Blanca Ortiz Quintero y a la Quím. Damaris Priscila Romero Rodríguez por su apoyo con la citometría de flujo; al Dr. Alberto Pizaña Venegas por todo el apoyo brindado con la colonia de ratones transgénicos y por supuesto para que los pudieran traer al país; al Dr. Miguel Gaxiola Gaxiola y a Erika y Lupita por el apoyo con el procesamiento de los bloques de parafina y los reportes de patología; al Dr. Alfonso Salgado por la ayuda con la microscopía de fluorescencia.

Estoy muy agradecido con mi colaboradora, la Dra. Mariel Maldonado Bonilla por sus sabios consejos, por siempre apoyarme, por todo el asesoramiento técnico y teórico, por enseñarme y ser un ejemplo del compromiso y de un trabajo esmerado y arduo que sin duda permite recoger los frutos. Gracias porque creo hicimos una buena mancuerna y que la comunicación mutua fue clave para la elaboración de este proyecto.

A mis colaboradores, la maestra Fernanda Toscano-Márquez, la maestra María de los Remedios Ramírez Rangel, la maestra Carina Becerril Berrocal, al Dr. Yair Romero López y a la Dra. Yalbi Balderas Martínez por su invaluable ayuda. A

Fernanda le agradezco su enorme disposición para ayudarme a montar el modelo de bleomicina en los ratones, su compromiso y su paciencia. A Jazmín le agradezco mucho su colaboración, en particular con los resultados de expresión de la molécula en los pulmones de ratón, de igual suerte le agradezco su enorme apoyo cuando tomamos clase juntos en Cuernavaca y me regresaba con ella. A Reme le agradezco siempre sus consejos, la formación que me dio desde la licenciatura, su colaboración y ayuda con los inmunes, su apoyo administrativo y su ayuda en la cotización y el pedido de materiales y reactivos. A Carina le agradezco mucho su apoyo técnico, su excelente disposición para aconsejarme, apoyarme en mis experimentos y ayudarme a revisar variables importantes que fueron clave para este proyecto; además le agradezco la escucha activa que siempre tuvo hacia mí en el terreno personal y humano.

Mis más grandes agradecimientos a otros miembros del laboratorio. A la Dra. Yalbi Balderas por su invaluable amistad, así como por su ayuda en el terreno bioinformático, además de las colaboraciones que hemos establecido; Al Dr. Jorge García Álvarez por su amistad y su ayuda durante todos estos años de conocerlo; Al Dr. Yair Romero por su buen humor, su consejo y sus valiosas y siempre apreciadas opiniones; A la Dra. Sandra Cabrera por siempre darme sus puntos de vista, por su objetividad, por apoyarme en mis ensayos de candidatura y cuando iba a ingresar al doctorado, dándome sus comentarios y tomando notas de los comentarios de los demás miembros del grupo, le agradezco también su confianza y el permitirme apoyarla en un par de clases de biología molecular; además le agradezco mucho su ayuda con el modelo de bleo y con las cuantificaciones de hidroxiprolina, aparte de prestarme su homogenizador de tejidos cuando lo necesité; Al Dr. José Cisneros por sus opiniones y comentarios, por las veces que me dio aventón al INER o a la Facultad, por darme un espacio en su laboratorio, por el apoyo que me brindó durante la pandemia de traer material del INER a la facultad. Agradezco mucho a mis demás compañeros del laboratorio de distintos niveles académicos, estudiantes de licenciatura, Quetzali Rivera, Andrés Iglesias, Louis Díaz, Jorge Yair García; y de posgrado, Ángeles García, Erika Rubí Ruiz, Soledad, Miguel Negreros, Marco Antonio Espina, Luis Plácido, David Medina por estar ahí, acompañarnos en el camino y hacer los momentos más amenos.

Mi más grande agradecimiento a mi jurado de examen de grado, Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dra. Susana Castro Obregón, Dra. María Sandra Cabrera Benítez, Dr. José Guadalupe Cisneros Lira y Dr. Jorge Meléndez Zajgla.

A la Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C., a la Sociedad Americana del Tórax (ATS en inglés) y a las sociedades anfitrionas del "Experimental Biology".

Mi profundo agradecimiento a la Dra. Rosaura Ruiz Gutiérrez y a la Dra. Ofelia Angulo Guerrero, ex titular y titular de la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación del Gobierno de la Ciudad de México, respectivamente, por su apoyo que fue clave para la conclusión de mi artículo y mi tesis de doctorado.

Agradezco a todas las personas de esta institución con las que tuve la oportunidad de trabajar y aprender.

Finalmente agradezco a la gente que ha creído en mí, en mis proyectos y en esencia en el ser humano que soy. Gracias a mi madre, Margarita Urista Orellana, por ser una guerrera y no rendirse ante la adversidad; mi profundo agradecimiento a mi abuela Bertha Orellana Flores† y a mi abuelo Manuel Urista Doria†, a mis tías Bertha Urista Orellana† y Adriana Urista Orellana. A mi hermano Ricardo Pérez Huacuja Urista y a su esposa Mónica Lizette Alvarado Ibarra.

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	
1. Resumen _____	1
Abstract _____	3
2. Introducción _____	5
2.1 Fibrosis Pulmonar Idiopática _____	5
2.2 Proteínas con dominios de dedos de zinc _____	10
2.3 Proteínas con dominios de dedos de zinc en el desarrollo y morfogénesis del pulmón _____	18
2.4 Proteínas con dominios de dedos de zinc en FPI _____	21
2.5 ZNF365 _____	27
3. Justificación _____	30
4. Hipótesis _____	30
5. Objetivos _____	30
6. Material y Métodos _____	31
6.1 Muestras de pulmones humanos y cultivo celular _____	31
6.1.1 Estimulación con TGF β -1 y doxorubicina.	
6.1.2 Silenciamiento de ZNF365.	
6.1.3 Ensayo de β galactosidasa.	
6.1.4 Ensayo de tasa de crecimiento con WST-1	
6.1.5 Apoptosis.	
6.2 Inmunohistoquímica _____	34
6.3 Reacción en cadena de la polimerasa _____	35
6.4 Extracción de proteínas y Western Blot _____	36

6.5 Modelo murino _____	37
6.5.1 Cuantificación de hidroxiprolina.	
6.5.2 Cuantificación del score de fibrosis (Ashcroft).	
6.6 Análisis de expresión <i>in silico</i> en la página de IPF Cell Atlas _____	38
6.7 Análisis de expresión de ARN de célula única _____	38
6.8 Análisis estadísticos _____	39
7. Resultados	
7.1 La proteína ZNF365 está aumentada en el pulmón de pacientes con FPI _____	39
7.2 Zfp365 está sobre expresado en los pulmones de ratón en fibrosis pulmonar inducida por bleomicina _____	42
7.3 ZNF365 se sobre expresa en fibroblastos y células A549 estimuladas con TGF β -1 _____	43
7.4 Los ratones K.O. para Zfp365, presentan una respuesta fibrótica exacerbada en el modelo de fibrosis pulmonar experimental _____	46
7.5 El silenciamiento de ZNF365 promueve una disminución en la tasa de crecimiento en fibroblastos y células A549, que no se relaciona con un aumento en la apoptosis _____	48
7.6 Los fibroblastos y células A549 silenciadas para ZNF365 presentan una mayor actividad de β galactosidasa y un aumento en la expresión de marcadores de senescencia _____	51
7.7 La doxorrubicina disminuye la expresión de ZNF365 en fibroblastos y células A549 _____	55
8 Discusión _____	58
9 Conclusiones _____	64
10 Perspectivas _____	65
11 Referencias bibliográficas _____	66
12 Anexo 1 _____	77

13 Anexo 2. Artículo publicado en Cells, an open access journal from MDPI. Urista, J.; Maldonado, M.; Toscano-Marquez, F.; Ramírez, R.; Balderas-Martínez, Y.I.; Becerril, C.; Romero, Y.; Selman, M.; Pardo, A. Lack of ZNF365 Drives Senescence and Exacerbates Experimental Lung Fibrosis. Cells **2022**, 11, 2848. <https://doi.org/10.3390/cells11182848> _____ **85**

Abreviaturas

Agua dde	Agua destilada desionizada esterilizada
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
DEPC	Dietilpirocarbonato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Proteína cinasa B
ARN	Ácido ribonucleico
ARNhc	ARN de horquilla corta
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNpi	ARN pequeño interferente
c-ABL	Proteína tirosina cinasa ABL1
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELK1	Factor de transcripción ETS
ERK1/2	Cinasas relacionadas con la señalización extracelular 1 y 2
FGF10	Factor de crecimiento de fibroblastos 10
FN	Fibronectina
FPI	Fibrosis Pulmonar Idiopática
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
HIPPO	Vía de señalización Salvador-Warts-Hippo
HRP	Peroxidasa de rábano
IGBP5	Proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina 5
JAK	Cinasa de Janus

K.O.	Knock out
NOTCH1	Proteína 1 homóloga de muesca de locus neurogénico
OPN	Osteopontina
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
Pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos
PBS-T	PBS con Tween -20 al 0.05%
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPAR γ	Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas
PTCH1	Homologo 1 de la proteína patched
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real
RAB8	Proteína relacionada con RAS RAB8
RT-qPCR reversa	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa
SHH	Sonic Hedeghog
SLUG	Proteína con dedos de zinc SNAI2
SMAD	Madre en contra de decapentaplégico homólogo 1
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TA	Temperatura ambiente
TAZ	Regulador de la transcripción que contiene dominios WW 1

TBS	Solución amortiguadora de Tris-HCL
TIMP-1	Inhibidor tisular de metaloproteinasas 1
TGF β -1	Factor de crecimiento transformante beta 1
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TTF-1	Factor de terminación de transcripción 1
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WB	Western blot
WNT	Vía de señalización sin alas/Int1
WT	Wild Type (silvestre)
YAP	Regulador transcripcional asociado a YES1
ZNFs	Zinc finger proteins (Por sus siglas en inglés)

1. Resumen

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica, progresiva, irreversible y letal de etiología desconocida, con un mal pronóstico y una supervivencia promedio de 3-4 años posterior a su diagnóstico. La FPI es una enfermedad epitelial y fibroblástica, caracterizada por una activación aberrante del epitelio alveolar, el cual sintetiza y secreta numerosas moléculas profibróticas como TGF β -1, PDGF y TNF α , entre otras, lo cual promueve la migración, proliferación, y activación de fibroblastos en el parénquima pulmonar, así como su diferenciación en miofibroblastos, los cuales sintetizan y secretan grandes cantidades de proteínas de matriz extracelular en especial colágenas fibrilares, lo que resulta en la destrucción de la arquitectura y función del pulmón. En estudios previos de expresión en fibroblastos pulmonares estimulados con TGF β 1, se demostró que el gen de *ZNF365* se sobre expresa en comparación con fibroblastos no estimulados. *ZNF365* codifica para una proteína de la superfamilia de dedos de zinc con dominios C2H2 y está implicada en el control del ciclo celular y la estabilización de telómeros. Sin embargo, su función en el proceso fibrótico se desconoce. En este trabajo, se evaluó la expresión de esta molécula en pulmones de pacientes con FPI y en pulmones de ratones instilados con bleomicina. Se estudió la respuesta fibrosante en ratones silvestres y deficientes del gen ortólogo, *Zfp365*, instilados con bleomicina y solución salina. Además, se evaluaron algunos efectos funcionales derivados del silenciamiento de *ZNF365* en fibroblastos pulmonares y células epiteliales *in vitro*.

Se encontró que *ZNF365* se localiza en focos de fibroblastos y células epiteliales alveolares en pulmones derivados de pacientes con FPI. En el modelo murino de

fibrosis pulmonar experimental, se localizó a ZFP365 en células epiteliales alveolares y algunas poblaciones de células estromales. Los ratones deficientes de *Zfp365* presentaron una respuesta fibrosante exacerbada, en comparación con los ratones silvestres, lo que se demostró por morfología y contenido de hidroxiprolina. El silenciamiento de *ZNF365* en fibroblastos y células epiteliales alveolares humanas, resultó en una disminución significativa en la tasa de crecimiento, así como un incremento en marcadores de senescencia, incluyendo la actividad de β galactosidasa, y la expresión de p21, p53 y la variante de histona γ H2AX. Nuestros hallazgos demuestran que ZNF365 se sobre expresa en FPI y en el modelo murino de fibrosis pulmonar experimental. Así mismo, nuestros resultados sugieren que esta molécula puede tener un efecto protector, ya que su ausencia exagera la respuesta fibrosante, posiblemente asociada a mecanismos de senescencia celular.

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive, irreversible, and lethal disease of unknown etiology with a poor prognosis and mean survival of 3-4 years after initial diagnosis. IPF is an epithelial fibroblastic disease characterized by aberrant activation of alveolar epithelial cells which synthesizes and secretes several profibrotic molecules like TGF β 1, PDGF, and TNF α among others that promotes the migration, proliferation, and activation, of lung fibroblasts and their differentiation into myofibroblasts that synthesizes and secretes many extracellular matrix proteins mainly fibrillar collagens, among others. This process results in the destruction of lung parenchymal architecture disrupting the lung function. Global gene expression of human lung fibroblasts stimulated with TGF β 1, a strong fibrotic mediator, revealed the overexpression of *ZNF365*, a zinc finger protein with C2H2 domains, implicated in cell cycle control and telomere stabilization. However, its role in the fibrotic process remains unknown. In this study, we evaluated the expression and localization of *ZNF365* in IPF lungs and in the fibrotic response induced by bleomycin in WT and mice deficient of the orthologous gene *Zfp365*. In IPF, *ZNF365* was overexpressed and localized in fibroblasts/myofibroblasts and alveolar epithelium. Bleomycin-induced lung fibrosis showed an upregulation of *Zfp365* localized in epithelium and stromal cell populations. *Zfp365* KO mice developed a significantly higher fibrotic response compared with WT mice demonstrated by morphology and hydroxyproline content. Silencing *ZNF365* in human lung fibroblasts and alveolar epithelial cells induced a significant reduction of growth rate and increased senescence markers, including Senescence Associated β -Galactosidase activity,

p53, p21, and the histone variant γ H2AX. Our findings demonstrate that ZNF365 is upregulated in IPF and experimental lung fibrosis and suggest a protective role since its absence increases experimental lung fibrosis mechanistically associated with the induction of cell senescence.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad agresiva con un mal pronóstico. La FPI es una enfermedad epitelial y fibroblástica que se caracteriza por una activación aberrante del epitelio alveolar, el cual sintetiza y secreta distintas moléculas como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento como el TGF β -1, el PDGF y el TNF α , las cuales a su vez promueven la migración, proliferación, y activación y de los fibroblastos en el parénquima pulmonar y su diferenciación a miofibroblastos que presentan un fenotipo más agresivo, sintetizando y secretando grandes cantidades de proteínas de matriz extracelular como son las colágenas fibrilares y fibronectina, entre otras. Esta cicatrización aberrante en el pulmón promueve la destrucción de la arquitectura del parénquima pulmonar, lo cual conlleva a la disfunción progresiva en el intercambio gaseoso (Figura 1) (1,2).

Se ha estimado que la incidencia de la FPI está en un rango entre 2 y 30 casos por cada 100,000 personas, mientras que la prevalencia se encuentra en un rango entre 10 y 60 casos por cada 100,000 personas. En personas mayores de 65 años, se estima que la prevalencia de FPI puede ser tan alta como 400 casos por cada 100,000 personas (3).

A pesar de que aún se desconocen en gran parte los mecanismos involucrados en la patogénesis y progresión de la FPI, diversos estudios han revelado algunos factores de riesgo como son la arquitectura genética, incluyendo la presencia de variantes génicas comunes y raras, tabaquismo y factores asociados al huésped como el pertenecer al sexo masculino y la presencia de diabetes.

La edad es el factor de riesgo demográfico más fuerte para el desarrollo de FPI, lo cual sugiere que un envejecimiento acelerado del pulmón es una condición poderosa que conduce a su desarrollo. De hecho, varias características asociadas al envejecimiento, como el acortamiento de los telómeros, la disfunción mitocondrial, y la senescencia celular, entre otros, ocurren prematura o exageradamente en estos pacientes.

Estas características asociadas al envejecimiento se han encontrado principalmente en el epitelio alveolar, donde los neumocitos tipo 2, muestran signos de inestabilidad genómica, acortamiento exagerado de los telómeros, cambios epigenéticos, pérdida de la proteostasis, una desregulación en el censado de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular y comunicación intercelular alterada (3).

En este contexto, cada vez se robustecen más las evidencias del vínculo entre la senescencia celular y el desarrollo de la FPI. Diversos trabajos recientes han demostrado que este mecanismo está presente en células epiteliales alveolares y también en fibroblastos provenientes de pacientes con FPI (4-6). Estudios de secuenciación de ARN en células únicas, han demostrado que existen subpoblaciones de células epiteliales alveolares con fenotipos aberrantes, conocidas como células basaloides, las cuales presentan un fenotipo senescente y se les ha asociado fuertemente con la respuesta fibrosante (5-6). Así mismo, existen diversas publicaciones que demuestran de forma análoga, que existen subpoblaciones de fibroblastos con fenotipos senescentes que promueven y perpetúan el proceso fibrosante en el pulmón (4).

Otro de los mecanismos fuertemente asociados con la patología fibrosante en el pulmón, tiene que ver con la mecanobiología de la matriz extracelular y su rigidez.

Existen diversos mecanismos profibróticos asociados con el aumento en la rigidez de la matriz extracelular, por ejemplo, a través de la liberación de factores de crecimiento como el TGF β -1, que, en conjunto con la rigidez, promueve la formación de asas de retroalimentación profibróticas positivas en donde ocurre una mayor diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, mismos que producen una mayor cantidad de moléculas de matriz extracelular y esto favorece que se perpetúe el proceso. Así mismo, otros factores como el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), así como el factor de crecimiento derivado de plaquetas B favorecen la formación de una matriz rígida. De manera importante, la disminución en la expresión del microARN miR-29, promueve la acumulación de proteínas de matriz extracelular, ya que tiene como blanco a los ARNm de colágenas fibrilares y proteínas que forman parte de esta estructura. La vía de HIPPO y los factores de transcripción YAP/TAZ, mismos que son críticos en procesos de proliferación celular, apoptosis, regulación de tamaño de tejidos y órganos, están regulados por las proteínas de citoesqueleto de F actina y son sensores de la rigidez de la matriz y de su geometría. Esta vía de señalización se ha visto consistentemente activa en varios procesos fibrosantes y se sabe que estos factores transcripcionales se translocan al núcleo y transcriben genes relacionados con estos procesos patológicos (7) (Figura 2).

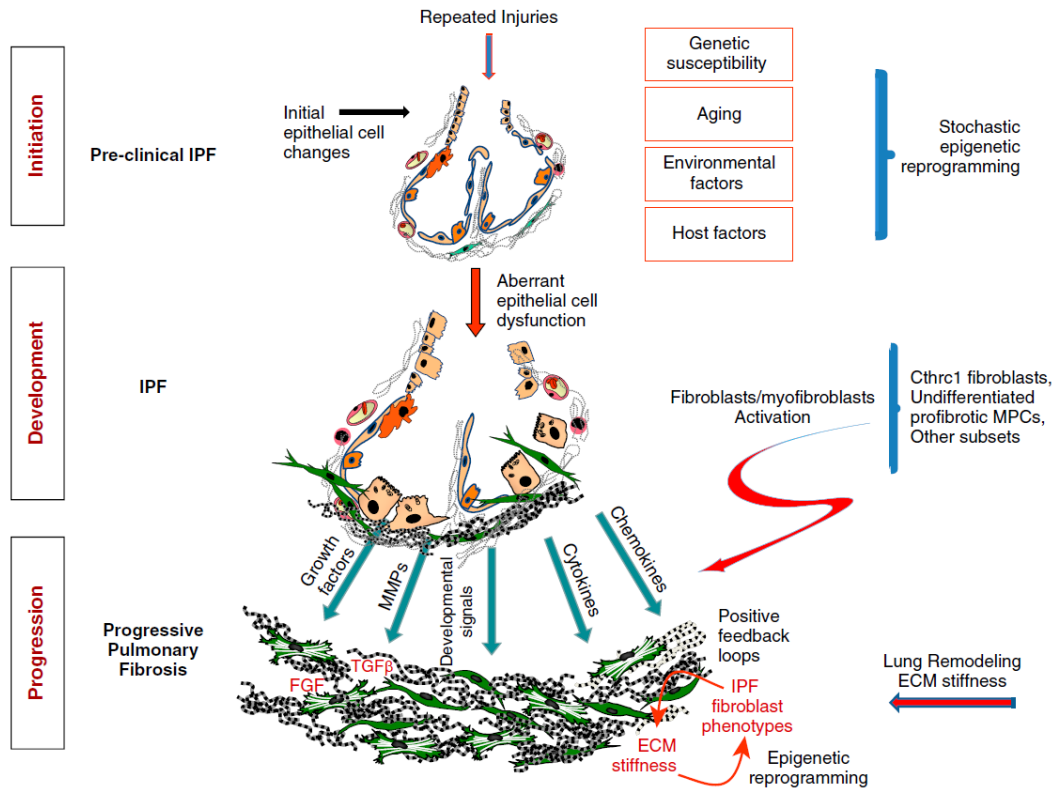


Figura 1 Modelo de la patogénesis de la FPI. Daños repetidos en el epitelio alveolar, en conjunto con la presencia de susceptibilidad genética, el envejecimiento, factores ambientales, factores propios del huésped y modificaciones epigenéticas, llevan a la activación aberrante de las células epiteliales alveolares, lo que provoca la activación de fibroblastos/miofibroblastos residentes del parénquima pulmonar, los cuales a su vez sintetizan y secretan moléculas de matriz extracelular que destruyen la arquitectura del pulmón. (Tomada de Pardo A y Selman M. 2020).

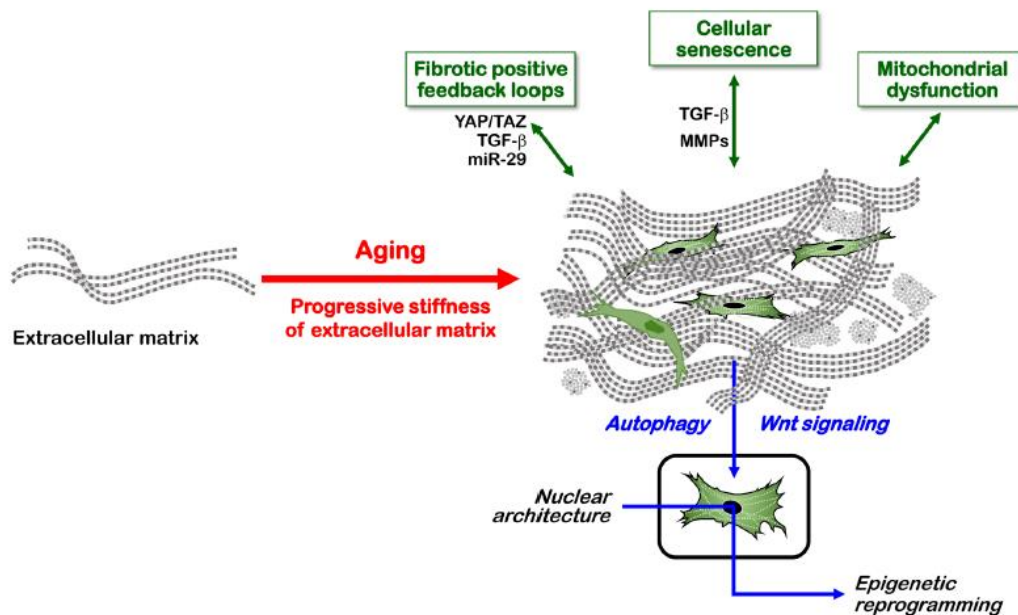


Figura 2 Efectos mecanobiológicos de la rigidez de la matriz extracelular asociada al envejecimiento El envejecimiento está asociado con un aumento en la rigidez de la matriz extracelular, la cual, a su vez, lleva a la formación de asas de retroalimentación positiva de señales profibróticas, senescencia celular, disfunción mitocondrial, modificaciones en la proteostasis, cambios en la condensación de la cromatina, la arquitectura nuclear y la expresión génica. (Tomada de Pardo A y Selman M. 2021).

Otro de los efectos reconocidos de la rigidez de la matriz extracelular, es la activación de vías de desarrollo embrionario en diversos tipos celulares presentes en el pulmón. Previamente, ya se había reportado en FPI la asociación de la reactivación de genes y vías de señalización de desarrollo embrionario en la fisiopatología de la enfermedad, sin embargo, ahora es más clara la interrelación que existe entre la mecanobiología del pulmón y la consecuente activación de vías como la de WNT, NOTCH, TGFβ-1, y SHH (7). Particularmente interesante es el hecho de que la rigidez en la matriz extracelular promueve la secreción de vesículas extracelulares pequeñas que pueden acarrear moléculas como JAGGED-1, que es un ligando de la vía de señalización de NOTCH. En el contexto de la FPI, la

secreción de estas moléculas por efecto de la rigidez, puede favorecer que se perpetue el proceso fibrótico, al mantener un microambiente propicio y al formarse asas de retroalimentación positivas entre fibroblastos y células epiteliales alveolares. En este sentido, se ha visto que la rigidez favorece la actividad de las cinasas de adhesiones focales (FAK) las cuales, a su vez, aumentan la actividad de PI3K/AKT y en consecuencia de RAB8, lo cual favorece la secreción de vesículas (8,9).

2.2 PROTEÍNAS CON DOMINIOS DE DEDOS DE ZINC (ZNFs)

Descripción general de la familia de genes y proteínas ZNFs.

Una de las más grandes familias de factores de transcripción en el humano es la familia de proteínas ZNFs (por sus siglas en inglés de zinc-finger family) las cuales presentan dominios con estructura α -hélice y β -plegada, que unen al metal Zn^{2+} y se denominan “dedos de zinc”. El metal (Zn^{2+}) desempeña un papel esencial en la estabilidad y en la estructura de dichos dominios, más que en la actividad catalítica. Las proteínas que contienen dominios de dedos de Zn^{2+} se encuentran representadas en superfamilias de proteínas poco relacionadas como son factores de transcripción, receptores hormonales nucleares, enzimas integrasas, ubiquitin ligasas E3, remodeladores de la cromatina, supresores tumorales, GTPasas de la familia *Ras*, proteínas transportadoras de membrana y chaperonas (10,11). La primera proteína ZNF, el factor transcripcional IIIA (TFIIIA), fue caracterizada en *Xenopus laevis* a finales de la década de los 1980s y se encontró que estas proteínas se podían asociar con secuencias específicas en el ADN (11).

Estas proteínas cumplen con distintas funciones celulares entre los que se cuentan los procesos de replicación y reparación, proliferación, apoptosis, diferenciación y autofagia, actúan como factores y reguladores transcripcionales ya que pueden asociarse con co-activadores y co-represores, así como con complejos remodeladores de cromatina (12). Además de su capacidad de unión con el ADN a través de secuencias consenso o mediante motivos de unión a ADN metilado, estas proteínas también desempeñan un papel en la traducción, metabolismo celular, así como en la regulación epigenética. En términos generales, las proteínas que contienen estos dominios de dedos de zinc pueden asociarse con diversas biomoléculas como ADN, ARN, proteínas e incluso lípidos por lo que tienen un amplio espectro de funciones al participar como un “puente” o “andamio” entre diversas moléculas (10,12).

Los ZNFs constituyen la familia más amplia de proteínas de unión a secuencias específicas del ADN y factores transcripcionales, y representan el 2% de los genes del genoma humano. A la fecha se han descrito 8 tipos de motivos de dedos de zinc distintos (10), los cuales se muestran en la Tabla 1. Si clasificamos a estas proteínas por los dominios que tienen, existen hasta 30 tipos diferentes (10). En la Figura 3 se muestran los más comunes.

Tabla 1. Distintos motivos de dedos de zinc.

Motivos	Dominios
Cis2 His2 (C2H2)	Krüppel, BTB, POZ, KRAB, SCAN
Mordaza de nudillo	
Clave de sol	GATA, RING, FYVE, PHD, LIM
Liston de zinc	
Zn2/Cis6	
TAZ2	
Asas unidas a zinc	
Metalotioneina	

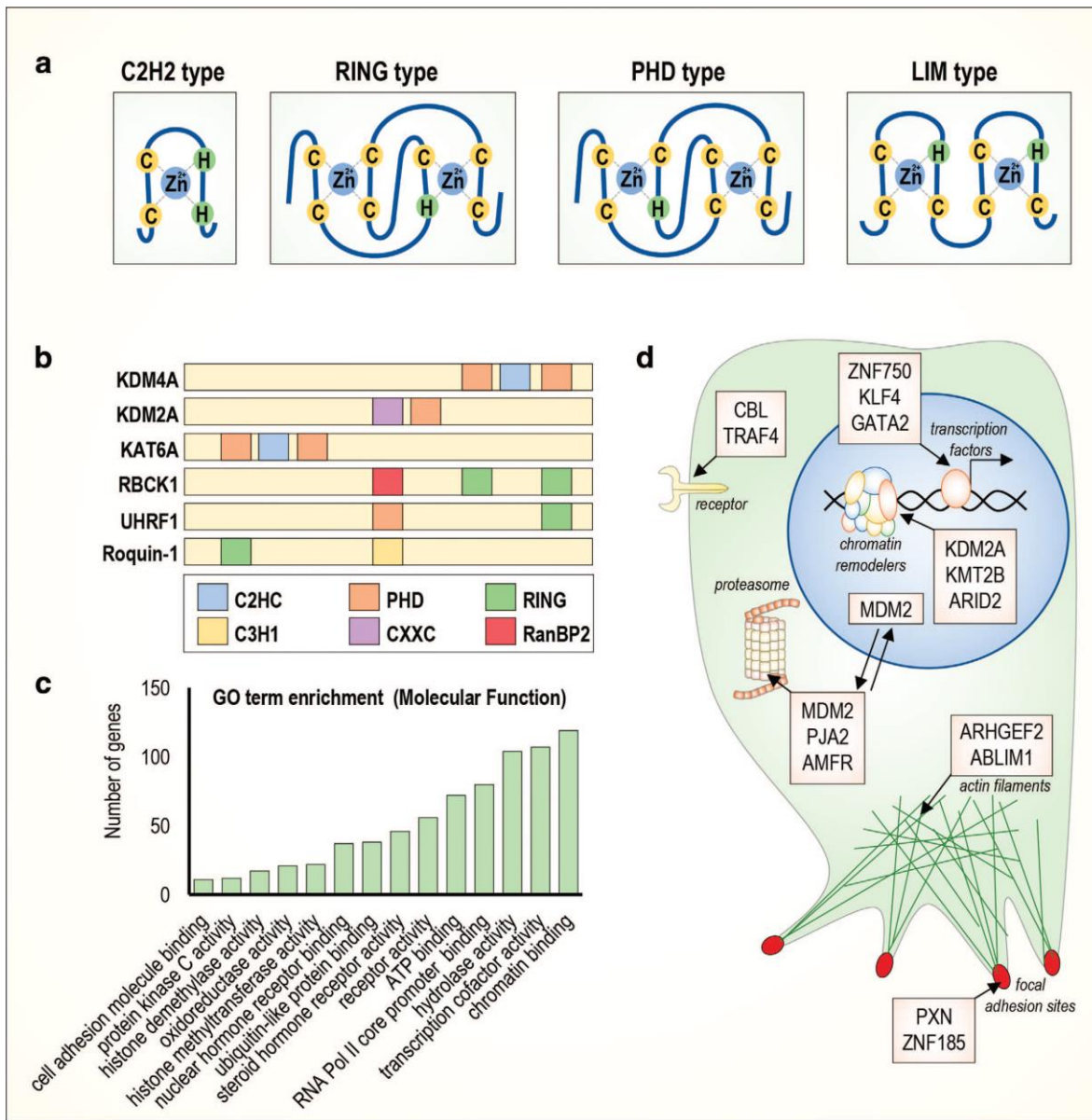


Figura 3 Estructura, funciones y localización subcelular de proteínas de la superfamilia de ZNFs. a) Representación esquemática de la estructura de proteínas con dedos de zinc con dominios C2H2, RING, PHD y LIM. b) Estructura de algunas proteínas ZNFs con múltiples dominios de dedos de zinc. c) Análisis de ontología de genes de 1723 ZNFs anotados, de acuerdo a su función molecular. d) Localización subcelular de distintos ZNFs. (Tomada de Cassandri M, et al., 2017).

Estas proteínas pueden presentar combinaciones entre los diferentes dominios, ampliando así la complejidad de funciones biológicas que desempeñan, como la regulación de genes, proceso mediado por el contexto celular. De las distintas clases de motivos mencionados, el más abundante en estas proteínas es el dominio

Cis2-His2, seguido por el motivo “clave de sol” (treble clef) y por el motivo “listón de zinc” (zinc ribbon) (12). Se sabe que unos cuantos aminoácidos en la estructura de α hélice de estas proteínas se yuxtaponen con 3 pares de bases del ADN. La identidad de los aminoácidos en los sitios de contacto con los nucleótidos del ADN define la especificidad de reconocimiento de las secuencias, por lo que la mutación de algunos de estos aminoácidos puede modificar y aumentar la selectividad y especificidad de estas proteínas por alguna secuencia en particular. De hecho, esto ya se ha utilizado en distintos modelos de edición genética al fusionar una endonucleasa en el módulo de reconocimiento de algunos ZNFs artificialmente modificados (11).

Las proteínas con dominios de dedos de zinc presentan una plétora de funciones biológicas, algunas actuando como factores transcripcionales, así como uniéndose a otras moléculas dentro de la célula. Actúan por lo tanto en distintos órganos y tejidos participando en la organogénesis y morfogénesis, sin embargo, cuando existe alguna desregulación en su expresión, pueden favorecer la generación de diversas patologías.

Regulación de la familia de ZNFs por mecanismos genéticos y epigenéticos.

Al igual que otros genes, la expresión de la familia de ZNFs son regulados por distintos factores genéticos y epigenéticos (12). Se ha reportado que la expresión de esta familia de genes está finamente regulada al interior de las células en donde muchos se presentan como genes agrupados en el mismo cromosoma y generalmente sus secuencias se encuentran asociadas a regiones repetidas del

genoma en sitios de heterocromatina. Como es de esperarse estas regiones son importantes para el mantenimiento estructural de los cromosomas y para la estabilidad genómica (13).

Algunas ZNFs son reguladas por factores epigenéticos como son los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP. Uno de estos complejos es la molécula ATRX (Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked) que tiene un dominio ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L) el cual a su vez contiene un dedo de zinc del tipo PHD (C4HC3 zinc-finger-like) que es capaz de unirse a la histona H3K9me3/H3K4me0, así como a la proteína de heterocromatina 1 alpha (HP1 α). Berstein E et al., en 2016 reportaron que ATRX se une en los exones cercanos a la región 3' de los ZNFs ubicadas en el brazo largo del cromosoma 19. A su vez se observó que el enriquecimiento de ATRX es independiente de la actividad transcripcional en estos genes, pero hay una correlación entre la replicación tardía de estos ZNFs y la presencia de ATRX, así como un mayor número de dominios de dedos de zinc en estas proteínas y dominios tipo KRAB (dominios que se asocian con complejos co-represores). A su vez la unión de ATRX ocurre en contextos de marcas de cromatina atípica donde existe la presencia de H3K9me3 y H3K36me3. En este caso el posicionamiento de este remodelador de la cromatina en estas ZNFs cumple con un papel estructural evitando entrecruzamientos entre distintos cromosomas, defectos en el ciclo celular, así como inestabilidad genómica por daños en el DNA (13).

ZNF423 se regula transcripcionalmente en neuroblastoma por la vía de NF1-RAS-MEK, en donde la pérdida de función de NF1 promueve la hiperactivación de la vía

oncogénica de RAS-MEK. Esta vía promueve el silenciamiento de *ZNF423* y por consiguiente la inhibición de los receptores de ácido retinoico alfa y el receptor X retinoico alfa (14). Del mismo modo se ha visto que la enzima aldehído deshidrogenasa regula positivamente la transcripción del ortólogo de este ZNF en ratón (*Zfp423*) a través de la vía del ácido retinoico (15). Cuando existe una sobre expresión de esta proteína se ha visto en modelos murinos y humanos que este ZNF se puede unir en los intrones 3 y 5 de elementos regulatorios distales tipo “enhancer” para regular negativamente su propia expresión (16). Por lo tanto, hay un asa de retroalimentación negativa en donde al aumentar la expresión de esta proteína, esta misma se encarga de regular su silenciamiento. Por otro lado, su homólogo en el ratón *Zfp521*, es reclutado al promotor y al intrón 5 del “enhancer” de *Zfp423* y de esta manera se regula negativamente la expresión de este gen (17). Otra forma en la que ocurre la regulación negativa de *Zfp423* es a través de la interacción directa de su homólogo *Zfp521* con EBF1 (Early B-Cell Factor 1) en células troncales mesenquimales multipotentes (18). De manera contraria la señalización por BMP2/4 (Bone Morphogenetic Protein 2 and 4) induce la activación transcripcional de *ZNF423* en leucemia linfoblástica aguda (19). Con respecto a la regulación epigenética de esta proteína se ha visto que intervienen mecanismos de metilación en las islas CpG del promotor de este gen. Por ejemplo, en leucemia linfoblástica aguda donde la sobre expresión de este ZNF es importante en la patogénesis de dicha neoplasia, se ha visto que el promotor se encuentra hipometilado en las islas CpG lo cual es consistente con la relación inversa que existe entre la metilación y su expresión (19). Por otro lado, se sabe que su homólogo *Zfp521* en ratón como ya se había mencionado tiene la capacidad de

silenciar la expresión de *Zfp423* y uno de los mecanismos es precisamente mediante el reclutamiento de remodeladores de la cromatina y modificaciones post traduccionales represivas en las histonas (18).

Existe otro nivel de regulación para esta gran familia de proteínas en donde las modificaciones post traduccionales, principalmente la acetilación y la fosforilación regulan las funciones celulares de estas moléculas. Por ejemplo, el factor transcripcional GATA1 puede ser acetilado por las proteínas CBP/p300, lo cual facilita su interacción con la cromatina y la correcta diferenciación del linaje eritroide al unirse a la región LCR (región de control del locus). Del mismo modo la proteína EKLF es acetilada en dos residuos de aminoácidos (288 y 302), lo cual promueve la transactivación del gen *HBB* reclutando al gran complejo eritroide que contiene remodeladores de la cromatina de la familia SWI/SNF, así como la variante de histonas H3.3 (20). Por otro lado, se ha observado que la fosforilación en residuos de serina/treonina de varios de estos ZNFs como son SP1, YY1 e IKAROS es importante para regular negativamente su unión con el DNA durante la mitosis (12). De la misma forma esta familia de genes puede ser regulada post transcripcionalmente por ARNs no codificantes y particularmente se ha descrito la participación de ciertos miARNs en la regulación negativa de la traducción de estas proteínas. Por citar algunos ejemplos, podemos mencionar al *miR-525-3p* el cual regula de manera negativa a *ZNF395*, el cual es un gen supresor de tumores en carcinoma hepatocelular. Por otro lado, el *miR-940* promueve la migración e invasión en células de carcinoma gástrico al inhibir la traducción de *ZNF24* (12).

El procesamiento post transcripcional de ARNs por medio de “empalmes alternativos” constituye otro nivel en el que pueden ser regulados estos genes. En

cáncer de ovario el proceso de “empalme” promueve la generación de isoformas del gen *ZNF695*, en este caso en particular de dos isoformas que se sobre expresan y están involucradas en la progresión de este tipo de neoplasia. Se sabe que este ZNF pertenece a la clase C2H2 y que además como varios miembros de esta familia, esta molécula contiene un dominio KRAB. En éste trabajo se observó que el sitio de procesamiento del ARNm involucra la región del dominio KRAB y que por lo tanto esta queda trunca o incompleta lo cual puede implicar que esta proteína pierde su actividad como co-represora e incluso puede adquirir una nueva función como co-activador transcripcional (21).

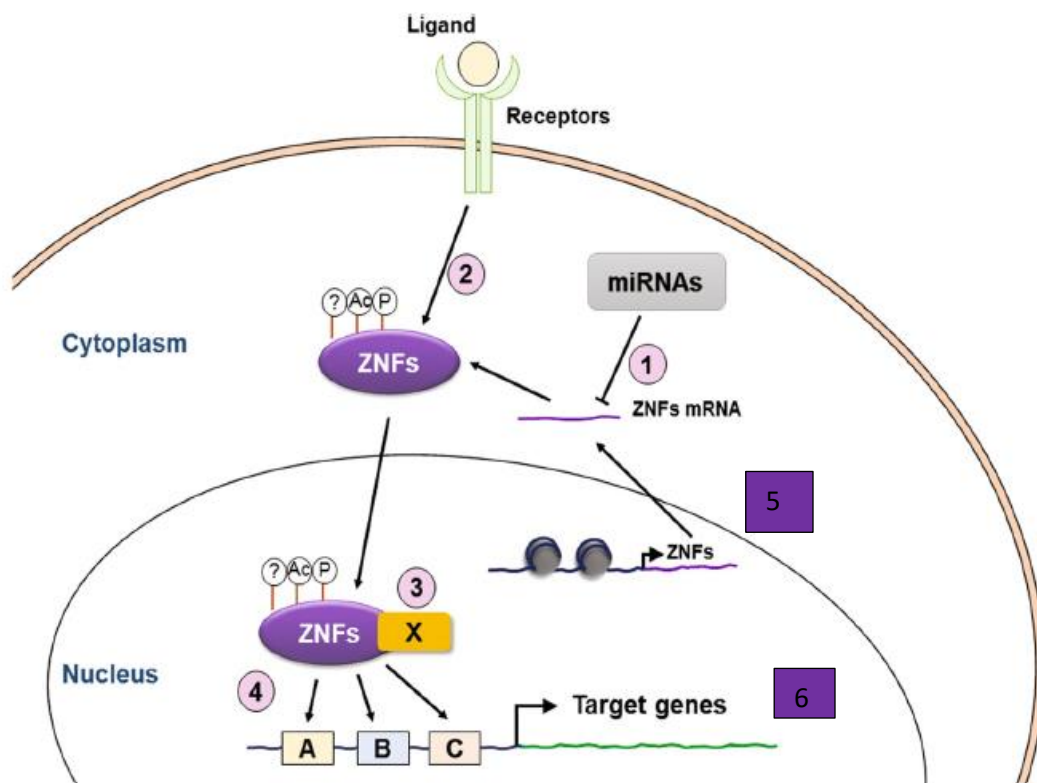


Figura 4 Mecanismos de regulación y de función de los ZNFs: 1) ARNm de genes ZNFs pueden ser silenciados por microARNs específicos que reconocen su región semilla 3' UTR; 2) Modificaciones post traduccionales que pueden modular la actividad de ZNFs; 3 y 4) Las proteínas ZNFs pueden unirse y regular a distintas regiones del genoma. 5) Los genes ZNFs pueden ser regulados por mecanismos genéticos y epigenéticos. 6) Existen modificaciones post

transcripcionales por mecanismos de empalmes alternativos que generan distintas isoformas de los genes ZNFs. (Figura modificada de Jen J et al, 2016).

2.3 PROTEÍNAS CON DOMINIOS DE DEDOS DE ZINC EN EL DESARROLLO Y MORFOGÉNESIS DEL PULMÓN

Existen numerosas proteínas con dominios de dedos de zinc que participan en el desarrollo y morfogénesis pulmonar. Algunas de ellas participan como factores transcripcionales, mientras que en otros casos interactúan con otras moléculas para regular la organogénesis.

Las proteínas que contienen dominios de dedos de zinc de la familia GATA (**GATA family**) llamada así porque se unen a secuencias consenso de ADN (A/T) **GATA** (A/G)) participan en la diferenciación de diferentes linajes celulares entre los que se encuentran el hematopoyético y del endodermo. Los ratones deficientes de *Gata4*^{-/-} mueren posteriormente a la gastrulación ya que tienen defectos en el desarrollo del corazón, el sistema gastrointestinal y el endodermo visceral y parietal de donde se originan los pulmones (22).

En el pulmón *GATA6* se expresa en el epitelio bronquiolar y regula al factor transcripcional TTF-1 el cual es indispensable para la formación de este órgano (22).

La vía de Sonic Hedgehog (SHH) es esencial en la morfogénesis de distintos órganos. Los factores transcripcionales de la vía de SHH; GLI1 (Glioma-Associated Oncogene 1), GLI2 y GLI3 se expresan diferencialmente en el pulmón durante el desarrollo. Dichas moléculas contienen motivos C2H2 de dedos de zinc y son

homólogos del gen *cubitus interruptus* de *Drosophila melanogaster* el cual participa en la polaridad segmentaria (22).

En ratones con mutaciones en el factor transcripcional GLI3 existen defectos en el lóbulo derecho caudal, medial y en lóbulos accesorios del pulmón. La alteración específica en GLI2 provoca defectos en la arborización y proliferación, promoviendo fusiones entre los lóbulos del pulmón derecho y se ha observado que el fenotipo más severo se expresa con la ausencia de este factor. Al parecer GLI1 y GLI2 tienen funciones redundantes en la morfogénesis pulmonar (22). En ratones neonatos se ha visto que el factor GLI1 se expresa principalmente en el compartimiento mesenquimal de los tabiques alveolares hasta dos semanas posteriores al nacimiento, después de las cuales se van perdiendo las células que expresan este factor (22) (Figura 5).

En ratones adultos la expresión de GLI1 se encuentra fundamentalmente en fibroblastos adventicios alrededor de las vías aéreas y vasos, mientras que es escasa en septos alveolares. La expresión del factor GLI2 en ratones adultos es muy semejante a la de GLI1, sólo que en los tabiques alveolares su expresión es mucho mayor. Se sabe que SHH se produce en el epitelio y que esta molécula al ser secretada señala en el compartimiento mesenquimal, lo cual promueve la morfogénesis y ramificación pulmonar en parte por la regulación de la expresión de FGF10 (23).

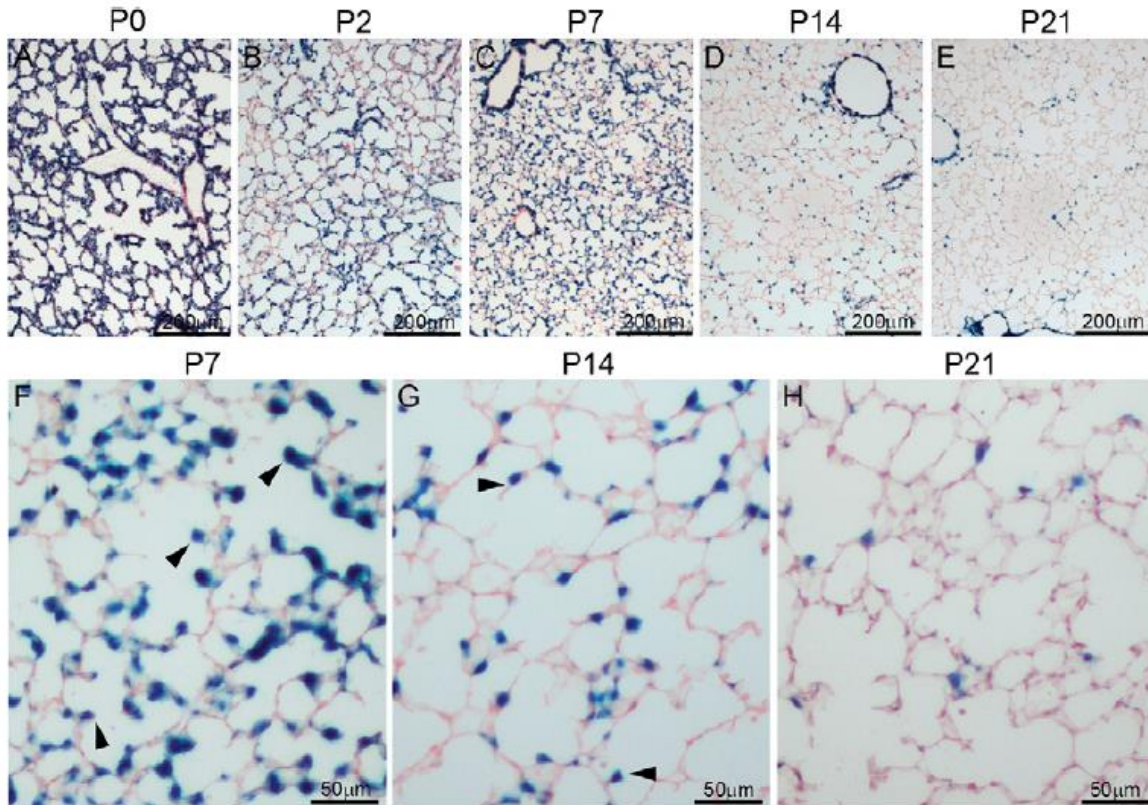


Figura 5 Expresión de SHH en el pulmón durante el desarrollo posnatal en ratones. Cortes histológicos de pulmón *Gli1^{nLacZ/+}* en días posnatales P0, P2, P7, P14 y P21, fueron teñidos para mostrar la actividad de β -galactosidasa. (A-E) Imágenes con poco aumento que muestran la expresión de *Gli1*⁺ en células epiteliales alveolares y alrededor de los bronquios, la cual disminuye de manera significativa en el compartimiento alveolar en los días P14 y P21. (F-H) Imágenes con mayor aumento. (Tomada de Liu L, et al., 2013).

Por otro lado, los factores transcripcionales con dominios de dedos de zinc KLF (Kruppel Like Factor) también participan en el desarrollo del pulmón. KLF2 se expresa notablemente en tejido pulmonar y a pesar de que los ratones deficientes de este factor mueren prematuramente *in utero*, se ha podido estudiar su papel en la morfogénesis de este órgano gracias al uso de ratones quiméricos, los cuales son creados al introducir células troncales embrionarias deficientes de *Klf2* en blastocistos de ratones silvestres en donde se ha visto que la formación pulmonar se ve comprometida (24).

KLF5 se expresa principalmente en epitelio bronquiolar y en células epiteliales del revestimiento de la tráquea. Los ratones deficientes de *Klf5*^{-/-} mueren en el inicio del desarrollo, así es que se desconoce cuál es su función exacta en la morfogénesis pulmonar; sin embargo, en ratones condicionales deficientes de este factor se ha observado que el pulmón tiene defectos en la maduración, en la arborización y la morfogénesis tanto en el epitelio respiratorio, como en el músculo liso y la vasculatura (24).

KLF4 por otro lado regula negativamente la expresión de α actina de músculo liso (*ACTA2*) mediada por TGF β -1. Se han observado dos mecanismos por los cuales inhibe la transcripción de este gen, ya sea uniéndose a SMAD3 y evitando su interacción con elementos de unión de las SMAD y por otro lado se une a un elemento de control de TGF β -1 ubicado en el promotor del gen *ACTA2* (24).

La presencia de estas proteínas con dominios de dedos de zinc en distintos órganos y tejidos es fundamental en la morfogénesis del pulmón. La ausencia de alguna de ellas es letal en modelos murinos, lo que refuerza la importancia de su correcta expresión espacio-temporal y contexto específico en el pulmón, por tanto, la desregulación en la expresión de proteínas que intervienen en el desarrollo embrionario, puede conducir a enfermedades como la FPI (5).

2.4 PROTEINAS CON DOMINIOS DE DEDOS DE ZINC EN FIBROSIS PULMONAR

ZNF467

La participación de estas proteínas en fibrosis pulmonar es muy heterogénea y se han descrito moléculas con dedos de zinc con distintos motivos y dominios. Uno de estos genes fue identificado como diferencialmente expresado y metilado en un estudio global de metilación y expresión en pulmones de sujetos sanos y pacientes con FPI (25) y como ya se mencionó, la expresión de estos genes se encuentra reguladas tanto por mecanismos genéticos como epigenéticos. En este estudio se encontró a *ZNF467* también conocido como *EZI* subregulado e hipermetilado. *ZNF467* es una proteína con 12 dedos de zinc con motivos C2H2 y tiene un papel en la regulación de la actividad transcripcional de STAT3 y de PPAR γ las cuales participan en la patogénesis de la FPI (26,27).

ZNF467 regula la diferenciación de células madre mesenquimales a osteoblastos y adipocitos. *ZNF467* es regulado por la molécula Oncostatina M que es un ligando de la vía de JAK/STAT. En el caso de la señalización a través de la vía JAK/STAT3, Oncostatina M regula positivamente la expresión de *ZNF467*, mientras que la regulación de la expresión de este factor es negativa en el contexto de la diferenciación de células troncales mesenquimales, inhibiendo la diferenciación hacia adipocitos y favoreciendo la diferenciación a osteoblastos (28,29).

Estos hallazgos apoyan el concepto de que la regulación de esta proteína con dedos de zinc es contexto y tipo celular específico. Aunado a lo anterior, la subexpresión de *ZNF467* evita la transcripción de genes que participan en la adipogénesis como PPAR γ , que como ya se ha visto tiene un probable papel anti-fibrosante (25). Por lo tanto, correlacionando el trabajo de Sanders y colaboradores con el papel de *ZNF467* en la regulación positiva de PPAR γ , es de esperarse que, si el primero se

encuentra hipermetilado y sub expresado, afecte negativamente la expresión de *PPAR γ* y éste no pueda cumplir con su función anti-fibrosante (25,27).

De manera interesante, se ha visto que otras proteínas con dedos de zinc regulan la adipogénesis a través de la regulación de *PPAR γ* como por ejemplo ZNF638, SLUG, GATA2 y GATA3 (11).

EGR-1

Existen otros factores como EGR-1 (respuesta temprana de crecimiento-1), el cual pertenece al grupo de proteínas con motivos C2H2. Este es un factor transcripcional con dominios de unión a ADN constituidos por tres dedos de zinc que forman dos hojas beta plegadas y una alfa hélice y reconocen secuencias ricas en GCs, además de contener secuencias de aminoácidos que funcionan como “linkers” o uniones entre los dedos de zinc. Este factor se encuentra involucrado en procesos fibrosantes en piel y en pulmón, en donde se ha descrito que es capaz de regular la respuesta inflamatoria y fibrosante en modelos murinos de escleroderma y fibrosis pulmonar inducidos por bleomicina. Los ratones deficientes de *EGR-1* presentan una menor respuesta inflamatoria en el modelo murino de fibrosis dérmica y pulmonar, así como una baja expresión y respuesta al TGF β -1 (30).

Está estrechamente relacionada en la regulación de la respuesta al TGF β -1 en fibroblastos de piel y pulmón e induce la expresión y síntesis de varias moléculas profibróticas como son, COL1 α 2, PDGF, CTGF, VEGF, PAI-1, FN, OPN, TIMP-1 y TGF β -1. La transcripción de este factor mediada por TGF β -1 es independiente de la vía canónica y en cambio es dependiente de la vía de ERK1/2 y ELK-1 (31).

Existen otras vías profibrosantes que participan en la regulación de este factor como IGFBP-5. La vía de las MAPKs regula positivamente la expresión de *IGFBP-5*, el cual induce la expresión de colágena a través de su interacción con EGR-1. Otra vía importante en su regulación es la de c-ABL en donde se ha observado que la presencia de EGR-1 es indispensable para la producción de colágena mediada por c-ABL. Aparte de inducir la transcripción de los genes profibróticos, EGR-1 aumenta la expresión de la proteína acetil transferasa p300 a través de la señalización por TGF β , la cual funciona como una proteína co-activadora y a su vez es esencial en la transcripción de genes profibróticos mediado por la vía canónica de las SMAD (31).

SHH

En el contexto de FPI, existen diversos trabajos que señalan la importancia de estas moléculas en la patogénesis y el desarrollo de la enfermedad incluyendo su estímulo a la proliferación, migración, producción de moléculas de matriz extracelular, y una mayor resistencia a la apoptosis (32).

Asimismo, favorece la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos ya que en el factor transcripcional GLI1 existen sitios de unión al promotor del gen de *ACTA2*. La expresión del factor transcripcional GLI se ha observado en fibroblastos de pulmón de ratones con fibrosis inducida por bleomicina y en fibroblastos y en células de pacientes con FPI.

La molécula SHH se expresa primordialmente en células epiteliales en el pulmón, las cuales la secretan y ocurre una comunicación paracrina con células

mesenquimales, particularmente con fibroblastos, los cuales aumentan la expresión de moléculas como PTCH-1 y GLI 1 en respuesta al ligando lo que promueve los efectos anteriormente descritos en los fibroblastos. De forma interesante se ha descrito un asa de retroalimentación positiva en la regulación transcripcional entre TGF β -1 y SHH. Por un lado, la señalización mediada por TGF β -1 incrementa la expresión y síntesis de SHH en células epiteliales, y tiene un impacto directo en los fibroblastos aumentando la expresión de TGF β -1 lo cual conlleva a un aumento en la síntesis de moléculas de matriz extracelular. (32,33).

GATA6

GATA6 participa en el desarrollo del pulmón y se encuentra expresado principalmente en el epitelio distal, donde se ha descrito su participación en la diferenciación de neumocitos tipo II a neumocitos tipo I. La inmunolocalización de esta molécula en pulmones de pacientes con FPI es principalmente en el epitelio alveolar y en focos de fibroblastos, donde colocaliza con la proteína de α SMA. Asimismo, la transfección de la proteína GATA6 recombinante de humano en células epiteliales de pulmón (A549, la cual es una línea celular derivada de adenocarcinoma de pulmón) *in vitro* provoca un aumento en la expresión de α SMA. A su vez, GATA6 se sobre expresa por efecto del TGF β -1 en células A549, con el subsecuente aumento de α SMA y una disminución en la expresión de E-caderina, sugiriendo de esta forma su participación en el proceso de transición epitelio mesénquima. Por otro lado, el silenciamiento de GATA6 en fibroblastos pulmonares humanos promueve la disminución en la expresión de α SMA, colágena tipo I y

fibronectina, sugiriendo su participación como una molécula profibrosante tanto en el compartimiento epitelial como en el mesenquimal (34).

ZNFs recombinantes

Como se mencionó previamente, existen ZNFs modificados artificialmente para regular la actividad transcripcional y con los que a su vez se controla la especificidad de unión a los promotores de ciertos genes. A estos ZNFs se les puede acoplar una endonucleasa para realizar los cortes necesarios para la edición génica. En este sentido, se ha publicado un estudio que aborda la modificación del gen que codifica para la enzima telomerasa hTERT (human telomerase reverse transcriptase) mediante la unión de distintos ZNFs modificados de forma artificial al promotor y al exón 1 (35). HTERT es una proteína que regula la longitud de los telómeros y su expresión se activa en algunos contextos celulares como ciertos tipos de estrés e inestabilidad genómica, y además está involucrada en procesos tumorales. De manera importante, se han demostrado varias mutaciones en esta enzima en pacientes con FPI familiar o hereditaria, lo que resulta en acortamiento exagerado del largo de los telómeros (36). Este tipo de ZNFs modificados artificialmente pueden tener una potencial aplicación en la modificación de moléculas como HTERT.

ZC3H4 (Zinc finger CCCH-type containing 4 protein)

Fuera del contexto de la FPI, existen otros tipos de fibrosis pulmonar ocasionados por la inhalación de partículas orgánicas e inorgánicas, como la ocasionada por la inhalación de partículas de sílice (SiO₂), condición conocida como silicosis. En este

contexto, se ha reportado (37) que ZC3H4 contribuye al desarrollo de la fibrosis pulmonar inducida por partículas de sílice a través de la transición epitelio mesénquima *in vitro* e *in vivo* mediado por el estrés del retículo endoplásmico. Además, se observó una mayor migración de células epiteliales alveolares expuestas a SiO₂. Por otro lado, el ARN mensajero de esta molécula se encontró sobre expresado en células epiteliales alveolares en este modelo experimental, el cual puede modificar su conformación a un ARN circular que funciona como un ARN esponja para *miR-212*, promoviendo su autorregulación. A su vez en este estudio se confirmó la expresión de esta molécula en células epiteliales alveolares en tejidos de pacientes y ratones expuestos a partículas de SiO₂ (37).

2.5 ZNF365

La proteína ZNF365, tiene 4 isoformas descritas (38), aunque posiblemente existan más. El gen que codifica para esta proteína se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 (10q21.2). La proteína contiene un dominio C2H2 de dedos de zinc en el extremo amino terminal, una región enrollada en la porción central y una porción desordenada en el extremo carboxilo terminal (Figura 6). La función de esta proteína esta poco descrita en la literatura, con sólo 5 artículos presentes en PubMed. Recientemente se ha descrito que es uno de los genes mayormente sobre expresados por el efecto del TGF β en fibroblastos derivados de pulmones sanos y de sujetos con FPI es ZNF365, que es una proteína con dominios de dedos de zinc de la familia C2H2 (39-41). A la fecha, existen muy pocos estudios acerca del papel fisiológico o patológico de *ZNF365* (también conocido como *KIAA0844*, *DISC-1*,

SU48, *UAN* o *DBZ*). En un estudio, se describió su papel en el restablecimiento de la replicación del ADN, asociándose físicamente con la Poli ADP ribosa polimerasa 1 PARP1 y con la exonucleasa MRE11 en horquillas de replicación que han quedado detenidas por efecto de dobles rupturas de cadena y algunos polimorfismos de este gen se asocian con un incremento en el riesgo a desarrollar cáncer de mama (39) (Figura 7). Asimismo, su transcripción y expresión es inducible por la proteína p53 y ayuda al mantenimiento de la integridad de telómeros, evitando de esta manera aneuploidías e inestabilidad cromosómica (42). Se ha sugerido que ZNF365 participa en el ciclo celular dada su asociación con centrómeros y su co-localización con γ tubulina en las distintas etapas del ciclo celular. Su presencia es importante para evitar que se formen múltiples centrosomas y que ocurran fallas en las divisiones mitóticas, aneuploidías e inestabilidad genómica (43). Por otro lado, en modelos murinos desempeña un papel fundamental en la migración de neuronas de las zonas subventriculares del cerebro hacia la placa cortical. En este contexto, el silenciamiento de *ZNF365* con ARNhcs en etapas tempranas del desarrollo embrionario, resulta en defectos en la migración de neuronas (44). Sin embargo, en modelos murinos deficientes en la expresión de esta molécula en la vida adulta, no se ha observado un fenotipo evidente (45).

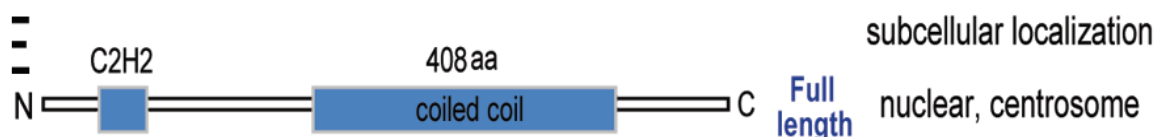


Figura 6 Esquema de la estructura de la proteína ZNF365. Se muestra el dominio C2H2 de la proteína en la porción amino terminal, así como la región enrollada en la porción central de la proteína. Podemos apreciar los compartimientos subcelulares en donde podemos encontrar a la proteína. (Tomada de Zhang Y, et al., 2013).

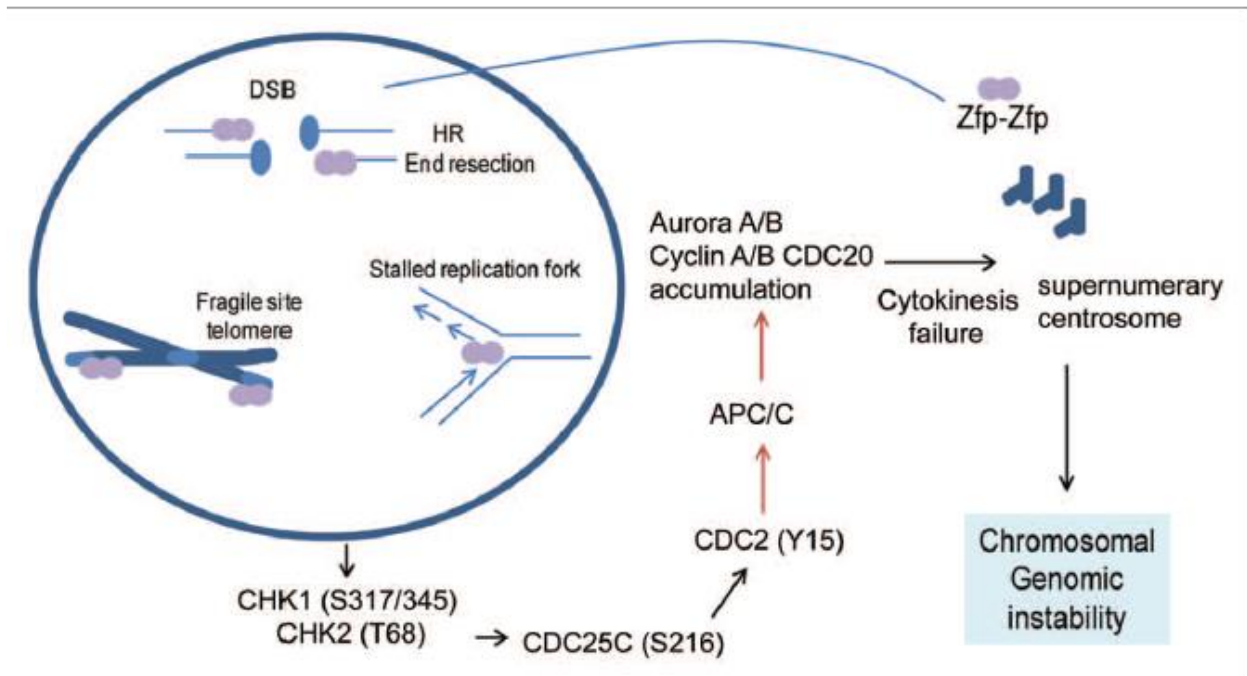


Figura 7 Diagrama esquemático de una de las funciones conocidas de ZNF365. ZNF365 se une físicamente a PARP1 y atrae a MRE11 a las zonas de resección del ADN para la resolución oportuna de las horquillas de replicación detenidas. La pérdida de ZNF365 resulta en una replicación incompleta y un incremento en la respuesta de “*checkpoint*” del ciclo celular, lo que lleva a un retraso en la progresión de la mitosis, falla en citocinesis, centrosomas supernumerarios y un incremento en la aneuploidía. (Tomada de Zhang Y, et al., 2013).

En análisis de expresión global de genes realizado en nuestro laboratorio y por un grupo independiente, se encontró a *ZNF365* como uno de los genes mayormente sobre expresados por el efecto del TGF β -1 sobre fibroblastos humanos (40,41).

Las proteínas con dedos de zinc presentan una amplia variedad de funciones dentro de la célula, ya que pueden asociarse a una gran cantidad de biomoléculas. Sumado a esto, las proteínas ZNFs con multidominios, presentan una mayor complejidad debido a la enorme cantidad de interacciones posibles. Muchas de estas proteínas participan en la morfogénesis de órganos y tejidos como el pulmón actuando como factores transcripcionales. Algunos de estos factores son esenciales en escenarios fisiológicos, mientras que la desregulación en su expresión favorece procesos

patológicos como la FPI. En este sentido, ZNF365, se encontró sobre expresado en estudios independientes por efecto del TGF β -1 en fibroblastos derivados de pacientes con FPI y sujetos controles (40,41). Aparte del papel de esta molécula en la estabilidad genómica, se desconoce el papel que tiene en FPI, así como gran parte de sus funciones celulares.

3. JUSTIFICACIÓN:

Debido a que ZNF365 es una de las moléculas mayormente sobre expresadas en fibroblastos pulmonares por efecto del TGF β 1, mismo que es uno de los orquestadores por excelencia de la fibrosis pulmonar, consideramos importante conocer el papel que juega esta molécula en esta patología.

4. HIPÓTESIS:

Al ser ZNF365 una molécula esencial en la reparación de daños al ADN, la deficiencia en la expresión de la misma provocará un aumento en el estrés celular en fibroblastos y células epiteliales A549, además de un proceso fibrótico exacerbado en el modelo murino de fibrosis pulmonar experimental, lo cual puede ser atribuido a un posible papel protector para el desarrollo de esta patología.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de *ZNF365* en fibroblastos pulmonares humanos y en células epiteliales alveolares, su localización en tejidos pulmonares derivados de controles sanos, pacientes con FPI y ratones del modelo murino de fibrosis pulmonar, así

como establecer su función y su relación con la senescencia en los tipos celulares señalados mediante su silenciamiento y en el modelo de fibrosis pulmonar experimental desarrollado en ratones deficientes de *Zfp365*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar y confirmar la sobre expresión de ZNF365 inducida por la acción del TGF β 1 en fibroblastos pulmonares humanos comparados con fibroblastos no estimulados. Evaluar la expresión de ZNF365 en células epiteliales alveolares (A549) estimuladas con TGF β 1 comparadas con aquellas no estimuladas.
- Identificar en tejidos de FPI y controles y en el modelo murino de fibrosis pulmonar a las células que expresan ZNF365.
- Estudiar cómo afecta el silenciamiento de ZNF365 a la tasa de crecimiento, la tasa de apoptosis y el proceso de senescencia en fibroblastos pulmonares humanos y células epiteliales A549.
- Evaluar el papel de *Zfp365* en la respuesta pulmonar fibrosante inducida por bleomicina en pulmones de ratones WT y deficientes de *Zfp365*^{-/-}.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención y cultivo de fibroblastos de pulmón humano

Se utilizaron fibroblastos de pulmones humanos obtenidos tanto de donadores sanos como de pacientes con FPI, previo consentimiento informado por parte de todos los participantes. Asimismo, el protocolo de investigación fue aprobado por los Comités de Bioética, Bioseguridad e Investigación del Instituto Nacional de

Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (Código de identificación #B15-18). El diagnóstico de FPI fue realizado por el Programa de Enfermedades Intersticiales del Pulmón de acuerdo con las guías emitidas por ATS/ERS/ALAT.

Los cultivos primarios de fibroblastos fueron utilizados entre los pasajes 4 al 11. Adicionalmente, se utilizaron las líneas celulares de fibroblastos de pulmón normal, NHLF (Lonza Clonetics, #CC2512), LL24 (American Type Culture Collection ATCC #CCL-151), HPF (Promocell, #C12360). La línea celular HPF fue utilizada para los experimentos de ensayos funcionales y senescencia. La línea celular de epitelio alveolar humano A549 fue obtenida de ATCC (#CCL-185).

Las células se cultivaron en medio HAM F12 (Gibco) suplementadas suero fetal bovino al 10% y 1% de antibiótico/antimicótico (Sigma) dentro de una incubadora con 5% de CO₂, 3% de O₂ y 95% aire y a 37°C como se ha descrito previamente (40).

6.1.1 Estimulación con TGFβ-1 y doxorrubicina.

Se sembraron fibroblastos y células A549 a una confluencia del 70% (28,000 y 140,000 células por cm², respectivamente). Posteriormente, los fibroblastos fueron privados de suero fetal bovino durante 24 horas y las células A549 durante 48 horas antes de ser estimulados con TGFβ-1 (R&D, #100-B/CF) a una concentración de [10 ng/ml] durante 24 horas, diluido en medio HAM F12 con suero fetal bovino (0.1%). Para los estímulos con doxorrubicina (Sigma, #D1515), se sembraron fibroblastos y células A549 a una confluencia del 50%. Después de 24 horas, el medio fue removido y reemplazado por medio HAM F12 con suero (2% para células

A549 y 1% para fibroblastos) en el cual se añadió la doxorrubicina a una concentración de [1.25 μ M] durante 48 horas.

6.1.2 Silenciamiento de ZNF365

Se utilizó un pool de ARNpis (Origene SR307854) el cual contiene 3 duplex específicos para *ZNF365* y un *scramble* (control). Los fibroblastos y las células epiteliales alveolares A549 se sembraron en placas de 6,12, 24 y 96 pozos a una confluencia máxima del 70% (28,000 y 140,000 células por centímetro cuadrado, respectivamente). Los ARNpis y secuencias scrambled se mezclaron con lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen, #13778075) a una concentración de [20 nM]. Las células se utilizaron para extracción de ARN y proteína, así como para ensayos funcionales de medición de tasa de crecimiento y ensayos de β -galactosidasa.

6.1.3 Ensayo de β galactosidasa asociada a senescencia

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos previamente tratados con una mezcla de HCl y H₂SO₄ 1:1 y posteriormente fueron fijadas y teñidas con un kit que mide la actividad de la β galactosidasa, de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Cell Signaling, #9860). Los núcleos fueron contrateñidos con hematoxilina. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio invertido (Nikon) y fueron visualizadas con el software NIS-Elements. Finalmente, se contaron las células positivas para la actividad de β -galactosidasa y se dividieron entre el total de células presentes en 10 campos aleatorios con dos réplicas técnicas.

6.1.4 Ensayo de tasa de crecimiento con WST-1

Se sembraron células epiteliales alveolares de pulmón humano A549 (2×10^3 células/pozo o 140,000 células por cm^2) y fibroblastos humanos de pulmón normal (5×10^3 células/pozo o 28,000 células por cm^2) en placas de 96 pozos con una mezcla de ARNpis específicos o secuencias revueltas. Las células se incubaron con el reactivo WST-1 (Roche, #05015944001) por dos horas en fibroblastos y una hora en células A549 de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se midió la absorbancia a las 24, 48, 72 o 96 horas en un equipo Synergy (Biotek) a una longitud de onda de 450 nm y otra de referencia de 620 nm.

6.1.5 Ensayo de apoptosis

Células epiteliales alveolares A549 silenciadas para ZNF365 por 24 horas previas se estimularon con 30 mU/ml de bleomicina (Cayman) en medio Ham F12 sin suero durante 48 horas. Los fibroblastos humanos de pulmón normal, silenciados para ZNF365 por 48 horas previas se estimularon con estaurosporina [0.1 y 0.5 μM] durante 1 hora. Posteriormente las células fueron cosechadas y teñidas con PE Anexina V (BD, Biosciences, #AB_2869071) y 7-actinomicina D (7AAD, Biolegend, #420403). Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSAria (BD, Biosciences). Los resultados fueron analizados con el software FlowJo 7.8 (Becton Dickinson and Company).

6.2 Inmunohistoquímica

Los tejidos de pulmón humano de controles sanos, pacientes con FPI y de ratón se procesaron como se describe brevemente. Se desparafinaron con Xilol y posteriormente se rehidrataron con un gradiente de alcoholes y agua. Posteriormente se utilizó peróxido de hidrógeno diluido en metanol para eliminar la peroxidasa endógena (30 minutos) y se desenmascaró el antígeno utilizando buffer de citratos PH 6 en un horno de microondas. Los tejidos se trataron con bloqueador con bloqueador universal (Biogenex) por 10 minutos y posteriormente se usó suero de borrego (Biogenex) durante 30 minutos. Se incubaron con el anticuerpo primario (Thermo Scientific PA5-40514 (1:50)) toda la noche a 4°C. Al otro día se dejaron en presencia del anticuerpo secundario biotinilado durante 20 minutos (Biogenex) y posteriormente se incubaron durante 20 minutos con la streptavidina-HRP (Biogenex). Se revelaron utilizando el buffer de acetatos con 0.05% de peróxido de hidrógeno y el cromógeno (3-amino-9-ethyl-carbazole, AEC Biogenex). Posteriormente se hizo la contra tinción con hematoxilina y fueron montadas con medio de montaje Cristal Mount (Biomeda). Las laminillas se visualizaron utilizando un microscopio Nikon con el software NIS-Elements AR. Para los controles negativos se sustituyó el anticuerpo primario por suero de borrego.

6.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Se hizo la extracción del ARN utilizando Trizol (Invitrogen, #15596026). Se tomó 1 µg de ARN, el cual se utilizó para la RT-PCR usando el kit Verso cDNA Synthesis (Thermo Scientific, AB1453A). La qPCR se llevó a cabo usando sondas taqman específicas (Applied Biosystems) para *ZNF365* (Hs00921620_m1), *Zfp365*

(Mn00618458_m1), 18S (Hs03003631_g1) y *POLR2A* (Hs00172187_m1), *COL1A1* (Hs00164004_m1), *COL3A1* (Hs00943809_m1); así como los primers indicados en (Tabla #2 en el apéndice), junto con el reactivo SybrGreen (ThermoFisher Scientific). Se utilizó un termociclador Lightcycler 480 (Roche) y un termociclador QuantStudio 6 (ThermoFisher Scientific) y los datos se analizaron mediante el método 2- Δ Ct.

6.4 Extracción de proteínas y Western Blot

Se obtuvieron lisados totales de fibroblastos humanos y células A549 utilizando el buffer de lisis RIPA (Sigma, #R0278). Posteriormente, las proteínas fueron cuantificadas utilizando el reactivo Bradford (BioRad, #5000006) y cargadas (entre 30 y 40 μ g) en condiciones desnaturizantes en geles SDS/PAGE de poliacrilamida al 10% o al 12%. Al finalizar la electroforesis, las proteínas fueron transferidas en membranas de nitrocelulosa (BioRad) y bloqueadas con leche sin grasa al 2% (BioRad) diluida en buffer TBS-T al 0.05% durante 1 hora. Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C utilizando los siguientes anticuerpos: ZNF365 (Abcam, ab157459 (1:500) y ab22890 (1:200)), PARP1 (Cell Signaling, 46D11 (1:500)), p21 (Santa Cruz, sc-6246 (1:500)), γ H2AX (Abcam, ab81299 fosforilación de S139 (1:500)), p53 (R&D, AF1355 (1:2000)), β actina (Sigma Aldrich, AC-74 (1:10000)) y GAPDH (Thermo Scientific, PA-987 (1:2000)). Después de lavar con TBS-T y de incubar por una hora a TA con los anticuerpos secundarios acoplados a HRP correspondientes, las membranas fueron reveladas con Luminol SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) usando un

fotodocumentador ChemiDoc Gel Documentation System (BioRad). Las fotos fueron analizadas con el software Image Lab (BioRad) y se realizaron los análisis densitométricos correspondientes.

6.5 Modelo experimental de fibrosis pulmonar inducido con bleomicina en ratones WT y KO

El protocolo seguido en el estudio estuvo apegado a las guías y regulaciones para el cuidado animal y fue aprobado por el Comité de Bioética del INER (Código de identificación: B-1518, con fecha de octubre de 2018). Los ratones con el alelo modificado (EM8383, C57BL/6nTac-Zfp365^{tm1a(KOMP)Wtsi/WtsiOrl}), fueron adquiridos del Wellcome Trust Sanger Institute (Genome Research Limited). Brevemente, el exón 2 es eliminado cuando estos ratones se cruzan con ratones que expresan a la Cre recombinasa, ya que este exón se encuentra flanqueado por sitios Lox P. De esta manera se genera el alelo Tm1b (46-49).

Los ratones silvestres de la cepa C57BL/6 (WT) *Zfp365*^{-/-}, fueron tratados con una instilación intratraqueal de 40 µl de solución salina o bleomicina (Cayman, 4.66 mg/kg de peso corporal) y fueron sacrificados a los 21 días. Utilizamos ratones macho y hembras de entre 9 y 10 semanas de edad. Los pulmones del lado derecho fueron fijados con paraformaldehído al 4% para posteriormente ser teñidos con hematoxilina y eosina, así como la técnica de Tricrómica de Masson. Se les asignó un código a las laminillas y fueron revisados y calificados por un patólogo de manera ciega para determinar la severidad y la extensión de la fibrosis, como ha sido descrito previamente (50).

6.5.1 Cuantificación de hidroxiprolina

El pulmón izquierdo fue hidrolizado con HCl 6 N por 24 horas a 110°C. La determinación del contenido de hidroxiprolina se realizó como se ha descrito previamente (51). Brevemente, las alícuotas del hidrolizado fueron mezcladas utilizando la solución de Cloramina T (Sigma), seguido del reactivo de Erlich. Cada muestra fue cuantificada por duplicado. Los datos se expresan como µg de hidroxiprolina/pulmón izquierdo.

6.5.2 Cuantificación del score de fibrosis (Ashcroft)

Los tejidos pulmonares fueron teñidos con hematoxilina, eosina y con la técnica de Tricrómica de Masson. Fueron calificados de manera ciega para determinar la severidad, la extensión de las lesiones y el porcentaje de fibrosis como se ha descrito previamente (50). El score de fibrosis fue determinado multiplicando la extensión de la lesión por el porcentaje de fibrosis y por el grado de severidad.

6.6 Análisis de expresión *in silico* en la página de IPF Cell Atlas.

En la página web de IPF Cell Atlas, <http://ipfcellatlas.com>, se hizo la búsqueda del transcrito de *ZNF365* en el buscador principal. Se compararon los estudios de Kaminski/Rosas y de Misharin para células epiteliales. Para células mesenquimales se compararon los estudios de Kaminski/Rosas y de Lafyatis.

6.7 Análisis de expresión de ARN de célula única.

Los datos de expresión fueron descargados de GEO con el número de acceso GSE136831 (52), los cuales fueron anotados previamente. Se utilizó el software R,

versión 4.1.0. (53), con la versión de Bioconductor 3.13. (54). Realizamos la normalización, el escalamiento, análisis de componentes principales y la aproximación y proyección uniforme de Manifold (UMAP), usando la versión 4.1.1. del paquete Seurat (55). Las gráficas se hicieron utilizando ggplot2 versión 3.3.6. (56).

6.8 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 8.0. Todos los datos se expresan como la media +/- la desviación estándar, excepto en el análisis de cuantificación de hidroxiprolina en donde se toma la media +/- el error estándar de la media. La prueba no pareada de t de Student con corrección de Welch, así como la ANOVA de dos vías con corrección de Bonferroni fueron realizadas como se indica en el pie de figura de cada experimento. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

7. Resultados

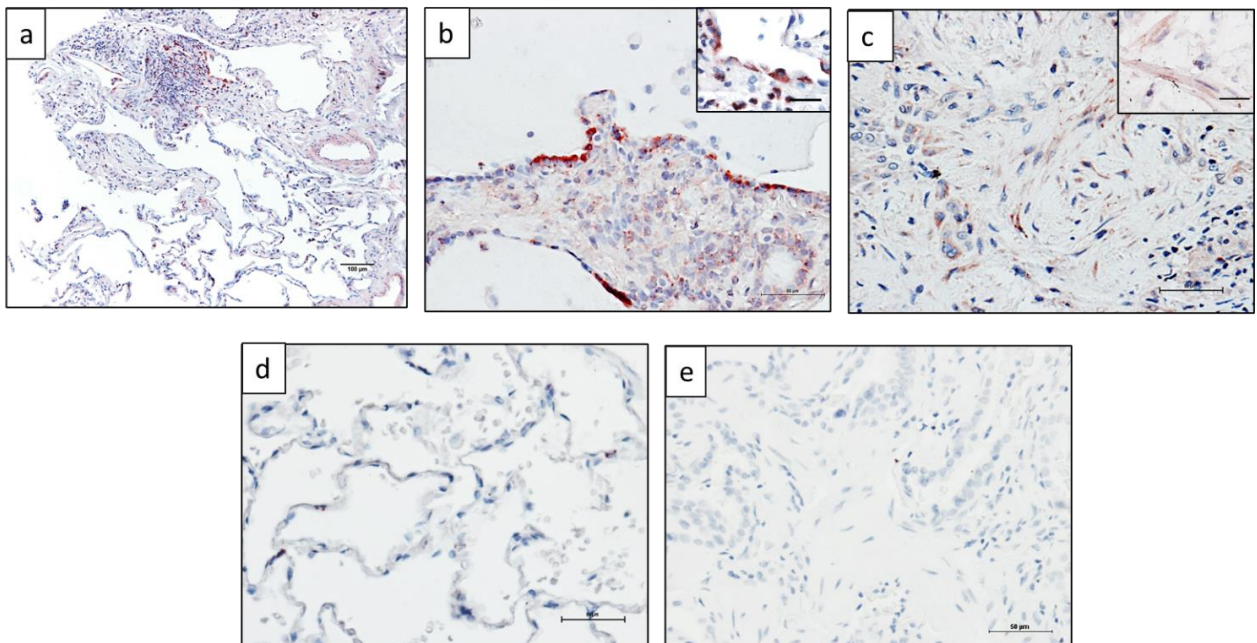
7.1 La proteína ZNF365 está aumentada en el pulmón de pacientes con FPI

Para conocer la localización de esta molécula en FPI, se determinó la localización de ZNF365 en tejidos derivados de pacientes con FPI y de sujetos controles sanos mediante la técnica de inmunohistoquímica. Como se muestra en la Figura 8A, en los paneles a, b y c, la inmunorreactividad de ZNF365 se encontró presente en células epiteliales alveolares que se encuentran en los márgenes de un espacio quístico (b), así como en fibroblastos localizados en un foco de fibroblastos/miofibroblastos en pulmones de FPI (c). Por el contrario, en tejidos de

pulmón normal, la expresión de ZNF365 no se encontró (d). No hubo tinción cuando se omitió el anticuerpo primario (control negativo, e). Estos resultados muestran una tinción positiva e intensa de ZNF365 en pulmones de pacientes con FPI y que su localización ocurre predominantemente en fibroblastos presentes en focos de fibroblastos y en células epiteliales alveolares, lo cual podría indicar un aumento en la expresión.

Por otro lado, un análisis *in silico* del atlas transcripcional de célula única en FPI (52, 57-59), corroboró que ZNF365 se expresa primordialmente en fibroblastos, miofibroblastos, células epiteliales alveolares tipo 1 y 2, así como ciertas subpoblaciones “raras” de fibroblastos y células epiteliales alveolares (Figura 8B). Estos resultados refuerzan lo que observamos en los tejidos derivados de pacientes con FPI, donde de manera importante, pudimos observar la expresión de esta molécula en los principales efectores celulares de esta patología.

A



B

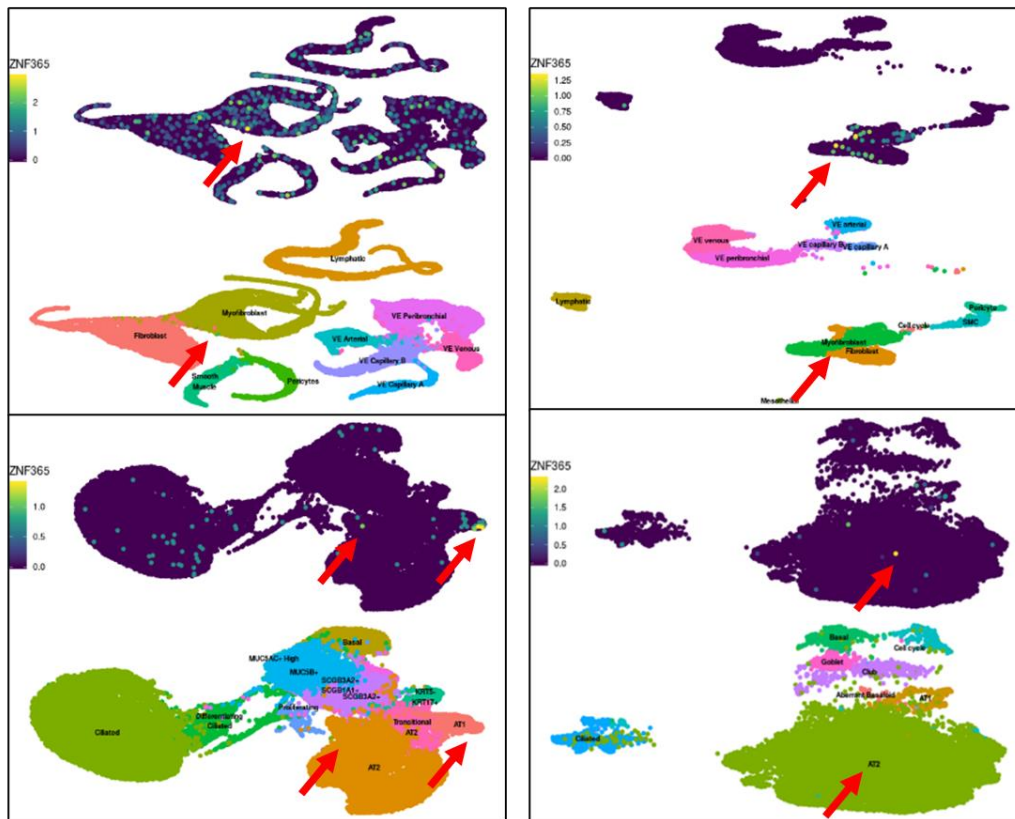


Figura 8. ZNF365 se expresa en pulmones de FPI.

(A) ZNF365 se encuentra sobre expresado en pulmones de pacientes con FPI, (a) (escala 100 μ m). ZNF365 se localizó en células epiteliales alveolares (b) y en focos de fibroblastos (c) (escalas 50 μ m y recuadro 25 μ m). (d) Inmunotinción de pulmón de un donador sano (escala 50 μ m). (e) Pulmón de FPI sin el anticuerpo primario (escala 50 μ m). Imágenes representativas de pulmones de FPI (n=5) y de sujetos controles sanos (n=2). B) Expresión de *ZNF365* de acuerdo con experimentos de secuenciación de ARN de célula única del Atlas de FPI (<http://ipfcellatlas.com/>). En los paneles superiores, las flechas señalan la expresión de *ZNF365* en fibroblastos y miofibroblastos. En los paneles inferiores, las flechas señalan la expresión de *ZNF365* neumocitos tipo I y tipo II.

7.2 Zfp365 está sobre expresado en los pulmones de ratón con fibrosis pulmonar inducido por bleomicina

Dadas nuestras observaciones sobre un aumento en la señal positiva de la expresión de ZNF365 en pulmones de pacientes con FPI, nos cuestionamos si hubiese alguna similitud en el modelo murino de fibrosis pulmonar experimental, por lo que evaluamos la expresión de *Zfp365*, gen ortólogo de *ZNF365*, en pulmones de ratón por RTqPCR, así como la expresión y localización de la proteína por inmunohistoquímica en ratones después de la inducción de fibrosis pulmonar por bleomicina, encontramos un incremento significativo en la expresión de *Zfp365* en pulmones derivados de ratones instilados con bleomicina a los 21 días (1.85 veces) ($p < 0.001$) (Figura 9A). Asimismo, corroboramos la localización de la proteína por inmunohistoquímica (Figura 9B). *Zfp365* se encontró localizada en los pulmones de ratones con fibrosis inducida por bleomicina en células epiteliales alveolares, células bronquiales y algunas poblaciones de células estromales (a,b). *Zfp365* se halló prácticamente ausente en pulmones de ratones instilados con solución salina (c). Ninguna señal se mostró cuando el anticuerpo primario específico estuvo ausente (d). Estos hallazgos corroboran nuestras observaciones en la enfermedad en el humano, y confirman que ZNF365 está presente en el pulmón durante el proceso fibrosante.

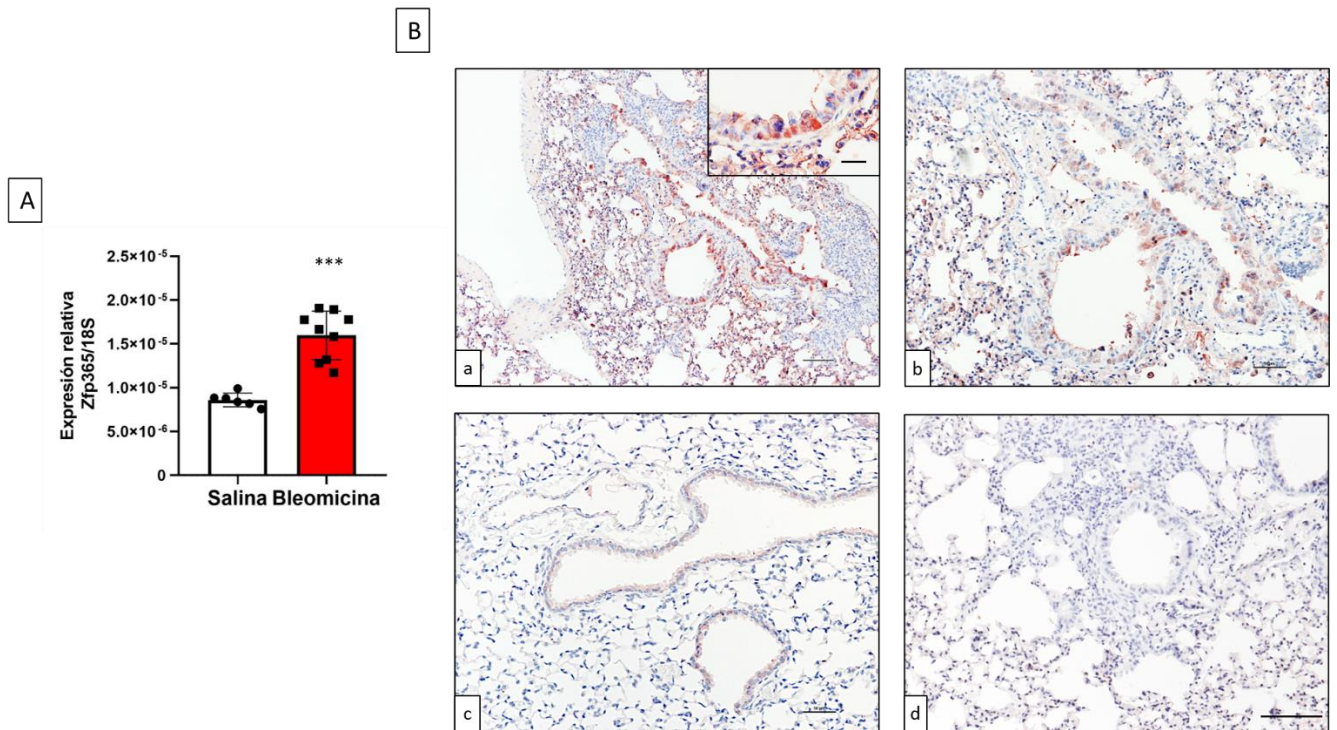


Figura 9. Zfp365 se encuentra sobre expresada en pulmones de ratones tratados con bleomicina a los 21 días. (A) La expresión de *Zfp365* por RTqPCR en pulmones de ratones instilados con bleomicina (n=9) o solución salina (n=6). La gráfica representa la media +/- la desviación estándar. ***p<0.001 mediante la prueba de *t* de Student de dos colas con corrección de Welch. (B) Inmunohistoquímica de tejidos pulmonares de ratones instilados con solución salina o bleomicina. (a,b) Los ratones tratados con bleomicina mostraron inmunorreactividad de *Zfp365* principalmente en células epiteliales alveolares y bronquiales, así como algunas poblaciones de células estromales (n=2). (escalas 100 μm, 50 μm, y el recuadro 25 μm). (c) Ausencia de señal positiva en pulmones de ratones control (n=2) (escala 50 μm). (d) Inmunotinción de pulmones en ratones instilados con bleomicina sin el anticuerpo primario (100 μm).

7.3 ZNF365 se sobre expresa en fibroblastos y células epiteliales A549 estimuladas con TGFβ-1

Para corroborar los resultados de sobre expresión de *ZNF365* obtenidos mediante el análisis de expresión global (40,41), tratamos a los fibroblastos derivados de sujetos controles y pacientes con FPI con TGF β -1 un factor profibrosante. Como se muestra en las Figuras 10A,B, *ZNF365* se sobre expresa significativamente tanto en el nivel de ARNm (Control, 5.06 veces; FPI, 3.87 veces) ($p < 0.05$) y también observamos un aumento de la proteína en fibroblastos de pulmón normal y de pacientes con FPI después de la estimulación con TGF β -1 [10 ng/ml] por 24 horas. Dado el antecedente en el cual observamos que *ZNF365* se encuentra sobre expresado en células epiteliales alveolares en pulmones de pacientes con FPI, decidimos evaluar la expresión de esta molécula en la línea celular A549, después de ser estimulada con TGF β -1. Como se muestra en las Figuras 10C,D, *ZNF365* se sobre expresa significativamente a nivel de ARNm (8.76 veces) ($p < 0.05$), así como un aumento en el nivel de proteína.

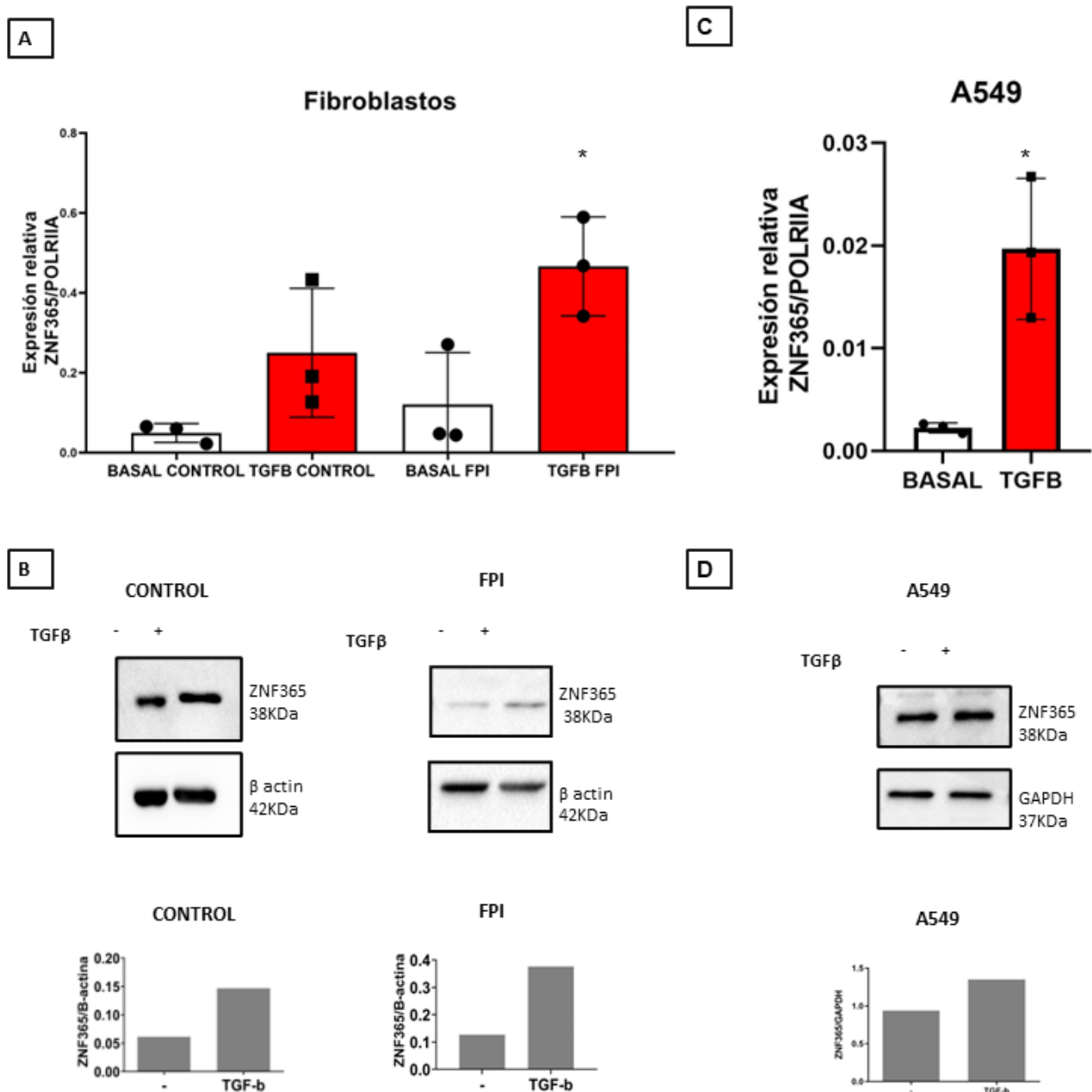


Figura 10. El TGFβ-1 induce la sobre expresión de ZNF365. (A) La expresión de *ZNF365* en fibroblastos control (n=3) y derivados de FPI (n=3) mediante RTqPCR después de ser estimulados con TGFβ-1 por 24 horas. (B) WB y el análisis densitométrico correspondiente; la β actina fue utilizada como control de carga interno. (C) La expresión de *ZNF365* en células A549 (n=3). (D) WB y el análisis densitométrico correspondiente; GAPDH fue utilizada como un control de carga interno. Los resultados mostrados están expresados como la media +/- la desviación

estándar de la media. * $p < 0.05$ mediante una prueba de t de Student de dos colas con corrección de Welch.

7.4 Los ratones *Zfp365*^{-/-}, presentan una respuesta fibrótica exacerbada en el modelo de fibrosis pulmonar experimental

Con el objetivo de entender el papel de *Zfp365* *in vivo*, ratones silvestres de la cepa C57BL/6 y ratones deficientes de *Zfp365*, fueron instilados intratraquealmente con bleomicina o solución salina como control. Después de 21 días, los ratones fueron sacrificados y los cambios histológicos, así como el contenido de hidroxiprolina fueron evaluados. Como se ilustra en la Figura 11A, los ratones deficientes de *Zfp365* instilados con bleomicina mostraron un incremento significativo en el contenido de hidroxiprolina comparados con los ratones silvestres (184.3 ± 58.8 vs. 135.2 ± 40.5 $\mu\text{g/pulmón izquierdo}$, $p < 0.05$) y también se observó mayor acumulación de fibras de colágena como lo indica la tinción con la técnica de Tricrómica de Masson (Figura 11B). El puntaje o calificación de fibrosis, obtenido mediante un score semicuantitativo, mostró una tendencia de incremento en los animales deficientes de *Zfp365*, aunque lo anterior no alcanzó significancia estadística, probablemente, debido a la heterogeneidad de las lesiones y el tamaño muestral (Figura 11C). En la Figura 11D, se muestra el silenciamiento de *Zfp365* en pulmones de ratones *Zfp365*^{-/-}, comparados con ratones silvestres. Estos resultados muestran un hallazgo inesperado, dados los resultados que muestran que los ratones WT instilados con bleomicina tienen una mayor expresión de *Zfp365*. Lo anterior podría representar un posible mecanismo protector y antifibrosante en el pulmón por parte de *Zfp365*.

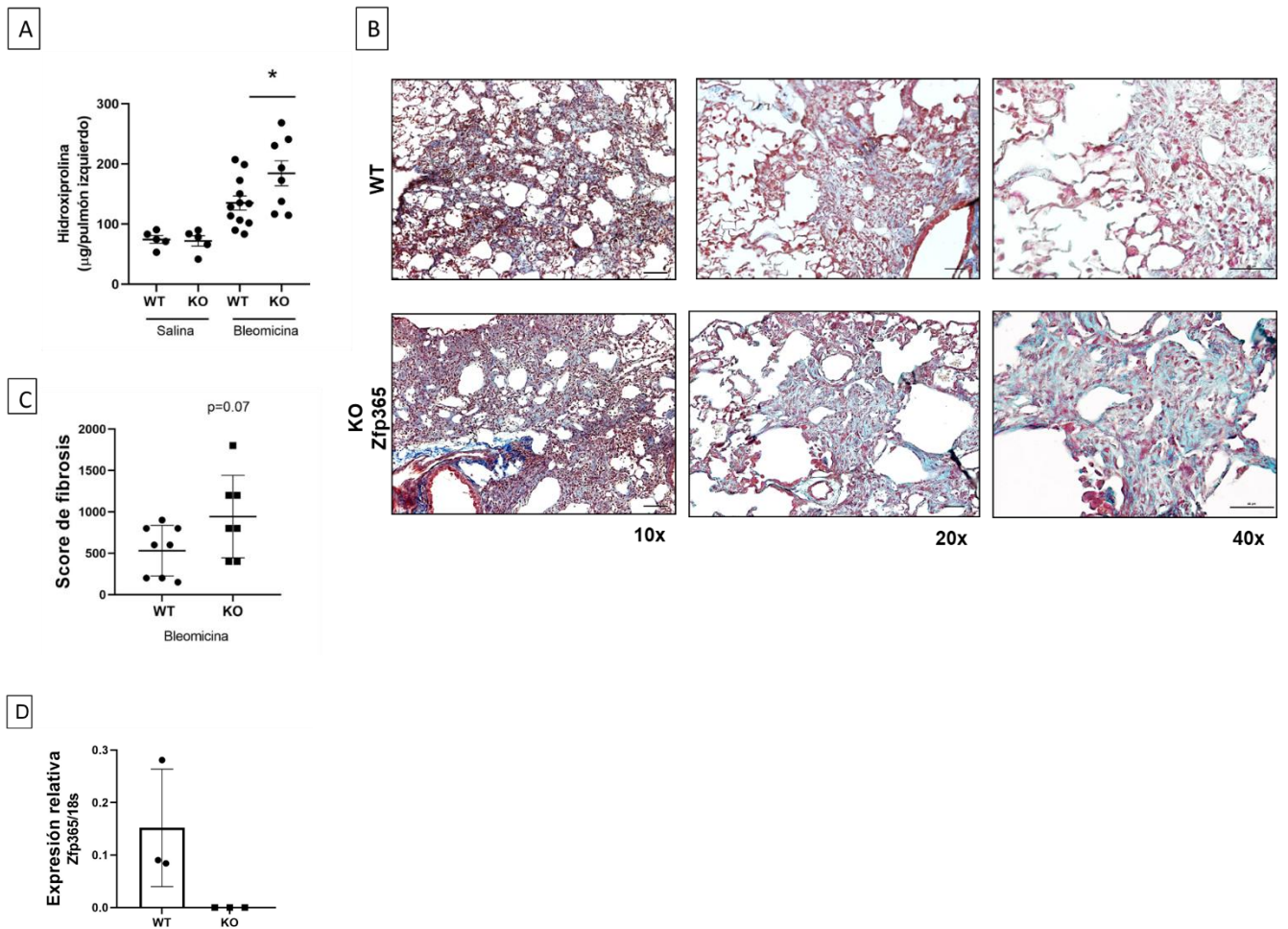
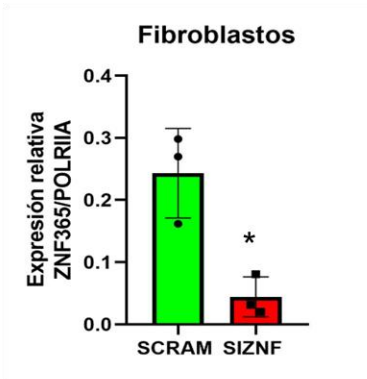
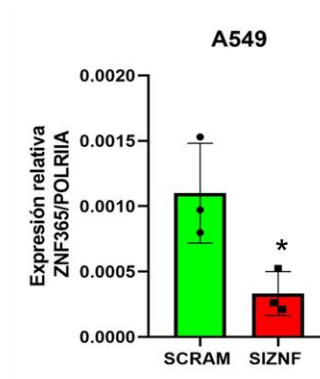
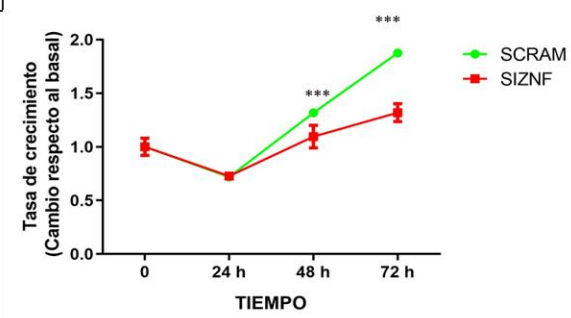
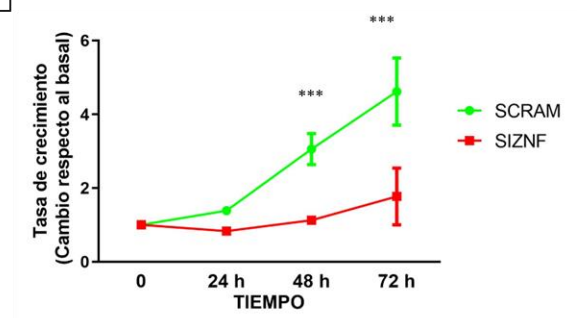


Figura 11. Una respuesta fibrótica exacerbada fue observada en ratones deficientes de *Zfp365*. (A) Contenido de hidroxiprolina en pulmón izquierdo 21 días posteriores a la instilación de bleomicina o solución salina en ratones KO (n=8) y WT (n=12). (B) Imágenes representativas de pulmones teñidos con Masson diferentes aumentos (escalas 100 y 50 µm). (C) *Score* de fibrosis relacionado con los cambios histopatológicos en los pulmones. D) Expresión de *Zfp365* en ratones KO (n=3). Los resultados mostrados están expresados como la media +/- el error estándar de la media. *t* de Student con corrección de Welch ($p < 0.05$).

7.5 El silenciamiento de ZNF365 promueve una disminución en la tasa de crecimiento en fibroblastos y células A549, que no se relaciona con un aumento en la apoptosis

Dados los resultados anteriores en donde observamos que los ratones *Zfp365*^{-/-} desarrollaron un aumento en la respuesta fibrosante al estímulo con bleomicina, decidimos evaluar el comportamiento de fibroblastos humanos de pulmón normal y células A549 después de silenciar esta proteína de dedos de zinc. Utilizando secuencias específicas de ARNpis, demostramos mediante RTqPCR que la expresión de *ZNF365* disminuyó significativamente a las 48 horas en ambos tipos celulares (Fibroblastos, 5.50 veces; A549, 3.31 veces) ($p < 0.05$) (Figura 12A,B). Después de silenciar, llevamos a cabo un ensayo para medir la tasa de crecimiento utilizando el reactivo WST-1 y observamos una disminución significativa en las células silenciadas para *ZNF365* a las 48 y 72 horas ($p < 0.001$) (Figura 12C,D). Tomando en cuenta que el ensayo de medición de la tasa de crecimiento involucra la proliferación y la muerte celular, medimos la tasa temprana y tardía de apoptosis utilizando la tinción con Anexina V y 7-AAD mediante citometría de flujo. Se utilizó un estímulo de estaurosporina [0.1 y 0.5 μM] por 1 hora, no se observaron diferencias significativas en fibroblastos humanos de pulmón normal silenciados para *ZNF365* (Figura 12E,F). Asimismo, después de un estímulo apoptótico con bleomicina (30 mU) por 48 horas, no se encontraron diferencias significativas en células A549 silenciadas para *ZNF365* comparadas con aquellas que tenían las secuencias revueltas (Figura 12G,H).

A**B****C****D**

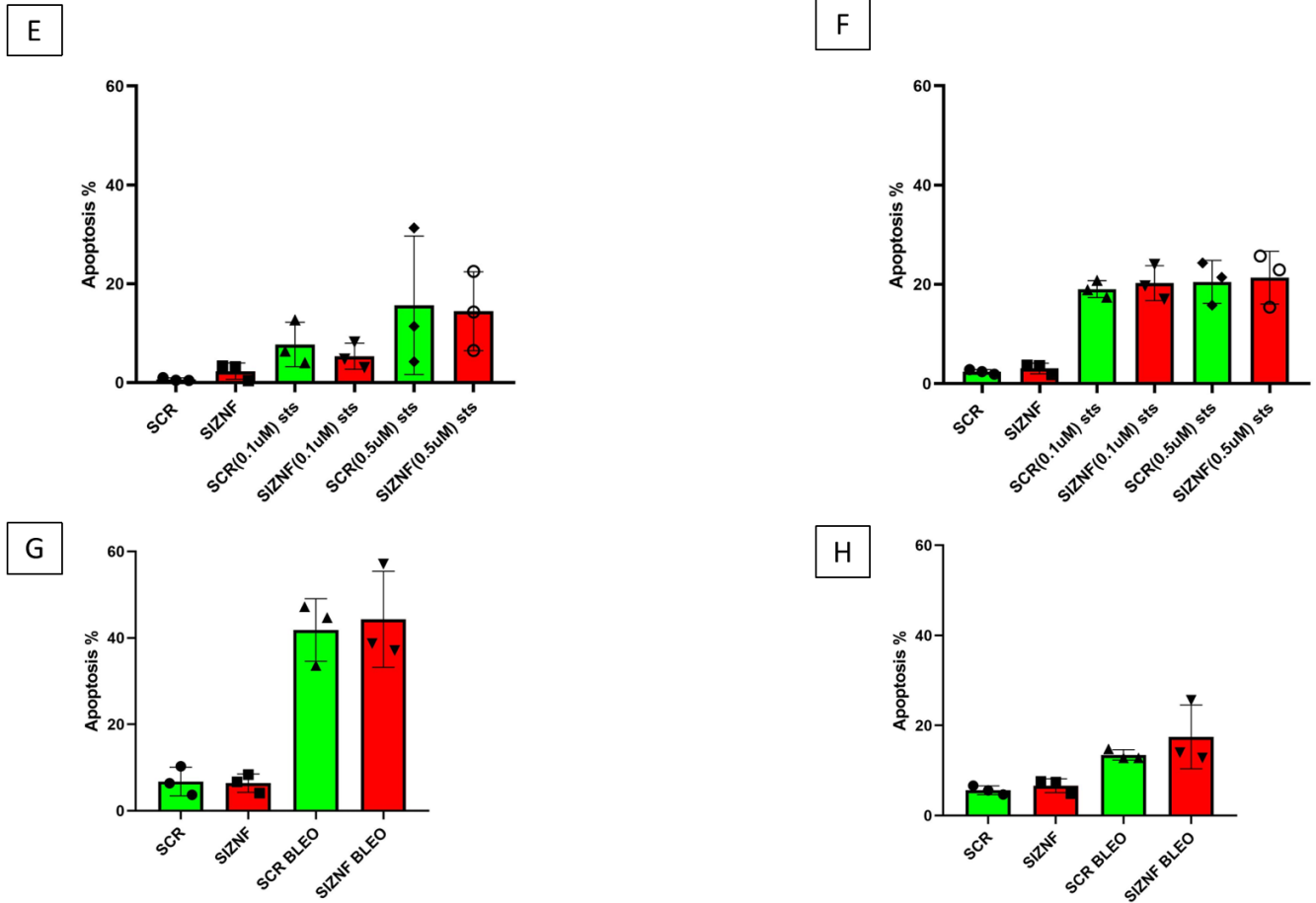


Figura 12. El silenciamiento de ZNF365 reduce la tasa de crecimiento fibroblastos y células A549. (A) La expresión de *ZNF365* fue evaluada mediante RTqPCR en fibroblastos humanos de pulmón normal silenciados para *ZNF365*. (B) Expresión de *ZNF365* en células A549 silenciadas para *ZNF365*. (C) Ensayo de tasa de crecimiento en fibroblastos humanos de pulmón normal usando el reactivo WST-1. (D) Medición de la tasa de crecimiento en células A549. E y F) Porcentaje de apoptosis en condiciones basales y en presencia de un estímulo apoptótico con estaurosporina 0.1 μ M y 0.5 μ M en fibroblastos humanos de pulmón normal y con un estímulo apoptótico con 30mU de bleomicina en células A549 G y H). Las gráficas representan 3 experimentos independientes por triplicado (RTqPCR) y las curvas son representativas de uno de tres experimentos independientes por cuadruplicados técnicos (WST-1) (media \pm la desviación estándar). * $p < 0.05$,

mediante la prueba de *t* de Student de dos colas con corrección de Welch; *** $p < 0.001$ mediante la prueba de ANOVA de dos vías con corrección de Bonferroni. Las barras representan la media \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado (apoptosis).

7.6 Los fibroblastos y células A549 silenciadas para ZNF365 presentan una mayor actividad de β -galactosidasa y un aumento en la expresión de marcadores de senescencia

Los hallazgos de que el silenciamiento de ZNF365 reducen la tasa de crecimiento sin afectar la muerte celular por apoptosis, sugieren que la senescencia podría ser un mecanismo involucrado en los efectos funcionales observados en esta molécula. Dado lo anterior, decidimos analizar el impacto del silenciamiento de ZNF365 en la expresión de algunos marcadores de senescencia tanto en fibroblastos como en células epiteliales. En un ensayo de β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β Gal), observamos que había una mayor proporción de fibroblastos y células A549 silenciadas para ZNF365 positivas para actividad de β -galactosidasa (Figura 13A,C). Como se muestra en las Figuras 13B,D, el porcentaje de actividad de β galactosidasa fue significativamente mayor en las células silenciadas (Fibroblastos, 92.31 ± 7.45 vs. 19.96 ± 6.11 ; A549, 84.24 ± 7.94 vs. 5.43 ± 4.37) ($p < 0.001$). Se hizo un análisis mediante la técnica de WB de algunos marcadores reconocidos de senescencia como son p53, p21, γ H2AX y PARP1 (60), las cuales exhibieron un aumento en la expresión en fibroblastos humanos de pulmón normal, y de PARP1, p21 y γ H2AX en células epiteliales alveolares A549 silenciadas para ZNF365 (Figuras 13E,F).

Debido a que en la literatura existe abundante evidencia en la cual se ha comprobado la acción del TGF β -1 en la inducción de senescencia en diversos tipos celulares, entre los que se cuentan los fibroblastos, células epiteliales bronquiales y células tumorales (61), adicionalmente analizamos el efecto del estímulo con TGF β -1 en la expresión de marcadores de senescencia en fibroblastos humanos de pulmón normal y células A549 por RTqPCR. Como se muestra en la Figura 14, el TGF β -1 incrementó la expresión de *CIP1/WAF* (Fibroblastos, 3.15 veces; A549, 2.28 veces) y *P53* (Fibroblastos, 2.37 veces; A549 1.74 veces) en las células silenciadas para ZNF365. Respecto a estos resultados, podemos concluir que a pesar de que sabemos que el TGF β -1 aumenta la expresión de ZNF365, tiene muchos otros efectos en las células que pueden llevarlas a desarrollar un fenotipo senescente como el aumento en la expresión de p21 y p27, el aumento en la producción de radicales libres que provocan daño al ADN, reprimiendo la actividad de la telomerasa, regulando ARNs no codificantes, disminuyendo la abundancia de H4K20me3 que compromete la reparación del daño al ADN entre otros mecanismos (61). Por lo tanto, la sola sobre expresión de ZNF365 por efecto del TGF β -1 es insuficiente para evitar el fenotipo senescente y, por el contrario, el silenciamiento del TGF β -1, comparte algunos de los efectos funcionales desencadenados por el silenciamiento de ZNF365 como el estrés telomérico y la deficiente reparación del ADN, lo cual puede apoyar en la explicación de estos resultados (39,42).

Adicionalmente, investigamos si el silenciamiento en fibroblastos de *ZNF365* afectaba la expresión de los ARNs de *COL1A1* y *COL3A1* (1.60 veces, 1.33 veces), para probar la hipótesis de que el silenciamiento de *ZNF365* favorece un

fenotipo profibrosante y senescente *in vitro* e *in vivo*. Nuestros resultados muestran un aumento en la expresión de ambos genes (Figura 15).

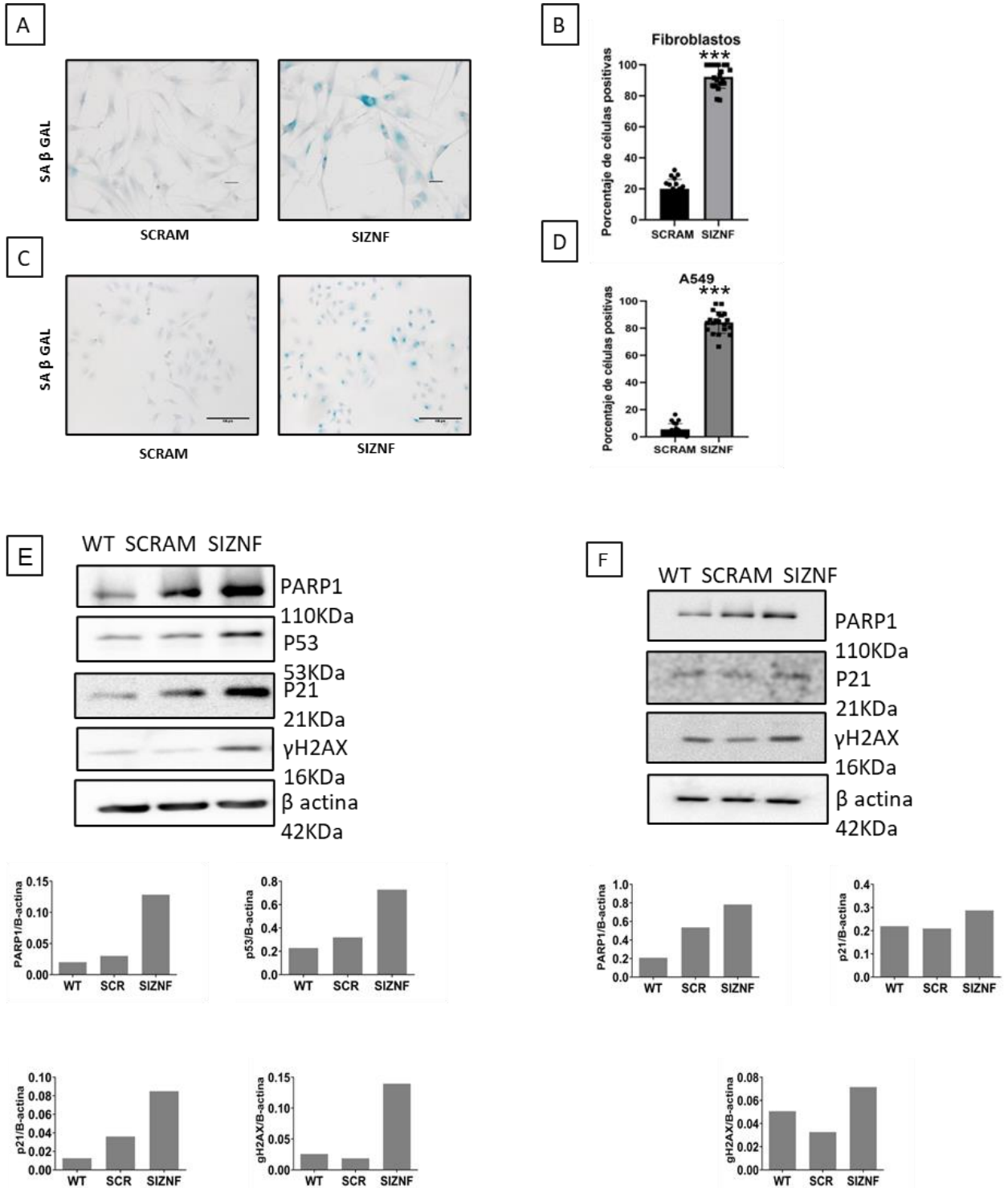


Figura 13. Fibroblastos humanos de pulmón normal y células A549 adquieren un fenotipo senescente después de ser silenciadas para *ZNF365*. Ensayo de β galactosidasa asociada a senescencia, se muestran las fotomicrografías de las tinciones en fibroblastos (A) y células A549 (C), transfectadas con secuencias revueltas (SCRAM) o con secuencias específicas de ARNpis (SIZNF) (Escala 100 μ m). (B,D) Porcentaje de células positivas para la actividad de β -galactosidasa. (E,F) Análisis de WB de marcadores de senescencia en fibroblastos humanos de pulmón normal y células A549 silenciadas para *ZNF365*. La β -actina fue utilizada como control de carga interno. Se muestran los análisis densitométricos. Las gráficas representan la media \pm la desviación estándar de un experimento con dos réplicas técnicas y el conteo de 10 campos microscópicos aleatorios por cada réplica. *** $p < 0.001$ mediante la prueba de *t* de Student de dos colas y la corrección de Welch.

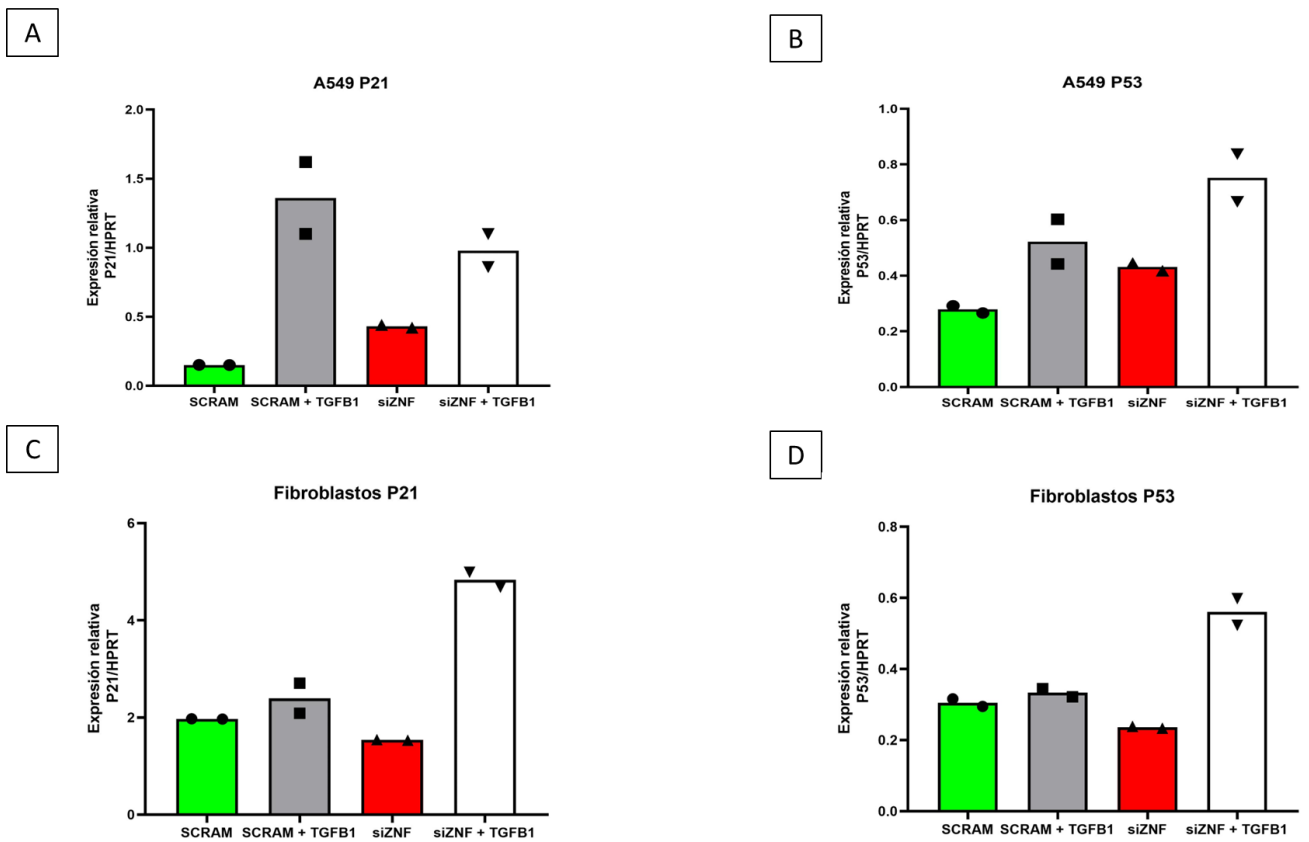


Figura 14. El estímulo con TGF β -1 en células A549 y fibroblastos humanos de pulmón normal silenciados para *ZNF365* promueven la expresión de marcadores de senescencia. A y B) Expresión de *P21* y *P53* en fibroblastos humanos de pulmón normal. C y D) Expresión de *P21* y *P53* en células A549. Las figuras representan la media \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes.

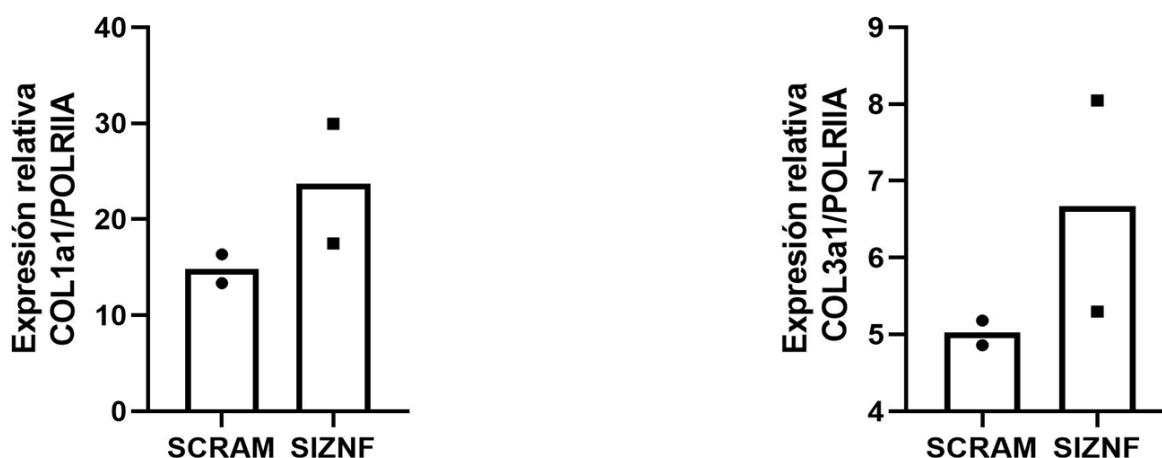


Figura 15. El silenciamiento de *ZNF365* promueve el incremento en la expresión de *COL1A1* y *COL3A1* en fibroblastos humanos de pulmón normal. Expresión relativa de *COL1A1* y *COL3A1* por qPCR en fibroblastos humanos de pulmón normal silenciados para *ZNF365* (SIZNF), comparada con fibroblastos no silenciados transfectados con las secuencias revueltas (SCRAM). Las figuras representan la media \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes.

7.7 La doxorrubicina disminuye la expresión de *ZNF365* en fibroblastos y células A549

La doxorubicina es una droga ampliamente utilizada en patologías como varios tipos de cáncer como agente quimioterapéutico. La doxorubicina provoca daño en el ADN ya que funciona inhibiendo a la topoisomerasa II y tiene un efecto promotor de la senescencia en distintos tipos celulares. Encontramos que cuando estimulamos fibroblastos humanos de pulmón normal y células A549 con doxorubicina por 48 horas a una [1.25 μ M], se reduce significativamente la expresión de ZNF365 a nivel de ARNm (Fibroblastos, 25.88; A549, 21.37) ($p < 0.001$ y $p < 0.05$) y a nivel de proteína (Figura 16A,B). Estos resultados robustecen la relación entre el silenciamiento de ZNF365 y la adquisición de un fenotipo senescente.

En resumen, los resultados demuestran que ZNF365, al igual que su ortólogo en ratón, *Zfp365*, se encuentran sobre expresados en pulmones fibróticos, así como en ratones instilados con bleomicina respectivamente. En ratones, se encontró una mayor respuesta fibrosante a la bleomicina, comparado con ratones WT, *Zfp365*^{-/-} posiblemente asociado a la senescencia como se observó en fibroblastos pulmonares humanos y células A549 silenciadas para ZNF365. Lo anterior sugiere un posible mecanismo protector y antifibrosante por parte de esta proteína de dedos de zinc.

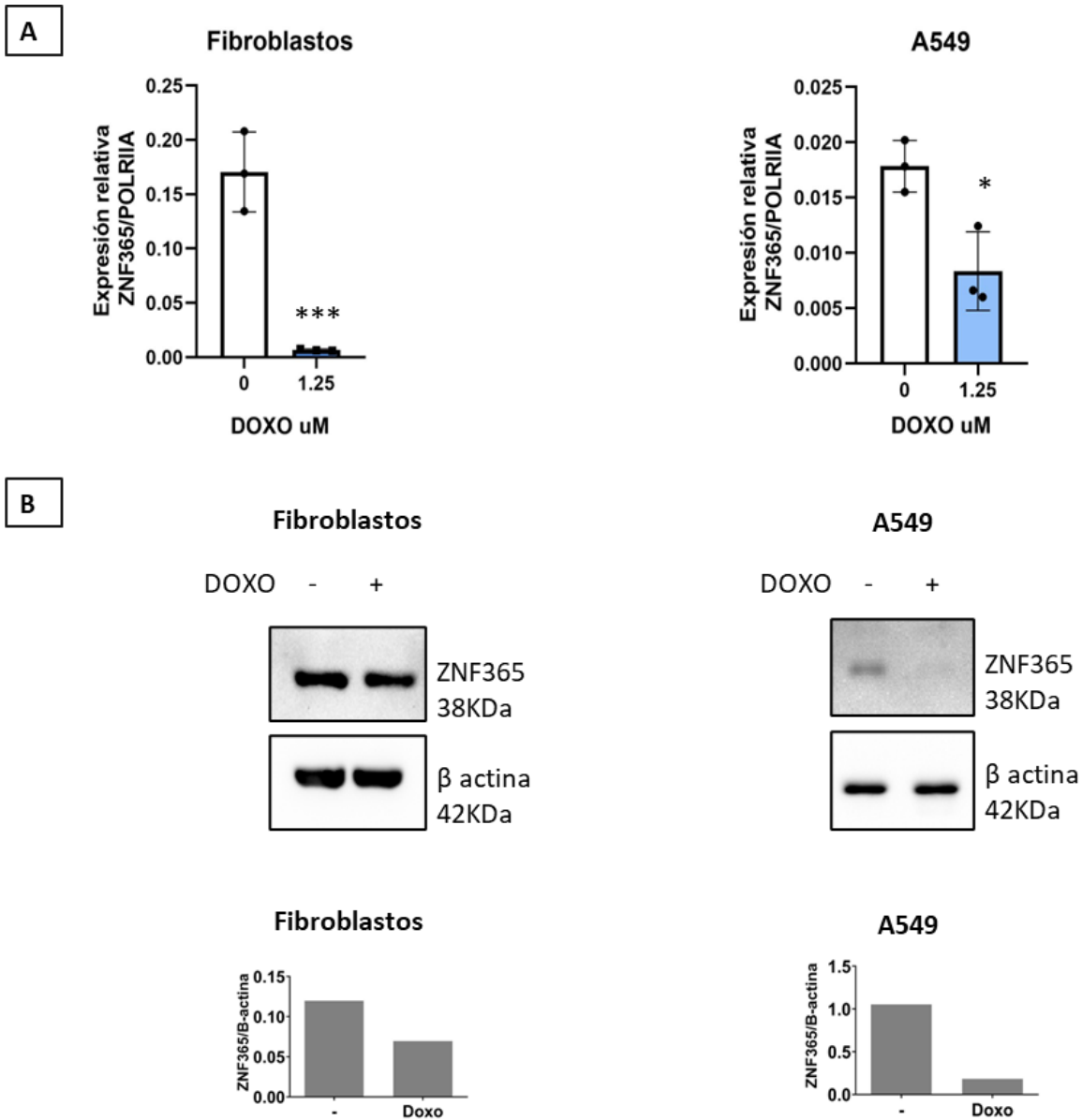


Figura 16. La expresión de ZNF365 se reduce significativamente con el estímulo de doxorubicina. (A) El tratamiento con doxorubicina reduce significativamente la expresión de *ZNF365* en fibroblastos humanos de pulmón normal y células A549. (B) Análisis de WB mostrando la reducción en la expresión de *ZNF365* después de 48 horas de estímulo con doxorubicina; β -actina fue utilizada como un control de carga interno. Se muestra el análisis densitométrico. Las gráficas representan la media \pm la desviación estándar de uno de dos experimentos independientes por triplicado técnico. * $p < 0.05$ y $p < 0.001$ mediante la prueba de *t* de Student de dos colas.

8. Discusión

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad compleja y devastadora cuyo desarrollo se asocia a la presencia de diferentes variantes genéticas, envejecimiento, tabaquismo, y otros factores ambientales y del huésped aún no elucidados (1,2). Asimismo, los mecanismos moleculares que participan en la iniciación y progresión de la enfermedad se conocen solo parcialmente, pero existe evidencia de que el TGF β -1 desempeña un papel importante. De hecho, este factor de crecimiento es una de las moléculas profibrosantes más relevantes y uno de los orquestadores de las patologías fibrosantes en distintos órganos y tejidos.

Una gran cantidad de genes son regulados ya sea positiva o negativamente por vía del TGF β -1 lo cual puede ocurrir de manera directa o indirecta, por ejemplo, mediante el entrecruzamiento de varias rutas y cascadas de señalización celular (62). De los numerosos genes regulados por este factor, el que codifica para la proteína de dedos de zinc ZNF365 se encontró como uno de los genes blanco más fuertemente sobre expresados en fibroblastos pulmonares derivados de sujetos control y de pacientes con FPI después de ser estimulados con TGF β -1 (40,41).

Existen pocos estudios sobre esta proteína, pero dentro de sus funciones conocidas se sabe que ZNF365 es regulada por p53 en células con telómeros muy cortos, contribuyendo a la estabilidad genómica. Así, cuando las células presentan disfunción y fragilidad telomérica, uno de los genes fuertemente inducidos por p53 es ZNF365. Esta función sugiere que la sobre expresión de esta molécula en FPI puede surgir como consecuencia del exagerado acortamiento de telómeros que ocurre en varios tipos celulares, como ha sido demostrado en fibroblastos y células

epiteliales, proceso patológico habitualmente asociado con el desarrollo de senescencia (4,63). En apoyo a esta hipótesis, cuando exploramos los datos de expresión de célula única, en la base de datos GEO GSE136831, observamos que varios tipos de células epiteliales expresan a *ZNF365*, incluyendo a las recientemente descritas células epiteliales basaloideas, que expresan marcadores de senescencia y se han asociado a la patogénesis de FPI (**Figura 17**).

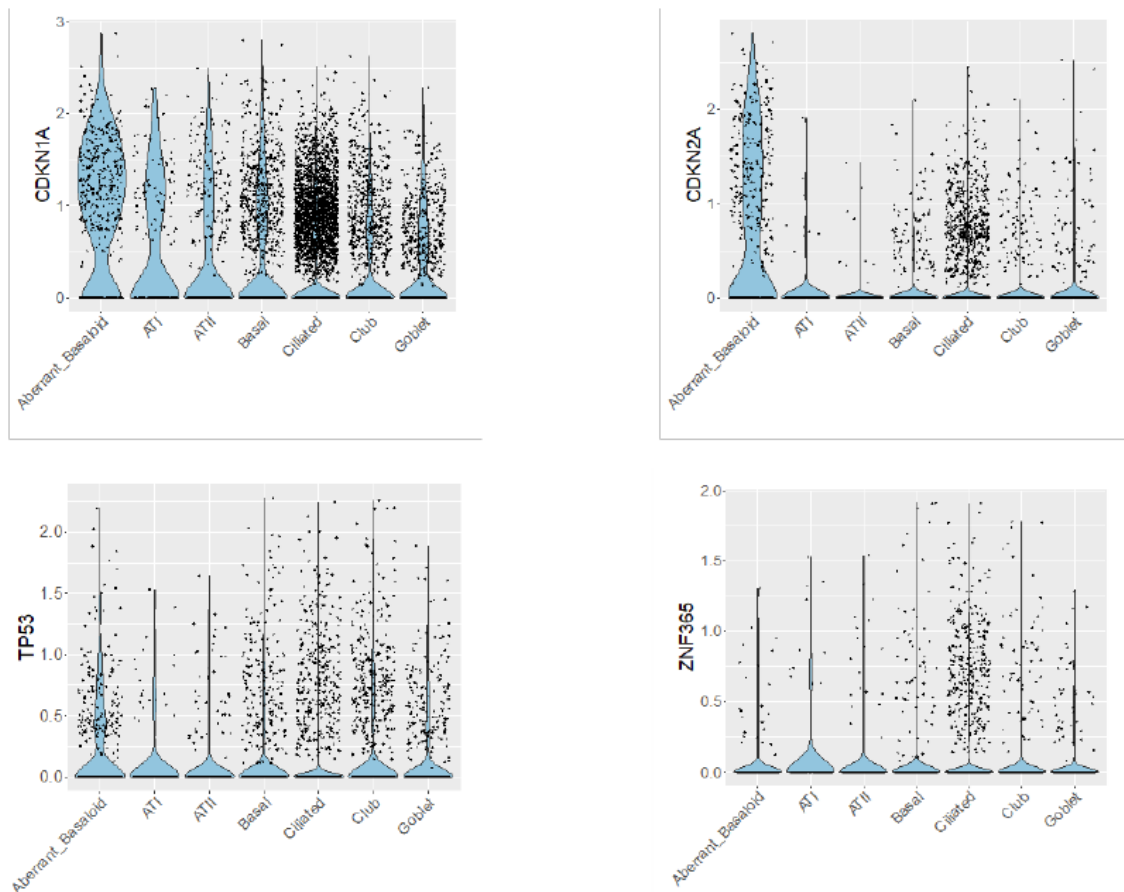


Figura 17. Gráficas de violín que muestran la expresión de genes relacionados con el ciclo celular, senescencia y *ZNF365*, en diferentes células epiteliales identificadas en pulmones de pacientes con FPI (GSE136831).

El análisis del Atlas de células de FPI (52-57-60), confirmó que el gen se expresa en fibroblastos, miofibroblastos y diferentes poblaciones de células epiteliales.

Sin embargo, los efectos funcionales de ZNF365 no han sido explorados en FPI u otras patologías fibrosantes caracterizadas por un incremento de células con telómeros cortos y disfuncionales.

Nuestro estudio corroboró que ZNF365 se encuentra sobre expresado en pulmones de pacientes con FPI comparado con controles sanos y de manera importante identificamos por primera vez *in situ* que la proteína se expresa en fibroblastos subepiteliales agrupados en los focos característicos de esta enfermedad y por células epiteliales alveolares, que en conjunto se consideran las principales células efectoras en la fisiopatología de la FPI.

In vitro validamos mediante RTqPCR y Western Blot, demostrando que ZNF365 se sobre-expresa tanto a nivel del gen como la proteína después de 24 horas de estímulo con TGF β -1 en fibroblastos humanos derivados de sujetos control y de pacientes con FPI.

Asimismo, dada la fuerte señal de ZNF365 que encontramos en células epiteliales alveolares de pulmones de pacientes con FPI, decidimos examinar su expresión en la línea celular epitelial A549 mediante RTqPCR y WB, y al igual que en fibroblastos, corroboramos que ZNF365 se sobre-expresa como consecuencia del estímulo con TGF β -1.

Posteriormente evaluamos el nivel de expresión de ZNF365 en lisados de pulmón total de ratones instilados con bleomicina durante el período caracterizado por fibrosis (21 días pos-instilación), y encontramos que *Zfp365*, el gen ortólogo de *ZNF365*, también se sobre-expresa en comparación con los controles instilados con solución salina. De manera interesante y paralela a nuestros hallazgos en los

pulmones humanos, la proteína se encontró localizada en células epiteliales bronquiales y alveolares, así como en algunas subpoblaciones de células mesenquimales. Sin embargo, es importante señalar que, aunque el modelo de fibrosis pulmonar experimental ha ayudado a resolver muchas preguntas respecto a la fisiopatología de la FPI, no es un modelo perfecto y tiene algunas limitaciones, como, por ejemplo, que el modelo desarrolla una fibrosis reversible, y solo muy ocasionalmente focos de fibroblastos en comparación con la enfermedad en humanos donde constituyen un hallazgo esencial en el diagnóstico de FPI.

En la búsqueda de revelar el papel de esta proteína en la fibrosis pulmonar, decidimos explorar la respuesta fibrosante en ratones *Zfp365*^{-/-} instilados con bleomicina. Sorpresivamente, nuestros resultados mostraron que estos ratones presentaban una respuesta fibrótica exacerbada comparados con ratones WT instilados con bleomicina. Este hallazgo sugirió que esta molécula podría tener un efecto antifibrosante.

Resulta aparentemente contradictorio que los animales deficientes de este gen desarrollaran una respuesta fibrótica exacerbada, siendo que la molécula se encuentra sobre expresada en pulmones de FPI y en el modelo de fibrosis inducida por bleomicina. Sin embargo, existen varios ejemplos en la literatura de moléculas que se encuentran incrementadas en pacientes con FPI (sugiriendo que son profibróticas) pero que cuando se disminuye su expresión en modelos experimentales, se observa paradójicamente una respuesta fibrótica incrementada sugiriendo que funcionalmente desempeñan un papel protector o antifibrosante (64,65). Esta peculiaridad se puede explicar en el contexto en el cual, durante el desarrollo de la FPI, numerosos mediadores profibróticos se sobre-expresan, pero

como mecanismo de defensa también aumentan moléculas antifibróticas las cuales sin embargo son insuficientes para detener o revertir el proceso patológico. En este sentido, sería interesante hacer un estudio en pacientes con FPI que cursen con distintas etapas de evolución de la enfermedad y analizar la expresión de *ZNF365* para evaluar si ocurren cambios en la misma dependiendo la progresión o severidad de la enfermedad.

Finalmente, y con el objetivo de evaluar los efectos celulares de esta molécula, exploramos su potencial función en fibroblastos humanos de pulmón normal y en células epiteliales A549, mediante su silenciamiento. En este sentido, decidimos explorar su posible papel en la regulación del ciclo celular. Nuestros resultados demostraron que el silenciamiento de *ZNF365* en estos tipos celulares provocan una disminución significativa en la tasa de crecimiento, sin un incremento en la tasa de apoptosis temprana y tardía sugiriendo que inhibe la proliferación celular. Resultados similares fueron descritos en la línea celular U2OS, en la cual se observó que, como consecuencia del silenciamiento de esta molécula, había un arresto en la fase G1/S del ciclo celular y un retraso en la mitosis (39). Esta observación nos orientó a que una de las posibles funciones de este gen podría estar relacionado con la senescencia celular, proceso que, se caracteriza además de la pérdida de la capacidad proliferativa, por la producción de una plétora de mediadores que incluye moléculas que participan en la inflamación y la fibrosis y que se conoce como SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype por sus siglas en inglés).

Para determinar si el silenciamiento de *ZNF365* resultaba en la inducción de senescencia, examinamos la actividad de la β -galactosidasa asociada a

senescencia y medimos la expresión de proteínas que han sido reconocidas como biomarcadores (60,66) de senescencia en fibroblastos humanos de pulmón normal y células epiteliales alveolares. Nuestros resultados mostraron un incremento significativo en el porcentaje de células positivas para la actividad de β -galactosidasa en ambos tipos celulares cuando el gen *ZNF365* fue silenciado y en concordancia observamos un incremento en la expresión de las proteínas PARP1, p21 y la variante de histonas γ H2AX en ambos tipos celulares.

Para robustecer estos hallazgos, decidimos usar la doxorrubicina, una droga que ha sido ampliamente descrita como promotora de la senescencia (67,68,69). La doxorrubicina es un agente que provoca daños en la molécula de ADN al inhibir la actividad de la Topoisomerasa II, la cual es indispensable para la replicación del material genético lo que resulta, entre otros posibles efectos, en el desarrollo de senescencia (66-68). Evaluamos si la inducción de senescencia con esta droga afectaba la expresión de *ZNF365* en fibroblastos humanos de pulmón normal y en células epiteliales alveolares; de forma interesante encontramos que la expresión de esta molécula se reduce significativamente durante la senescencia inducida en ambos tipos celulares.

La doxorrubicina también disminuyó la expresión de PARP1, el cual también es reducido cuando las células son tratadas con otros estímulos que favorecen la senescencia, como el agotamiento replicativo, la radiación ionizante, y la sobre expresión del gen *HRAS*^{G12V} (68). Estudios previos han demostrado que la doxorrubicina es capaz de aumentar la expresión de algunos microARNs como el miR-7-5p en células de cáncer pulmonar de células pequeñas. Este miARN tiene

como blanco a PARP1 y en la base de datos miRTarBase, existe la predicción de que este miARN también tiene como blanco a *ZNF365*. Con base en esta última información, podemos especular que la reducción en la expresión de *ZNF365* posterior al estímulo con doxorrubicina, obedece a la acción de este mismo miARN (miARN asociado a la senescencia (70)) o, también puede ser producto de la interacción física que tiene con PARP1 con el cual puede hacer asas de retroalimentación.

Curiosamente, el silenciamiento de *ZNF365* provocó la senescencia celular en fibroblastos humanos de pulmón normal y células A549, pero la sobre-expresión de PARP1, lo cual puede representar un mecanismo de compensación, ya que ambas son moléculas indispensables en los mecanismos de reparación del ADN (39).

Indudablemente, es necesario realizar más estudios tanto en fibrosis pulmonar idiopática como en modelos experimentales para entender a profundidad los mecanismos en los cuales participa *ZNF365* en la respuesta fibrosante, por ejemplo, evaluar la expresión de marcadores de senescencia como p21, p53, p16 y la actividad de β -galactosidasa en el pulmón de ratones WT y KO para *Zfp365* para determinar si existe un aumento de la senescencia en el pulmón del ratón KO y de esta forma, validar los hallazgos obtenidos *in vitro* con el silenciamiento.

9. Conclusiones

1) *ZNF365* se encuentra sobre expresado en fibroblastos localizados en focos de fibroblastos/miofibroblastos y en células epiteliales alveolares en pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, y de manera similar se incrementa y

localiza en células epiteliales alveolares y bronquiales y en algunas poblaciones de células estromales en pulmones de ratones con fibrosis pulmonar inducida con bleomicina.

2) El TGF β -1 incrementa la expresión de ZNF365 en fibroblastos pulmonares derivados de sujetos sanos y pacientes con FPI, así como en células epiteliales alveolares.

3) El silenciamiento de *ZNF365* induce senescencia en células epiteliales pulmonares y fibroblastos.

4) La inducción de senescencia *in vitro* con doxorubicina resulta en una reducción en la expresión de ZNF365.

5) Los ratones deficientes de *Zfp365*, el ortólogo de *ZNF365*, instilados con bleomicina presentan una respuesta fibrosante exacerbada, comparado con los WT lo cual sugiere, en conjunto con los resultados *in vitro*, que su expresión puede representar un mecanismo de protección contra la fibrosis reduciendo el desarrollo de senescencia.

10. Perspectivas

1) Evaluar el efecto de la sobre expresión en fibroblastos y células A549 para profundizar en el efecto que tiene la expresión de esta molécula en estos tipos celulares.

2) Robustecer la hipótesis del fenotipo profibrosante en fibroblastos silenciados para ZNF365, midiendo moléculas presentes en el SASP.

- 3) Analizar mediante β -galactosidasa en tejidos pulmonares de ratón, si la fibrosis observada, obedece a un aumento en este marcador de senescencia.
- 4) Medir la expresión de moléculas de senescencia en pulmones de ratones instilados con bleomicina.
- 5) Profundizar en el mecanismo mediante el cual la doxorubicina provoca la disminución en la expresión de ZNF365, midiendo la expresión del miR-7-5p en fibroblastos pulmonares y células A549.
- 6) Medir la expresión de ZNF365 en biopsias de pacientes con FPI en distintas etapas de la enfermedad para probar la hipótesis de su posible papel protector en fases más tempranas de su progresión.

11. Referencias bibliográficas

1. Selman, M.; King, T.E., Jr.; Pardo, A. Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Intern. Med.* **2001**, 134, 136–151.
2. King, T.E., Jr.; Pardo, A.; Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* **2011**, 378, 1949–1961.
3. Martínez, F.J.; Collard, HR.; Pardo, A.; Raghu, G.; Richeldi, L.; Selman, M.; Swigris, JJ.; Taniguchi, H.; Wells, AU. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primers.* **2017**, 3: 17074.
4. Álvarez, D.; Cárdenes, N.; Sellarés, J.; Bueno, M.; Corey, C.; Hanumanthu, V.S.; Peng, Y.; D’Cunha, H.; Sembrat, J.; Nouraie, M.; et al. IPF lung

- fibroblasts have a senescent phenotype. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2017**, 313, L1164–L1173.
5. Pardo, A.; Selman, M. The interplay of the genetic architecture, aging and environmental factors in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2020**, 64, 163–172.
 6. Yao, C.; Guan, X.; Carraro, G.; Parimon, T.; Liu, X.; Huang, G.; Mulay, A.; Soukiasian, H.J.; David, G.; Weigt, S.S.; et al. Senescence of alveolar type 2 cells drives progressive pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **2021**, 204, 113.
 7. Selman, M.; Pardo, A. Fibroageing: An ageing pathological feature driven by dysregulated extracellular matrix-cell mechanobiology. *Aging Research Reviews.* **2021**, 70: 101393.
 8. Dawson, TR.; Weaver, AM. Niche tension controls exosome production. *Nat Cell Biol* **2023**, 3: 337-378.
 9. Wu, B; Liu, D-A; Guan, L; Myint, PK; Chin, L; Dang, H; Xu, Y; Ren, J; Li, T; Yu, Z; et al. Stiff matrix induces exosome secretion to promote tumour growth. *Nat Cell Biol* **2023**, 3: 415-424.
 10. Sri Krishna, S.; Majumdar, I.; Grishin Nick, V. Structural classification of zinc fingers. *Nucleic Acids Research.* **2003**, 31, 2: 532-550.
 11. Cassandri, M; Smirnov, A; Novelli, F; Pitolli, C; Agostini, M; et al. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discovery.* **2017**, 3: 17071.
 12. Jen, J.; Wang, Y-C. Zinc finger proteins in cancer progression. *Journal of Biomedical Science.* **2016**, 23, 53: 1-9.

13. Valle-García, D; Qadeer, ZA; Mchugh, DS; Ghiraldini, FG; Chowdhury, AH; et al. ATRX binds to atypical chromatin domains at the 3' exons of zinc finger genes to preserve H3K9me3 enrichment. *Epigenetics*. **2016**, 11, 6: 398-414.
14. Hozel, M; Huang, S; Koster, J; Ora, I; Lakeman, A; et al. NF1 is a tumor suppressor in neuroblastoma that determines retinoic acid response and disease outcome. *Cell*. **2010**, 142: 218-229.
15. Yasmeen, R; Meyers, JM; Alvarez, CE; Thomas, JL; Bonegarde-Bernard, A; et al. Aldehyde dehydrogenase-1 α 1 induces oncogene suppressor genes in B cell populations. *Bioch Biophys Acta*. **2013**, 1833: 3218-3227.
16. Cho, YW; Hong, CJ; Hou, A; Gent, PM; Zhang, K; et al. Zfp423 binds autoregulatory sites in p19 cell culture model. *PLoS One*, **2013**, 8: e66514.
17. Addison, WN; Fu, MM; Yang, HX; Lin, Z; Nagano, K; et al. Direct transcriptional repression of Zfp423 by Zfp521 mediates a BMP-dependent osteoblast versus adipocyte lineage commitment switch. *Mol Cell Biol*, **2014**, 34: 3076-3085.
18. Kang, S; Akerblad, P; Kiviranta, R; Gupta, RK; Kajimura, S; et al. Regulation of early adipose commitment by Zfp521. *PLoS Biol*, **2009**, 10: e1001433.
19. Harder, L; Eschenburg, G; Zech, A; Kriebitzsch, N; Otto, B; et al. Aberrant ZNF423 impedes B cell differentiation and is linked to adverse outcome of ETV6-RUNX1 negative B precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med*, **2013**, 210: 2289-2304.
20. Zhang, W; Kadam, S; Emerson, BM; Bieker, JJ. Site specific acetylation by p300 or CREB binding protein regulates erythroid Krüppel- like factor

- transcriptional activity via its interaction with the SWI-SNF complex. *Mol Cell Biol*, **2001**, 21: 2413-2422.
21. Juárez-Méndez, S; Zentella-Dehesa, A; Villegas-Ruíz, V; Pérez González, OA; Salcedo, M. Splice variants of zinc finger protein 695 mRNA associated to ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, **2013**, 6, 61: 1-10.
22. Costa, RH.; Kalinichenko, VV.; Lim, L. Transcription factors in mouse lung development and function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **2001**, 280: L823-L838.
23. Liu, L.; Kugler, MC.; Loomis, CA.; Samdani, R.; Zhao, Z; et al. Hedgehog signaling in neonatal and adult lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **2013**, 48, 6: 703-710.
24. McConnell, BB.; Yang, VW. Mammalian Krüppel-like factors in health and disease. *Physiol Rev*. **2010**, 90: 1337-1381.
25. Sanders, YY.; Ambalavanan, N.; Halloran, B.; Zhang, X.; Liu, H. Altered DNA methylation profile in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. **2012**, 186, 6: 525-535.
26. Pechkovsky, DV.; Prêle, CM.; Wong, J.; Hogaboam, CM.; McAnulty, RJ. Stat3-mediated signaling dysregulated lung fibroblast-myofibroblast activation and differentiation in UIP/IPF. *Am J Pathol*. **2012**, 180, 4: 1398-1411.
27. Milam, JE.; Keshamouni, VG.; Phan, SH.; Hu, B.; Gangireddy, SR.; et al. PPAR- γ agonists inhibit profibrotic phenotypes in human lung fibroblasts and

- bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **2008**, 294: L891–L901.
28. Nakayama, K.; Kim, K-W.; Miyajima, A. A novel nuclear zinc finger protein EZI enhances nuclear retention and transactivation of STAT3. *The EMBO Journal*. **2002**, 21, 22: 6174-6184.
29. Quach, JM.; Walker, EC.; Allan, E.; Solano, M.; Yokoyama, A.; et al. Zinc finger protein 467 is a novel regulator of osteoblast and adipocyte commitment. *The Journal of Biological Chemistry*. **2011**, 286, 6: 4186-4198.
30. Bhattacharyya, S.; Wu, M.; Fang, F.; Tourtellotte, W.; Feghali-Bostwick, C.; et al. Early growth response transcription factors: key mediators of fibrosis and novel targets for anti-fibrotic therapy. *Matrix Biology*. **2011**, 30: 235-242.
31. Wu, M.; Melichian, DS.; De la Garza, M.; Gruner, K.; Bhattacharyya, S.; et al. Essential roles for early growth response transcription factor Egr-1 in tissue fibrosis and wound healing. *Am J Pathol*. **2009**, 175, 3: 1041-1054.
32. Bolaños, AL.; Milla, CM.; Lira, JC.; Ramírez, R.; Checa, M.; et al. Role of Sonic hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **2012**, 303: L978-L990.
33. Hu, B.; Liu, J.; Wu, Z.; Liu, T.; Ullenbruch, MR.; et al. Reemergence of hedgehog mediates epithelial-mesenchymal crosstalk in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **2014**, 52, 4: 418-428.
34. Leppäranta, O.; Pulkkinen, V.; Koli, K.; Vähätalo, R.; Salmenkivi, K.; et al. Transcription factor GATA-6 is expressed in quiescent myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **2010**, 42: 626-632.

35. Wilson, KA.; Chateau, ML.; Porteus, MH. Design and development of artificial zinc finger transcription factors and zinc finger nucleases to the hTERT locus. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. **2013**, 2. E87: 1-10.
36. Lawson, WE.; Loyd, JE.; Degryse, AL. Genetics in pulmonary fibrosis-familial cases provide clues to the pathogenesis of IPF. *Am J Med Sci*. **2011**, 341, 6: 439-443.
37. Jiang, R.; Zhou, Z.; Liao, Y.; Yang, F.; Cheng, Y. The emerging roles of a novel CCCH-type zinc finger protein, ZC3H4, in silica-induced epithelial to mesenchymal transition. *Toxicology Letters*. **2019**, 307: 26-40.
38. Gianfrancesco, F.; Esposito, T.; Neve Ombra, M.; Forabosco, P.; Maninchedda, G.; Fattorino, M.; Casula, S.; Vaccargiu, S.; Casu, G.; Cardia, F.; et al. Identification of a common gene and a novel variant associated with uric acid nephrolithiasis in a Sardinian genetic isolate. *Am J Hum Genet* **2003**, 72, 1479-1491.
39. Zhang, Y.; Park, E.; Kim, C.S.; Paik, J.-H. ZNF365 promotes stalled replication forks recovery to maintain genome instability. *Cell Cycle* **2013**, 12, 2817–2828.
40. Negreros, M.; Hagood, J.S.; Espinoza, C.R.; Balderas-Martínez, Y.I.; Selman, M.; Pardo, A. Transforming growth factor beta 1 induces methylation changes in lung fibroblasts. *PLoS ONE* **2019**, 14, e0223512.
41. Renzoni, E.A.; Abraham, D.J.; Howat, S.; Shi-Wen, X.; Sestini, P.; Bou-Gharios, G.; Wells, A.U.; Veeraraghavan, S.; Nicholson, A.G.; Denton, C.P.;

- et al. Gene expression profiling reveals novel TGF β -1 targets in adult lung fibroblasts. *Respir. Res.* **2004**, 5, 24.
42. Zhang, Y.; Shin, S.J.; Liu, D.; Ivanova, E.; Foerster, F.; Ying, H.; Zheng, H.; Xiao, Y.; Chen, Z.; Protopopov, A.; et al. ZNF365 promotes stability of fragile sites and telomeres. *Cancer Discov.* **2013**, 3, 798–811.
43. Hirohashi, Y.; Wang, Q.; Liu, Q.; Li, B.; Du, X.; Zhang, H.; Furuuchi, K.; Masuda, K.; Sato, N.; Greene, M.I. Centrosomal proteins Nde1 and Su48 form a complex regulated by phosphorylation. *Oncogene* **2006**, 25, 6048–6055.
44. Okamoto, M.; Iguchi, T.; Hattori, T.; Matsuzaki, S.; Koyama, Y.; Taniguchi, M.; Komada, M.; Xie, M.-J.; Yagi, H.; Shimizu, S.; et al. DBZ regulates cortical cell positioning and neurite development by sustaining the anterograde transport of Lis1 and DISC1 through control of Nde1 dual phosphorylation. *J. Neurosci.* **2015**, 35, 2942–2958.
45. Koyama, Y.; Hattori, T.; Shimizu, S.; Taniguchi, M.; Yamada, K.; Takamura, H.; Kumamoto, M.; Matsuzaki, S.; Ito, A.; Katayama, T.; et al. DBZ (DISC1-binding zinc finger protein)-deficient mice display abnormalities in basket cells in the somatosensory cortices. *J. Chem. Neuroanat.* **2013**, 53, 1–10.
46. White, J.K.; Gerdin, A.-K.; Karp, N.A.; Ryder, E.; Buljan, M.; Bussell, J.N.; Salisbury, J.; Clare, S.; Ingham, N.J.; Podrini, C.; et al. Genome-wide generation and systematic phenotyping of knockout mice reveals new roles for many genes. *Cell* **2013**, 154, 452–464.

47. Skarnes, W.C.; Rosen, B.; West, A.P.; Koutsourakis, M.; Bushell, W.; Iyer, V.; Mujica, A.O.; Thomas, M.; Harrow, J.; Cox, T.; et al. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* **2011**, *474*, 337–342.
48. Bradley, A.; Anastassiadis, K.; Ayadi, A.; Battey, J.F.; Bell, C.; Birling, M.-C.; Bottomley, J.; Brown, S.D.; Bürger, A.; Bult, C.J.; et al. The mammalian gene function resource: The international knockout mouse consortium. *Mamm. Genome* **2012**, *23*, 580–586.
49. Pettitt, S.J.; Liang, Q.; Rairdan, X.Y.; Moran, J.L.; Prosser, H.M.; Beier, D.R.; Lloyd, K.C.; Bradley, A.; Skarnes, W.C. Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 493–495.
50. Pardo, A.; Barrios, R.; Gaxiola, M.; Segura-Valdez, L.; Carrillo, G.; Estrada, A.; Mejía, M.; Selman, M. Increase of lung neutrophils and upregulation of neutrophil gelatinase B and collagenase in hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2000**, *161*, 1698–1704.
51. Cabrera, S.; Maciel, M.; Herrera, I.; Nava, T.; Vergara, F.; Gaxiola, M.; López Otín, C.; Selman, M.; Pardo, A. Essential role for the ATG4B protease and autophagy in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Autophagy* **2015**, *11*, 670–684.
52. Adams, T.S.; Schupp, J.C.; Poli, S.; Ayaub, E.A.; Neumark, N.; Ahangari, F.; Chu, S.G.; Raby, B.A.; Deluliis, G.; Janusyk, M.; et al. Single Cell RNA-seq reveals ectopic and aberrant lung resident cell populations in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sci. Adv.* **2019**, *6*, eaba1983.

53. Team, R.C. Others. R: A language and environment for statistical computing. **2013**.
54. Gentleman, R.C.; Carey, V.J.; Bates, D.M.; Bolstad, B.; Dettling, M.; Dudoit, S. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **2004**, *5*, R80.
55. Hao, Y. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* **2021**, *184*, 3573 - 3587.e29.
56. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer-Verlag New York, NY, USA, **2016**.
57. Reyfman, P.A.; Walter, J.M.; Joshi, N.; Anekalla, K.R.; McQuattie-Pimentel, A.C.; Chiu, S.; Fernandez, R.; Akbarpour, M.; Chen, C.-I.; Ren, Z.; et al. Single-Cell transcriptomic analysis of human lung reveals complex multicellular changes during pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2019**, *199*, 1517–1536.
58. Morse, C.; Tabib, T.; Sembrat, J.; Buschur, K.; Trejo Bittar, H.; Valenzi, E.; Jiang, Y.; Kass, D.J.; Gibson, K.; Chen, W.; et al. Proliferating SPP1/MERTK-expressing macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* **2019**, *54*, 1802441.
59. Habermann, A.C.; Gutiérrez, A.J.; Bui, L.T.; Yahn, S.L.; Winters, N.I.; Calvi, C.L.; Peter, L.; Chung, M.-I.; Taylor, C.J.; Jetter, C.; et al. Single-Cell RNA sequencing reveals profibrotic roles of distinct epithelial and mesenchymal lineages in pulmonary fibrosis. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaba1972.
60. González-Gualda, E.; Baker, A.G.; Fruk, L.; Muñoz-Espín, D. A guide to assess cellular senescence *in vitro* and *in vivo*. *FEBS J.* **2020**, *288*, 56–80.

61. Tominaga, K; Suzuki, HI. TGF- β signaling in cellular senescence and aging-related pathology. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20 (20): 5002.
62. Horowitz, J.C.; Rogers, D.S.; Sharma, V.; Vittal, R.; White, E.S.; Cui, Z.; Thannickal, V.J. Combinatorial activation of FAK and AKT by transforming growth factor- β 1 confers and anoikis resistant phenotype to myofibroblasts. *Cell. Signal.* **2007**, 19, 761–771.
63. Lee, J.S.; La, J.; Aziz, S.; Dobrinskikh, E.; Brownell, R.; Jones, K.D.; Achtar-Zadeh, N.; Green, G.; Elicker, B.M.; Golden, J.A.; et al. Molecular markers of telomere dysfunction and senescence are common findings in the usual interstitial pneumonia pattern of lung fibrosis. *Histopathology* **2021**, 79, 67–76.
64. Yu, G.; Kovkarova-Naumovski, E.; Jara, P.; Parwani, A.; Kass, D.; Ruiz, V.; López-Otín, C.; Rosas, I.O.; Gibson, K.F.; Cabrera, S.; et al. Matrix metalloproteinase-19 is a key regulator of lung fibrosis in mice and humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2012**, 186, 752–762.
65. Parra, E.R.; Lin, F.; Martins, V.; Rangel, M.P.; Capelozzi, V.L. Immunohistochemical and morphometric evaluation of COX-1 and COX-2 in the remodeled lung in idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis. *J. Bras. Pneumol.* **2013**, 39, 692–700.
66. Di Micco, R.; Krizhanovsky, V.; Baker, D.; di Fagagna, F.D. Cellular senescence in ageing: From mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, 22, 75–95.

67. Casella, G.; Munk, R.; Kim, K.M.; Piao, Y.; De, S.; Abdelmohsen, K.; Gorospe, M. Transcriptome signature of cellular senescence. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 7294–7305.
68. Arcamone, F.; Animati, F.; Cuprunico, G.; Lombardi, P. New developments in antitumor anthracyclines. *Pharmacol. Ther.* **1997**, *76*, 117–124.
69. Bojko, A.; Czarnecka-Herok, J.; Charzynska, A.; Dabrowski, M.; Sikora, E. Diversity of the senescence phenotype of cancer cells treated with chemotherapeutic agents. *Cells* **2019**, *8*, 1501.
70. Da Silveira, W.A.; Renaud, L.; Hazard, E.S.; Hardiman, G. MiRNA and lncRNA expression networks modulate cell cycle and DNA repair inhibition in senescent prostate cells. *Genes* **2022**, *13*, 208.

12. Anexo 1

Extracción de ARN con Trizol:

En el caso de células en cultivo, se retiró el medio, se dio un lavado con PBS y se agregó 1 ml de Trizol a cada pozo (placa de 6 pozos). Se pasó a un tubo eppendorf estéril y se congeló a -80°C . En el caso de biopsias de paciente o de pulmón de ratón, los tejidos se homogenizaron y se resuspendieron en Trizol. En ambos casos se continuó con el protocolo recomendado:

1. Agregar 200 μl de cloroformo por ml de Trizol usado.
2. Agitar en vórtex 15 segundos e incubar entre 3-5 minutos a TA.
3. Centrifugar a 12,000 x g 15 minutos a 4°C .
4. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
5. Precipitar el ARN con 500 μl de isopropanol.
6. Guardar a -80°C toda la noche.
7. Incubar a TA 10 minutos, dar un vórtex y centrifugar a 12,000 x g 10 minutos a 4°C .
8. Decantar el SN (sobrenadante) y lavar el pellet con 1 ml de etanol al 75%, dar vórtex y centrifugar a 7,500 x g 5 minutos a 4°C .
9. Decantar el SN y dejar secar el pellet. Resuspender en agua tratada con DEPC.

Reacción de RT-PCR con Verso cDNA synthesis kit

	1x
5X cDNA synthesis buffer	4 μl
dNTP mix	2 μl

primers (Random Hexamers)	1 μ l
RT Enhancer	1 μ l
Verso enzyme mix	1 μ l
1 μ g del templado + agua	11 μ l

Total= 20 μ l

Programa:

42°C- 30 minutos

95°C- 2 minutos

Al final añadir 80 μ l de agua.

qPCR sonda Taqman

	1X
Master mix	7.5 μ l
Sonda	0.3 μ l
Agua	5.2 μ l
+ 2 μ l de cADN	

Programa:

95°	95°	60°	} 40 ciclos
10'	10"	45"	

qPCR SybrGreen

	1X
Master Mix	7.5 µl
Primer Forward	0.3 µl
Primer Reverse	0.3 µl
Agua	4.4 µl
+2.5 µl de ADN	

Programa:

95°	95°	60°	} 40 ciclos
10'	10''	45''	

Tabla #2. Secuencias de Primers.

Nombre	Secuencias (5' -> 3')	Longitud oligos (nt)
Hu CDKN1A-F	TGTCCGTCAGAACCCATGC	19
Hu CDKN1A-R	AAAGTCGAAGTTCCATCGCTC	21
Hu HPRT-R1	GGCTTTGTATTTTGCTTTTCCA	22
Hu HPRT-F1	AAGGACCCACGAAGTGTTG	20
Hu TP53-F	CAGCACATGACGGAGGTTGT	20
Hu TP53-R	TCATCCAAATACTCCACACGC	21

PCR punto final para genotipos

Determinación de genotipos

PCRs en punto final fueron hechas de acuerdo con las instrucciones y hojas técnicas del proveedor. Primers específicos mostrados en la hoja técnica fueron diseñados y sintetizados para detectar y diferenciar a las colonias de animales WT y KO.

https://www.infrafrontier.eu/sites/infrafrontier.eu/files/upload/public/pdf/Resources%20and%20Services/eucomm-alleles-overview_infrafrontier-2016.pdf.

https://www.infrafrontier.eu/sites/infrafrontier.eu/files/upload/public/pdf/Resources%20and%20Services/eucomm_komp_csd_allele_conversion_guide_v3a_2016.pdf.

https://www.infrafrontier.eu/sites/infrafrontier.eu/files/upload/public/pdf/genotype_protocols/EM08383_genotype.pdf.

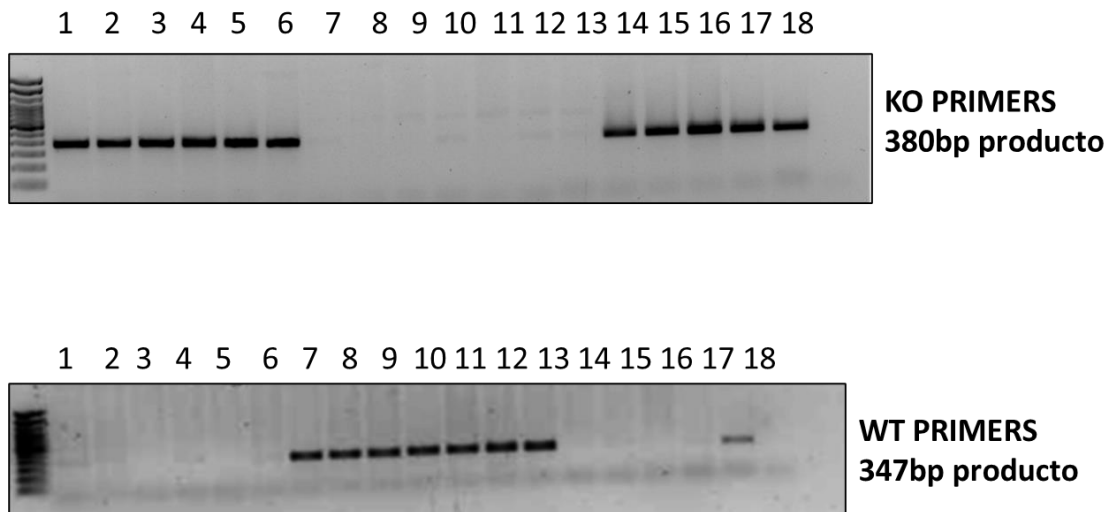


Figura 18. Imagen de gel de electroforesis de ADN con un ejemplo de genotipos en donde los animales WT (7-13), KO (1-6; 14-17; mientras el 18 corresponde a un animal heterocigoto (HT)). Cada carril está numerado y representa un animal. Los oligonucleótidos WT amplifican un segmento del gen de ZNF365, mientras que los oligonucleótidos del KO amplifican el cassette que interrumpe el gen (exón 2).

Extracción y análisis de proteínas

Extracción de proteína celular con RIPA

1. Lavar células con PBS 1X frío dos veces.
2. Agregar buffer de lisis (RIPA con inhibidores de proteasas y PMSF): 30 μ l a pozos de placa de 6.
3. Incubar 15 minutos en hielo.
4. Raspar con policía y guardar en tubo eppendorf de 1.5 ml previamente etiquetados.
5. Sonicar 3 veces con pulsos de 4 segundos y amplitud de 60. Lavar sonicador con agua entre cada muestra y secar con gasa. Todo en hielo.
6. Incubar 3 minutos en hielo, dar vórtex de 30 segundos y centrifugar a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C.
7. Recuperar sobrenadante y guardar a -80°C.

Western Blot

1. Separación de proteínas por electroforesis. Preparar geles entre 10% y 12% y montar cámara de electroforesis con solución amortiguadora 1X. Preparar muestras con solución amortiguadora muestra con 2-mercaptoetanol. Hervir 5 minutos. Dar vórtex y bajar en nanocentrífuga. Cargar geles y correr en frío a 150 V, 400 mA con 2 geles. Retirar geles con espátula y equilibrar en solución amortiguadora de transferencia. Cortar membrana de nitrocelulosa al tamaño del gel (8 cm X 5 cm). Si se usa nitrocelulosa: pre-hidratar en agua 30" y equilibrar.
2. Transferir

2ª. En cámara húmeda sobre el lado negro del cassette: a) esponja, b) papel filtro, c) gel, d) membrana, e) papel filtro, f) esponja negra. Asegurarse de eliminar burbujas con varilla de vidrio. Transferir en frío con cartucho de hielo. Una hora para dos geles, 30 minutos para 1 gel. Transferir a 100 V y 230 mA.

3. Inmunodetección y revelado

Bloquear sitios no específicos incubando la membrana en leche baja en grasa al 5% en TBS-T 1 hora a TA, o bien, toda la noche a 4°C, en agitación (columpio). Retirar la solución bloqueadora e incubar con anticuerpo primario 2 horas a TA, o bien, toda la noche a 4°C en agitación. Lavar la membrana con TBS-T; por ejemplo, 3 veces 10 minutos (excepto p21, se lava una sola vez). Incubar con anticuerpo secundario 1 hora a TA. Lavar nuevamente con TBS-T 3 veces. Eliminar exceso de buffer, añadir la mezcla 1:1 de solución de revelado con pico o femto luminol. Incubar entre 1 a 2 minutos a TA y retirar el exceso de luminol. Adquirir imágenes con fotodocumentador.

Citometría de flujo

1. Sembrar células aproximadamente al 50% de confluencia.
2. Al concluir el experimento, recuperar el medio de cada pozo en tubos de 5 ml para citometría.
3. Lavar células con 2 ml de PBS 1X: Muy cuidadosamente para no levantarlas.
4. Tripsinizar y resuspender células suavemente, colocarlas en el tubo en el cual se recuperó el SN.
5. Centrifugar a TA, eliminar el SN, resuspender pellet c/golpes suaves.
6. Agregar 4 ml de PBS para lavar las células.

7. Centrifugar de nuevo y eliminar cuidadosamente el SN.
8. Agregar 100 μ l de buffer de anexina 1X (viene 10X, se diluye con agua):
9. Resuspender con golpes suaves.
10. Agregar a cada tubo 2 μ l de anexina y/o 2 μ l 7-AAD y/o yoduro de propidio (PI).
11. Considerar siempre los siguientes controles para compensación y controles positivos: a) sin tinción, b) Anexina V-FITC, c) 7-AAD o PI y d) Anexina/7-AAD o PI.
12. Incubar 15 minutos a TA protegido de la luz (mínimo 5 minutos y no más de 1 hora).
13. Leer en citómetro.

Ensayo de β -galactosidasa asociada a senescencia

1. Lavar células en PBS 1X, 1 ml.
2. Fijar células con 500 μ l de solución de fijación 1X durante 10 minutos a TA.
3. Lavar 2 veces con PBS 1X.
4. Añadir 400 μ l de solución teñidora para β galactosidasa y dejar toda la noche a 37°C con papel aluminio y en oscuridad.
5. Al día siguiente, quitar la solución y añadir PBS 1X.
6. Añadir Tritón al 2.5% durante 10 minutos para permeabilizar.
7. Retirar Tritón y lavar con agua dde.
8. Añadir 25 μ l de hematoxilina e incubar durante 15'.
9. Dar 3 lavados con agua.

10. Montar laminillas: Se añaden 5 μ l de Glycogel el cual se calienta previamente a 60°C. En cada portaobjetos caben 3 cubreobjetos.

Article

Lack of ZNF365 Drives Senescence and Exacerbates Experimental Lung Fibrosis

Juan Urista ¹, Mariel Maldonado ², Fernanda Toscano-Marquez ¹, Remedios Ramírez ¹,
Yalbi Itzel Balderas-Martínez ², Carina Becerril ², Yair Romero ¹, Moisés Selman ² and Annie Pardo ^{1*}

¹ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico

² Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, "Ismael Cosío Villegas", Ciudad de México 14080, Mexico

* Correspondence: apardos@unam.mx

Abstract: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is characterized by aberrant activation of the alveolar epithelium, the expansion of the fibroblast population, and the accumulation of extracellular matrix. Global gene expression of human lung fibroblasts stimulated with TGF β -1, a strong fibrotic mediator revealed the overexpression of ZNF365, a zinc finger protein implicated in cell cycle control and telomere stabilization. We evaluated the expression and localization of ZNF365 in IPF lungs and in the fibrotic response induced by bleomycin in WT and deficient mice of the orthologous gene *Zfp365*. In IPF, ZNF365 was overexpressed and localized in fibroblasts/myofibroblasts and alveolar epithelium. Bleomycin-induced lung fibrosis showed an upregulation of *Zfp365* localized in lung epithelium and stromal cell populations. *Zfp365* KO mice developed a significantly higher fibrotic response compared with WT mice by morphology and hydroxyproline content. Silencing ZNF365 in human lung fibroblasts and alveolar epithelial cells induced a significant reduction of growth rate and increased senescence markers, including Senescence Associated β Galactosidase activity, p53, p21, and the histone variant γ H2AX. Our findings demonstrate that ZNF365 is upregulated in IPF and experimental lung fibrosis and suggest a protective role since its absence increases experimental lung fibrosis mechanically associated with the induction of cell senescence.

Keywords: zinc finger protein ZNF365; pulmonary fibrosis; TGF β -1; cellular senescence



Citation: Urista, J.; Maldonado, M.; Toscano-Marquez, F.; Ramírez, R.; Balderas-Martínez, Y.I.; Becerril, C.; Romero, Y.; Selman, M.; Pardo, A. Lack of ZNF365 Drives Senescence and Exacerbates Experimental Lung Fibrosis. *Cells* 2022, 11, 2848. <https://doi.org/10.3390/cells11182848>

Academic Editor: Nina Zidar

Received: 21 July 2022

Accepted: 6 September 2022

Published: 13 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive, irreversible, and lethal lung disease of unknown etiology that is associated with high morbidity and mortality. Although great efforts have been made in recent years trying to elucidate the molecular and cellular mechanisms underlying its pathogenesis and progression, there are still many questions left unanswered. IPF is an epithelial-fibroblastic disease, where the aberrant activation of alveolar epithelial cells results in the secretion of multiple profibrotic mediators such as TGF β -1, TNF α , and PDGF, among others. These factors induce the migration and proliferation of fibroblasts and their differentiation to myofibroblasts [1–3].

TGF β -1 is one of the most important mediators that orchestrate fibrotic lung disease. Global gene expression analysis revealed that ZNF365, a zinc finger protein, is overexpressed by the effect of TGF β -1 in lung fibroblasts derived from control subjects and IPF patients [4,5]. However, its role in this disease has not been explored.

Studies reported in the literature regarding the role of ZNF365 are scant; it has been observed to be associated with DNA double-strand break repair mechanisms through physically interacting with the exonuclease MRE11 and Poly ADP Ribose Polymerase 1 (PARP1) and regulating stalled replication forks which result from DNA double-strand breaks (DSBs) [6]. It has also been described as a target of p53 in cells undergoing telomeric stress, avoiding the formation of anaphase DNA bridges [7]. In murine models lacking the orthologue of ZNF365, known as *Zfp365*, although no evident phenotype has been

described, there are some defects in neuronal migration from the brain's subventricular zone to the cerebral cortex [8,9]. Another important function described for this molecule is its involvement in the correct chromosome segregation during mitosis by interacting with centrosome proteins such as Nde1 [10].

Many zinc finger proteins have been described earlier participating in IPF, for example, Gli transcription factors from the Sonic Hedgehog (SHH) signaling pathway. Other authors have described the zinc finger protein family members as differentially methylated in IPF [11,12].

Thus, this study aimed to evaluate the expression and cellular localization of ZNF365 in IPF lungs and to analyze the role of ZNF365 in the lung fibrotic response induced by bleomycin in WT mice and mice deficient in the orthologous gene. We also examined the effect of ZNF365 silencing on normal human lung fibroblasts and alveolar epithelial cells in vitro and analyzed its putative mechanism.

2. Results

2.1. ZNF365 Is Increased in IPF Lung Tissue, and It Is Located in Fibroblastic Foci and Alveolar Epithelial Cells

We first determined the expression and localization of ZNF365 in IPF and control lung tissues by immunohistochemical (IHC) staining. As shown in Figure 1A, panels a, b, and c, immunoreactive ZNF365 was present in alveolar epithelial cells delineating a cystic space (b) and in fibroblasts from fibroblastic foci in IPF lungs (c). In contrast, in normal lung tissue, ZNF365 staining was virtually absent (panel d). No staining was observed when the specific antibody was omitted (panel e). These findings indicate that ZNF365 is overexpressed in IPF lungs and localized predominantly in fibroblasts from fibroblastic foci and alveolar epithelium.

In silico analysis of single-cell transcriptional atlas of the lungs of IPF patients corroborated that ZNF365 is mainly expressed in fibroblasts, myofibroblasts, and alveolar epithelial type 1 and type 2 cells, as well as other epithelial and fibroblasts "rare" subpopulations (Figure 1B).

2.2. ZNF365 Mouse Orthologue, *Zfp365*, Is Overexpressed in Lungs from Mice Treated with Bleomycin

We then evaluated the expression of the gene orthologue, *Zfp365*, by qPCR analysis of lung tissue and the cellular localization by IHC staining in WT mice after bleomycin injury. At the mRNA level, a significantly increased expression of *Zfp365* in lungs derived from bleomycin instilled mice at 21 days was observed ($p < 0.001$) (Figure 2A). This was corroborated by IHC (Figure 2B), where *Zfp365* is overexpressed in bleomycin-instilled mice and localized in alveolar and bronchial epithelial cells and some stromal cell populations (panel a). *Zfp365* was nearly absent in the lungs of mice instilled with saline solution (panel b). No specific signal was observed when the specific antibody was absent (panel c).

2.3. TGF β -1 Stimulates the Expression of ZNF365 in Normal and IPF Lung Fibroblasts and in the A549 Epithelial Cell Line

To corroborate results obtained with global gene expression [4,5], we exposed fibroblasts derived from normal human and IPF lungs to TGF β -1. This potent profibrotic mediator plays a relevant role in lung fibrosis. As shown in Figure 3A,B, ZNF365 was significantly overexpressed at mRNA ($p < 0.05$) and protein levels in both normal and IPF fibroblasts after TGF β -1 stimulation (10 ng/mL) for 24 h. Since ZNF365 was also found overexpressed in alveolar epithelium from IPF lungs, we examined its expression in the A549 epithelial cell line stimulated with TGF β -1 by qPCR and Western blot. As shown in Figure 3C,D, ZNF365 was significantly upregulated at both mRNA ($p < 0.05$) and protein levels.

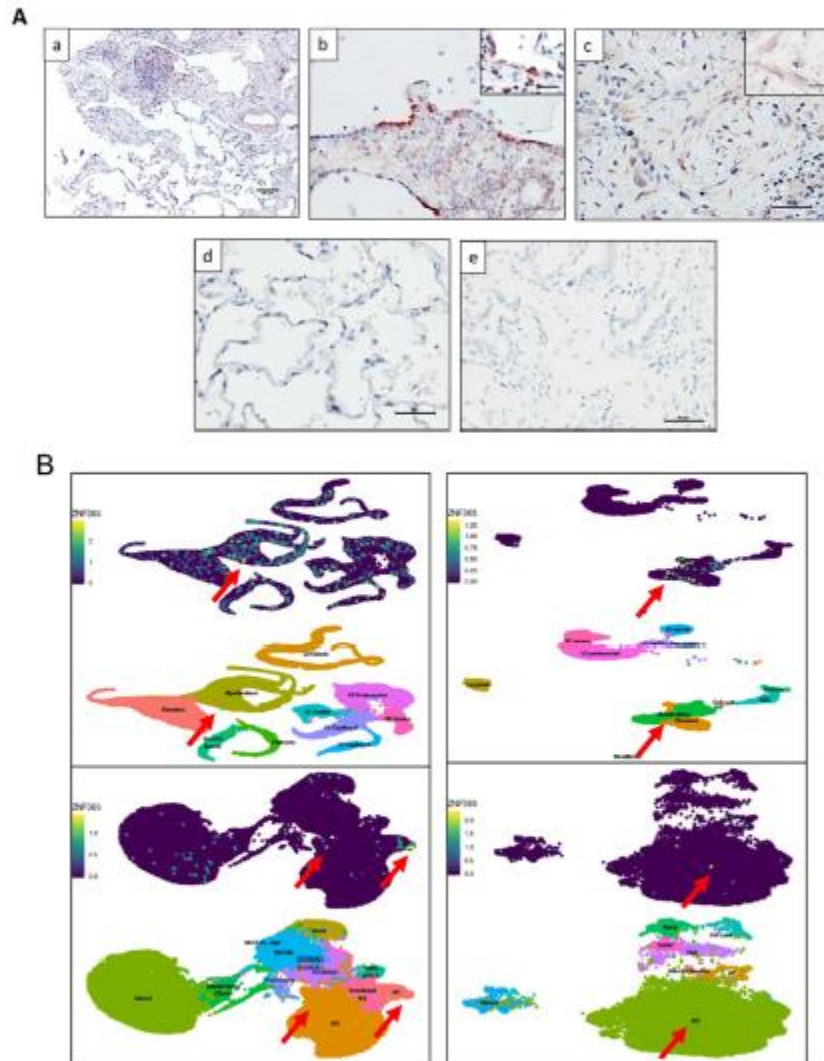


Figure 1. ZNF365 is expressed in IPF lung tissues. (A) ZNF365 is overexpressed in IPF lung tissues ($n = 5$), and human control lungs ($n = 2$) were stained for immunohistochemistry with the specific antibody. (a) Immunoreactive protein was located in fibroblast foci and alveolar epithelial cells (scale bar 100 μm). (b,c) Representative epithelial cells and fibroblasts in two different magnifications (scale bars 50 and inset 25 μm). (d) Immunostaining of lung tissue from control donor (scale bar 50 μm). (e) Immunostaining of IPF lung tissue without the primary antibody (scale bar 50 μm). (B) ZNF365 expression according to scRNAseq experiments from IPF Cell Atlas. (<http://ipfcellatlas.com/>, 9 August 2022).

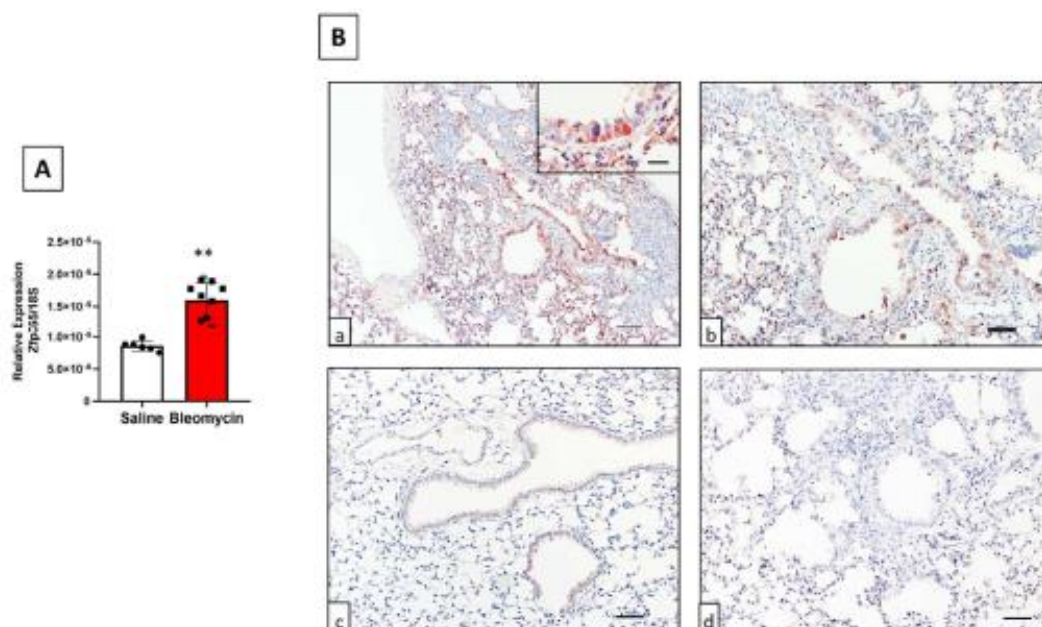


Figure 2. Zfp365 is overexpressed in lungs from mice exposed to bleomycin after 21 days. **(A)** Zfp365 expression by qPCR in lungs of mice treated with bleomycin ($n = 9$) or saline solution ($n = 6$). The graph represents the mean \pm SD. ** $p < 0.001$ by a two-tailed Student's *t*-test with Welch's correction. **(B)** IHC of lung tissues from mice instilled with saline solution or bleomycin. **(a,b)** Bleomycin-treated mice showed immunoreactive protein primarily in alveolar and bronchial epithelial cells and some stromal cell populations ($n = 2$) (scale bars 100 μ m, 50 μ m, and inset 25 μ m). **(c)** Immunostaining in control mice instilled with saline solution ($n = 2$) (scale bar 50 μ m). **(d)** Immunostaining of bleomycin-treated mice without the primary antibody (scale bar 100 μ m).

2.4. Zfp365 KO Mice Display an Exacerbated Fibrotic Response to Bleomycin

To explore the role of Zfp365 *in vivo*, WT C57BL/6 and Zfp365 deficient mice (Supplementary Figure S1) were intratracheally instilled with bleomycin or saline solution as controls. After 21 days, mice were sacrificed, and histological changes and hydroxyproline content were assessed. To evaluate the fibrotic response quantitatively, we measured hydroxyproline content in both WT and Zfp365 KO mice lungs. As illustrated in Figure 4A, bleomycin-instilled Zfp365 deficient mice displayed a significant increase in hydroxyproline content compared with WT mice (184.3 \pm 58.8 versus 135.2 \pm 40.5 μ g/lung, $p < 0.05$). Zfp365 KO mice showed an accumulation of collagen fibers as indicated by Masson's trichrome staining compared with their WT counterparts (Figure 4B). The semiquantitative fibrosis score showed a tendency to increase in Zfp365 deficient mice, although it did not reach statistical significance, likely because of the heterogeneity of the lesions and the sample size (Figure 4C).

2.5. ZNF365 Silencing Induces a Senescent Phenotype in Fibroblasts and Epithelial Cells

Considering that Zfp365 deficient mice developed severe lung fibrosis after bleomycin instillation, we decided to explore *in vitro* the functional behavior of lung fibroblasts and epithelial cells after silencing this zinc finger protein. Using specific siRNA sequences and their respective scrambled control sequences, we show with qPCR analysis that ZNF365 mRNA was significantly downregulated at 48 h in both cell types ($p < 0.05$) (Figure 5A,B). After silencing the gene in lung fibroblasts and in A549 epithelial cells, we performed a

growth rate analysis using WST-1. A significant decrease was observed in silenced cells for ZNF365 at 48 and 72 h ($p < 0.001$) (Figure 5C,D).

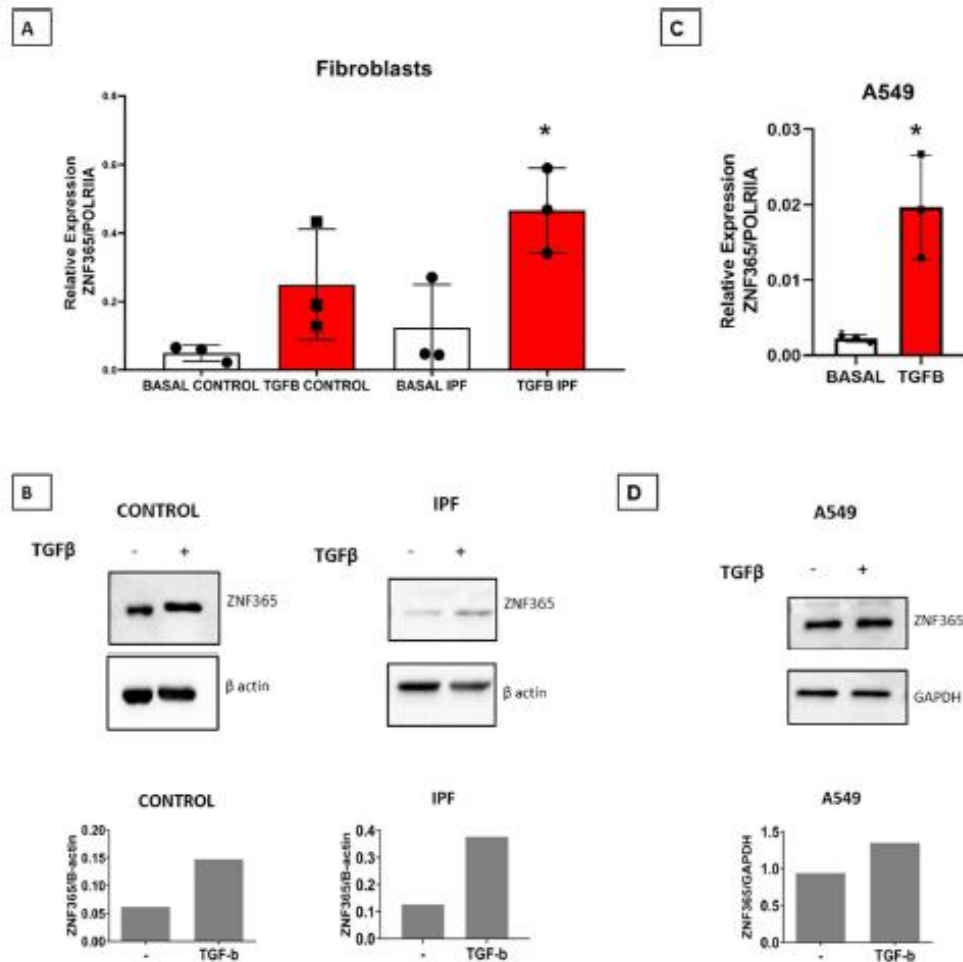


Figure 3. TGFβ-1 induces the overexpression of ZNF365. (A) ZNF365 expression in control ($n = 3$) and IPF lung fibroblasts ($n = 3$) by qPCR after 24 h of TGFβ-1 stimulation. (B) Western Blot and the corresponding densitometric analysis; β actin was used as the internal loading control. (C) ZNF365 expression in A549 cells and after 24 h of TGFβ-1 stimulation ($n = 3$). (D) Western blot and corresponding densitometric quantification; GAPDH was used as the internal loading control. * $p < 0.05$ by a two-tailed Student's *t*-test with Welch's correction.

As growth rate involves proliferation and cell death, we measured the early and late apoptosis using 7-AAD and Annexin V staining by flow cytometry. After an apoptotic stimulus of bleomycin (30 mU) for 48 h, no significant differences in A549 cells silenced for ZNF365 and those with scrambled control sequences were found. Also, after an apoptotic stimulus with staurosporine (0.1 and 0.5 μM) for 1 h, no significant differences were observed in human lung fibroblasts silenced for ZNF365 (Supplementary Figure S2). Additionally,

we investigated if fibroblast silencing of ZNF365 affects Col1a1 and Col1a3 expression. Our results showed an increase in both gene expressions (Supplementary Figure S3).

The findings that silencing of ZNF365 reduced cell growth rate without affecting cell death suggested that senescence might be involved as a mechanism contributing to the functional effect of this molecule. Accordingly, we analyzed the impact of silencing ZNF365 on the expression of several senescent markers. Senescence-associated beta-galactosidase assay (SA- β Gal) showed increased activity in normal human lung fibroblasts and A549 cells silenced for ZNF365 (Figure 6A,C). As shown in Figure 6B,D, the percentage of SA- β Gal positive cells was significantly higher in the silenced cells after counting ten random bright microscopic fields (20 \times augmentation) by two technical replicates ($p < 0.001$). The analysis by WB of other well-known biomarkers of senescence as p53, p21, γ H2AX, and PARP1 [13] exhibited an increased expression of these four proteins in human lung fibroblasts, and of PARP1, p21, and γ H2AX in A549 epithelial cells (Figure 6E,F).

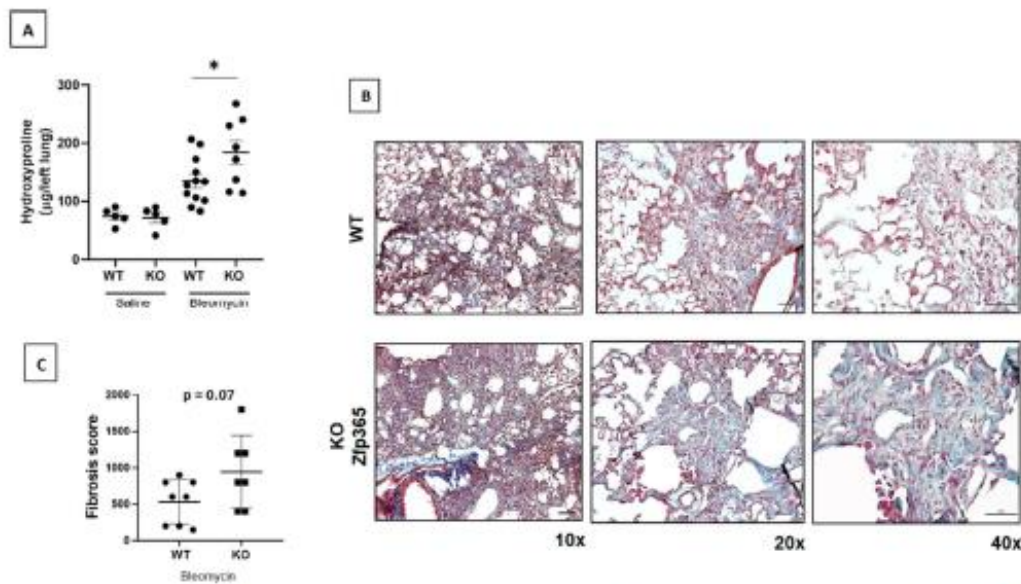


Figure 4. An exacerbated fibrotic response was observed in Zfp365-deficient mice. (A) Lung hydroxyproline content at 21 days after bleomycin instillation of Zfp365 KO mice ($n = 8$) and WT ($n = 12$). (B) Representative light microscopy images of Masson's trichrome stained lung tissue sections in three different magnifications (scale bars 100 and 50 μ m) from WT and Zfp365 KO mice 21 days after bleomycin instillation. (C) Fibrosis score for grading lung histopathological changes. Results are shown as mean \pm SEM. Statistical significance was determined by the Student's *t*-test with Welch's correction (* $p < 0.05$).

In addition, we examined the effect of TGF β -1 stimulation on the expression of senescence markers in ZNF365-silenced human lung fibroblasts and A549 epithelial cells. As shown in Supplementary Figure S4, TGF β -1 increased the expression of p21 and p53 in ZNF365-silenced cells.

2.6. Reduction of ZNF365 Expression in Normal Human Lung Fibroblasts and A549 Epithelial Cells Is Observed by Doxorubicin Treatment

Doxorubicin provokes DNA damage by inhibiting topoisomerase II and has a senescence-promoting effect in different cell types. We found that stimulation of normal human lung fibroblasts or A549 epithelial cells for 48 h with doxorubicin (1.25 μ M) significantly reduces ZNF365 expression both at the mRNA ($p < 0.001$, $p < 0.05$) and protein levels (Figure 7A,B).

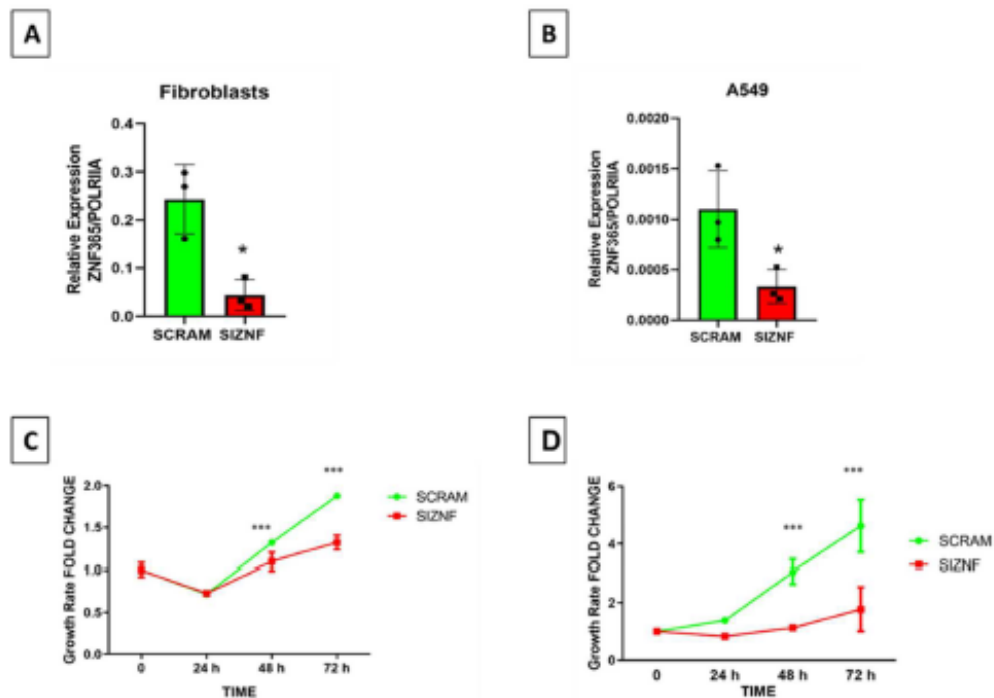


Figure 5. Silencing of ZNF365 reduces fibroblasts and A549 cells growth rate. (A) Expression of ZNF365 was examined by qPCR in normal human lung fibroblasts silenced. (B) Expression of ZNF365 by qPCR analysis in silenced A549 cells. “SCRAM” corresponds to the scrambled control sequences and “SIZNF” to specific siRNA sequences for ZNF365. (C) Growth rate assay of normal human lung fibroblasts using WST-1 reagent. (D) Growth rate assay of A549 cells using WST-1 reagent. Graphics represent three independent experiments by triplicate (qPCR) and curves represent one of three independent experiments by quadruplicate (WST-1) (mean \pm standard deviation). * $p < 0.05$, by a two-tailed Student’s *t*-test with Welch’s correction; *** $p < 0.001$ by two-way ANOVA with Bonferroni’s posttest.

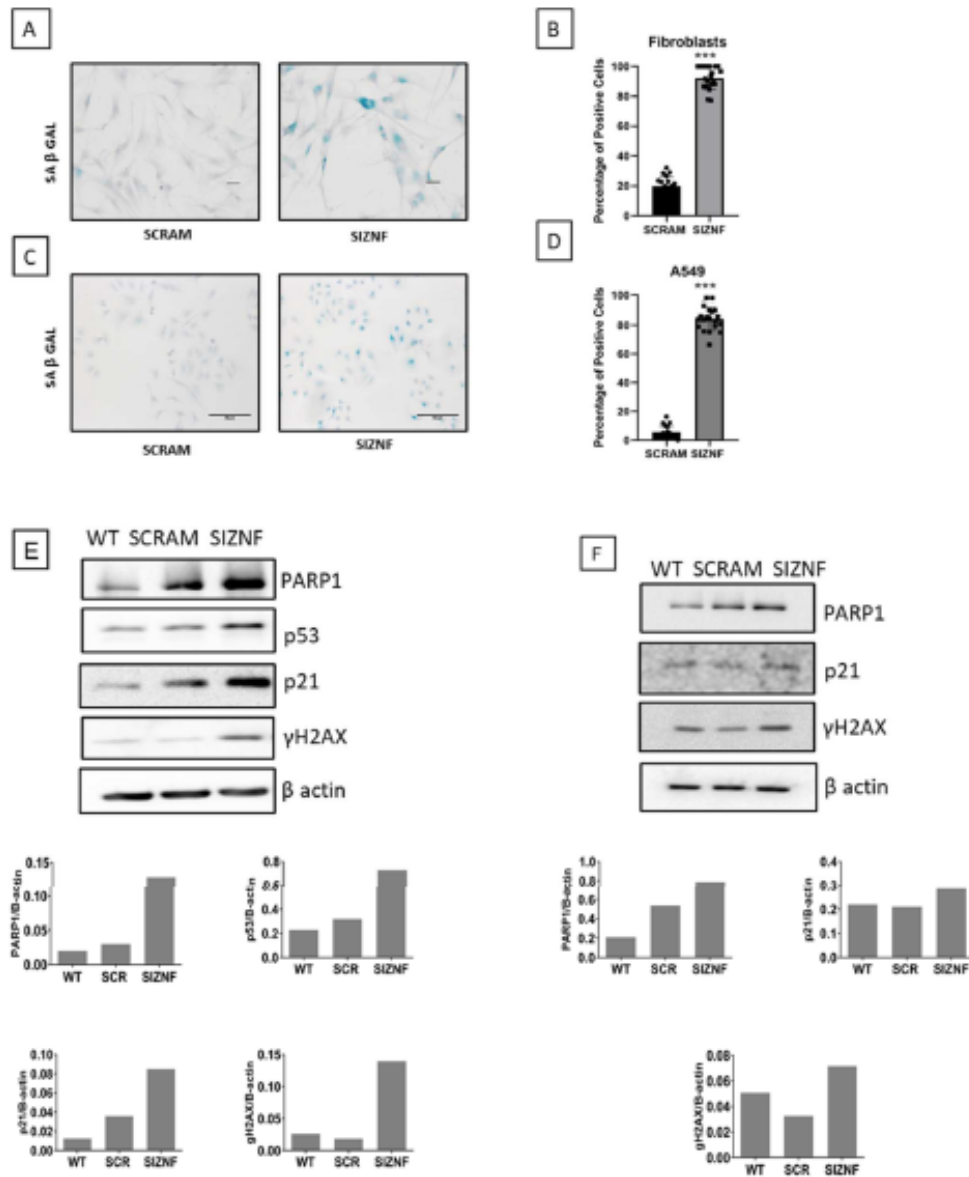


Figure 6. Normal human lung fibroblasts and A549 cells acquire a senescent phenotype after ZNF365 silencing. Senescence-associated β galactosidase activity (SA-β Gal) staining photomicrograph of normal human lung fibroblasts (A) and A549 epithelial cells (C) transfected with scrambled control sequences “SCRAM” or with specific siRNA sequences for ZNF365 “siZNF” (Scale bar 100 μm). (B,D), Percentage of positive SA-β Gal staining. Western blot analysis of senescent markers in ZNF365 silenced normal human lung fibroblasts (E) and A549 cells (F); β actin was used as the internal loading control. Densitometric analyses are shown. (B,D) graphics represent the mean ± SD of one experiment with two technical replicates and ten random bright microscopic fields counted for each replicate. *** $p < 0.001$ by a two-tailed Student’s *t*-test with Welch’s correction.

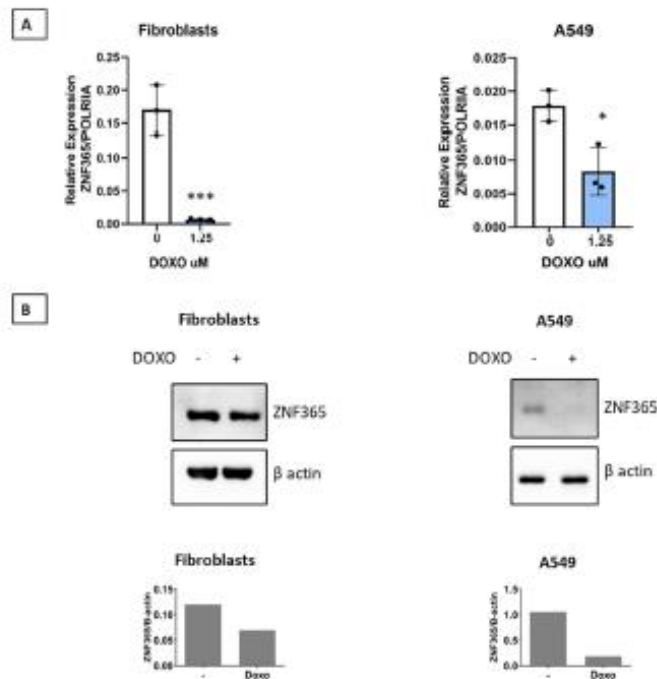


Figure 7. ZNF365 expression is significantly reduced by doxorubicin treatment. (A) Doxorubicin treatment reduces ZNF365 expression in normal human lung fibroblasts and A549 cells. (B) Western Blot analysis showing ZNF365 downregulation after 48 h of doxorubicin treatment; β actin was used as the internal loading control. Densitometric analysis is shown. Graphics represent the mean \pm SD of one of two independent experiments. * $p < 0.05$, and *** $p < 0.001$ by two-tailed Student's *t*-test.

3. Discussion

IPF is an age-dependent and devastating disease [1,2], with complex and as yet poorly understood disease mechanisms.

TGF β -1 has long been recognized as one of the critical molecules driving fibrosis in different organs and tissues. A great variety of genes are regulated by TGF β -1 directly or indirectly (e.g., through the crosstalk with other pathways) [14]. Among all these genes, the zinc finger protein ZNF365 was one of the most upregulated genes in basal and IPF lung fibroblasts after TGF β -1 stimulation when compared with untreated control fibroblasts [4,5].

ZNF365 is an essential target whose activation by p53 in cells with critically short telomeres contributes to genomic stability. Moreover, in cells with telomere dysfunction, one of the most strongly upregulated genes upon reconstitution of p53 activity is ZNF365 [7]. This function suggests that the upregulation of ZNF365 in IPF cells may represent the consequence of exaggerated shortening of telomeres, which has been widely demonstrated in epithelial cells and fibroblasts, usually associated with senescence and exerted by these cells as a defensive mechanism [15,16]. When we explored single-cell expression data downloaded from GEO accession number GSE136831 (see Supplementary Methods), we observed several types of epithelial cells, including basaloid, express this zinc finger protein, and senescent markers (Supplementary Figure S5). However, the putative role of ZNF365 in IPF and other fibrotic lung disorders characterized by short and dysfunctional telomeres [2] has not been examined.

Our study demonstrated that ZNF365 is upregulated in IPF lungs compared to healthy lungs. It was found in some fibroblastic foci and alveolar epithelial cells, which have been primarily characterized as the main cellular effectors in IPF pathophysiology. As a proof of concept, we explored the IPF Cell Atlas web page (<http://ipfcellatlas.com/> accessed on 9 August 2022) [17–20] and identified some fibroblasts, myofibroblasts, and epithelial cell populations that overexpress ZNF365. We validated these results with qPCR and WB analysis, demonstrating that after 24 h of TGF β -1 stimulation, ZNF365 is overexpressed in normal human lung and IPF-derived fibroblasts. Given the strong ZNF365 signal in alveolar epithelial cells in IPF lung tissues, we also measured its expression in the A549 epithelial cell line by qPCR and WB, corroborating that ZNF365 is upregulated in these cells by the effect of TGF β -1.

The expression level of ZNF365 was also examined in lung homogenates from bleomycin-treated mice at day 21 (fibrotic phase), where we found that *Zfp365*, the gene orthologue of ZNF365, was also overexpressed compared to the saline controls. Moreover, paralleling the results in IPF, the protein's location was found mainly in alveolar and bronchial epithelial cells and some stromal populations. In this context, it is well-known that, although useful for many fibrosis-related questions, the bleomycin-induced lung fibrosis model has limitations regarding understanding the progressive nature of human IPF. Among them, the development of fibroblastic foci characteristic of IPF, where we markedly found the expression of ZNF365, is challenging to observe in this experimental model. When we explored the lung fibrotic response in *Zfp365*-deficient mice after bleomycin installation, we found that these mice displayed an augmented fibrotic response when compared to wild-type animals as assessed by histological analysis and measurement of hydroxyproline content, suggesting that this zinc protein could have an antifibrotic effect.

Although at first sight it seems paradoxical that KO mice develop a higher level of lung fibrosis, while this zinc finger protein is upregulated in IPF, there are many examples of antifibrotic molecules overexpressed in IPF lung tissues that, when downregulated in experimental models, provoke an increased fibrotic response [21–23]. This singularity can be explained in the context that during the development of IPF, numerous profibrotic mediators are upregulated, and the increased expression of some antifibrotic molecules likely represents a defensive but insufficient mechanism.

To gain a deeper insight into the possible mechanisms, we explored in vitro the potential function of ZNF365 in human lung fibroblasts and the A549 epithelial cell line, transiently knocking down the gene. We investigated whether the silencing of ZNF365 in human lung fibroblasts and A549 epithelial cells had any significant effect on cell cycle regulation. Our results showed that ZNF365 silenced cells displayed a substantial reduction of cell growth, with no effect on cell death. Similar results were described with the loss of ZNF365 in the U2OS cell line, resulting in an arrest in the G1/S phase and delayed mitotic progression [6]. This observation suggested that the deficiency of this gene could probably be related to the induction of a senescent phenotype. For this purpose, we examined SA- β Gal activity and measured the expression of proteins considered general biomarkers of cellular senescence in human lung fibroblasts and A549 epithelial cells [24,25]. We found a significantly increased percentage of SA- β Gal positive cells in both cell types silenced for ZNF365. Likewise, an increased expression of PARP1, p21, and γ H2AX was observed by Western blot in both cell lines. Importantly, cellular senescence in human lung fibroblasts and alveolar epithelial cells has been recently associated as one of the major drivers in the pathogenesis of IPF [14,26,27]. Cellular senescence is characterized by the inability to proliferate and the production of an abundant pro-fibrotic and pro-inflammatory secretome.

Doxorubicin has long been recognized as a DNA damaging agent as it inhibits topoisomerase II activity, and its role as a senescence-promoting drug has also been described [13,28,29]. We evaluated whether doxorubicin affected the expression of ZNF365 in human lung fibroblasts and A549 epithelial cells, and found a significant decrease in ZNF365 expression in both cell types. Interestingly, doxorubicin also causes significant degradation of PARP1, one of the top downregulated genes when cells are exposed to

different senescent promoting stimuli, such as replicative exhaustion, ionizing radiation, doxorubicin treatment, or HRAS^{G12V} overexpression [13]. Interestingly, doxorubicin treatment in lung cancer cells promoted the upregulation of miR-7-5p, which targets PARP1. This same microRNA is predicted from the miRtarBase to target ZNF365. We can speculate that the observed reduction in ZNF365 expression following doxorubicin treatment in our study could result from the same miRNA (senescence-associated miRNA [30]) or, since both molecules physically interact, they could work through feedback loops.

Silencing ZNF365 alone provoked cellular senescence in human lung fibroblasts and A549 cells. It also promoted PARP1 upregulation, which could be a compensation mechanism as ZNF365 is an important molecule for DNA repair [6].

In summary, we have discovered that ZNF365 is upregulated in hyperplastic alveolar epithelial cells and fibroblast foci in IPF lung, as well as in a mice experimental pulmonary fibrosis model, likely as a defense mechanism. The putative antifibrotic protective role of ZNF365 seems to be associated with the regulation of cellular senescence. Indeed, further research is necessary to understand better its functions, which will improve our knowledge about the pathogenesis of this disease.

4. Material and Methods

4.1. Human Samples

The research protocol was approved by the Ethics Committee of Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas in Mexico City (Identification code: (#B15-18)). Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples from surgical lung biopsies were used for immunohistochemical analysis. Lung samples from five patients with IPF and two controls were used. IPF diagnosis was undertaken by the Interstitial Lung Disease Program of the INER according to the ATS/ERS/ALAT guidelines.

4.2. Immunohistochemistry

Immunohistochemical analysis was performed, as we describe next. Briefly, lung tissues derived from control subjects and IPF patients were deparaffinized, rehydrated, and incubated for 30 min with hydrogen peroxide diluted in methanol to eliminate endogenous peroxidase activity. Antigen retrieval was performed using citrate buffer Ph6. Tissues were blocked using Universal Blocking Solution (Biogenex, San Ramon, CA, USA) for 10 min and then incubated with fetal bovine serum (Gibco, Waltham, MA, USA) for 30 min. Samples were incubated at 4 °C overnight with the ZNF365 primary antibody (Thermo Scientific, PA5-40514 (1:50), Waltham, MA, USA). After primary antibody incubation, lung tissues were incubated with biotinylated secondary antibody (Biogenex, San Ramon, CA, USA) for 20 min. Samples were incubated with streptavidin coupled with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Biogenex, San Ramon, CA, USA) for 20 min. Immunodetection was performed with acetate buffer containing 0.05% H₂O₂ and 3-Amino-9-ethyl carbazole (AEC) (Biogenex, San Ramon, CA, USA) chromogen. The sections were counterstained with hematoxylin. The primary antibody was replaced by nonimmune serum for negative control slides. Images were taken with a Nikon microscope and were analyzed with NIS-Elements Software.

4.3. Cell Culture

Normal human lung fibroblast cell lines NHLF (Lonza Clonetics, New York, NY, USA), LL24 from ATCC (CCL151), and HPF (Promocell, Waltham, MA, USA) were used. Primary cultures of lung fibroblasts from control donors and IPF patients were obtained as previously described [4] and were used between passages 4 to 11. HPF lung fibroblasts were used for functional and senescence experiments. A549 cells were purchased from ATCC (CCL-185). Cells were cultured with HAM's F12 medium (Gibco, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic/antimycotic (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Cells were incubated at CO₂-95% air at 37 °C as described elsewhere [4].

4.4. TGF β -1 and Doxorubicin Stimulation

At 70% confluence, human lung fibroblasts were serum-starved for 24 h and A549 epithelial cells for 48 h and then stimulated with TGF β -1 (R & D, Minneapolis, MN, USA) at a final concentration of 10 ng/mL in Ham's F12 with low serum (0.1%). For doxorubicin (Sigma, Saint Louis, MO, USA) stimulation, cells were seeded at 50% confluence. After 24 h, the medium was removed and replaced with Ham's F12 medium with a low serum concentration (2% for A549 and 1% for normal human lung fibroblasts) and [1.25 μ M] doxorubicin was added.

4.5. Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR)

RNA was extracted using a Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). One μ g RNA was used for RT-PCR using Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Quantitative PCR (qPCR) was performed using specific Taqman probes (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) for ZNF365 (Hs00921620_m1), Zfp365 (Mm00618458_m1), PARP1 (Hs00242302_m1); 18S (Hs03003631_g1) and POLR2A (Hs00172187_m1). Lightcycler 480 (Roche, Basel, Switzerland) thermal cycler was used for qPCR experiments, and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was used for data analysis.

4.6. Western Blot

Total lysates from lung fibroblasts and A549 cells obtained with RIPA lysis buffer (Saint Louis, MO, USA) were loaded under denaturing conditions onto 10% to 12% SDS/PAGE polyacrylamide gels. Proteins were transferred into nitrocellulose membranes (BioRad, Hercules, CA, USA) and then were blocked using 5% skim milk diluted in 0.05% TBS-T for 1 h. The following primary antibodies were used overnight: for ZNF365 (Abcam, ab157459 (1:500) and ab22890 (1:200), Cambridge, MA, USA), PARP1 (Cell Signaling, (1:500), Danvers, MA, USA), p21 (Santa Cruz, sc-6246, (1:500) Santa Cruz, CA, USA), γ H2AX (Abcam, ab81299 phosphorylation of S139, (1:500), Cambridge, MA, USA) p53 (R&D, AF1355, (1:2000), Minneapolis, MN, USA), as well as β actin (Sigma Aldrich, AC-74 (1:10,000), Saint Louis, MO, USA) and GAPDH (Thermo Scientific, PA1-987 (1:2000), Waltham, MA, USA). After TBS-T washing, membranes were incubated with specific HRP-associated secondary antibodies. They were developed with Luminol reagent SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) using ChemiDoc Gel Documentation System (BioRad, Hercules, CA, USA). Images were analyzed using ImageLab software (BioRad, Hercules, CA, USA), and densitometric analyses were performed.

4.7. ZNF365 Silencing

Specific siRNA and Scrambled Negative Control sequences were used in silencing ZNF365 (Origene #SR307854). Briefly, normal human lung fibroblasts and A549 cells were plated on 6, 12, 24, and 96 well plates at a maximum confluence of 70%. Specific siRNA and Scrambled Control sequences were mixed with cells using lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) before plating at a final concentration of 20 nM for both. Cells were used for RNA, protein, growth rate, and SA- β Gal experiments.

4.8. Growth Rate Experiments

A549 cells (2×10^3 cells/per well) and normal human lung fibroblasts (5×10^3 cells/per well) were plated on 96 well plates with the mixture of specific siRNAs and Scrambled Negative Control sequences in Ham's F12 medium and HPF specific medium. After 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h, cells were incubated with WST-1 reagent (Roche) and was used according to the manufacturer's recommendations. Absorbance was measured in Synergy (BioTek, Winooski, VT, USA) equipment at 450 nm and the reference at 620 nm.

4.9. Apoptosis

A549 cells previously silenced for ZNF365 (24 h before) were seeded at 70% confluency and stimulated with 30 mU/mL of bleomycin (Cayman) in serum-free medium for 48 h. Normal human lung fibroblasts were seeded at 70% confluency, previously silenced (48 h before) for ZNF365, and stimulated with [0.1 and 0.5 μ M] for 1 h. Cells were harvested and stained with PE Annexin V (556421, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and 7-aminoactinomycin D (7AAD, 559925, Biolegend, San Diego, CA, USA). Cells were analyzed by flow cytometry in a FACSAria flow cytometer (BD Biosciences). Results were analyzed with FlowJo 7.8 software (FlowJo, Ashland, OR, USA, Becton Dickinson, and Company).

4.10. Senescence Associated- β Galactosidase Activity Assay

Cells were set on coverslips, fixed, and stained with the galactosidase activity kit according to the manufacturer's instructions (98605, Cell Signaling). Nuclei were counterstained with hematoxylin. Photographs were taken using an inverted microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and were analyzed with NIS-Elements Software. Finally, positive cells were determined by counting β galactosidase positive cells over total cells per field from two technical replicates and ten random bright microscopic fields counted for each replicate.

4.11. Murine Model of Pulmonary Fibrosis

Animal use complied with the relevant guidelines and regulations for animal care, and the protocol was approved by the Bioethics Committee of INER (Identified Code: B-1518; Date October 2018). Mice with the modified allele EM8383, C57BL/6nTac-Zfp365^{tm1a(KOMP)Wtsi/WtsiOrl}, were purchased from Wellcome Trust Sanger Institute (Genome Research Limited, Hinxton, Cambridge, UK, CB10 1SA), where briefly the exon 2 is deleted when these mice are crossbred with Cre recombinase positive mice, as this exon is flanked by LoxP sites, thereby generating Tm1b allele [31–34]. The KO mice for Zfp365 were treated with an intratracheal injection of 40 μ L of phosphate-buffered saline (PBS) or bleomycin (Cayman) (4.66 mg/kg of body weight) and sacrificed at 21 days. We used male and female mice between 9–10 weeks of age. Right lungs were fixed with 4% paraformaldehyde for staining with hematoxylin and eosin and Masson's trichrome stains. Lung sections were coded and scored blindly for the severity and extent of the fibrotic lesions as previously described [35].

4.12. Determination of Hydroxyproline

Left lungs from mice were hydrolyzed in 6 N HCl for 24 h at 110 °C. Hydroxyproline was determined by measuring the hydroxyproline content as previously described [36]. Briefly, Aliquots were assayed by adding chloramine T (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) solution, followed by development with Erlich reagent. Each sample was tested in duplicate. Data are expressed as μ g of hydroxyproline/left lung.

4.13. Semiquantitative Evaluation of Lung Morphological Lesions

Lung sections were stained with hematoxylin, eosin, and Masson's trichrome and scored blindly for severity and extent of the lesions and percentage of fibrosis as previously described [35]. A fibrosis score was determined by multiplying the extent of the lesion \times percentage of fibrosis \times severity.

4.14. Statistical Analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 Software (La Jolla, CA, USA). All data are expressed as the mean \pm standard deviation. Unpaired Student's *t*-test, one- and two-way ANOVA with Bonferroni correction were performed as indicated for each experiment. A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11182848/s1>. Figure S1: *Zfp365* gene expression is absent in K.O. mice; Figure S2: ZNF365 silencing does not affect the apoptotic rate in normal human lung fibroblasts and A549 cells under basal conditions and after an apoptotic stimulus; Figure S3: Silencing ZNF365 promotes the increase in Col1A1 and Col3A1 in human lung fibroblasts; Figure S4: TGF β -1 stimulation of silenced human lung fibroblasts and A549 cells promotes the expression of senescent markers; Figure S5: Violin plot of the expression of selected genes in epithelial cells obtained from Idiopathic Pulmonary Fibrosis samples (GSE136831 dataset). Ref [37–44] are cited in the supplementary materials.

Author Contributions: A.P. designed the research and supervised the study. J.U., M.M., F.T.-M., Y.R., R.R. and C.B. performed all the experiments. M.S. provided human samples. J.U., M.M., Y.R., F.T.-M., M.S. and A.P. examined and interpreted the experimental data. Y.I.B.-M. developed all the bioinformatics analyses. J.U. and A.P. wrote the original draft. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM (PAPIIT) IN201520 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 281074.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of INSTITUTO NACIONAL de ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSIO VILLEGAS (B-1518, October 2018).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: This paper constitutes a partial fulfillment of J.U. to obtain the PhD “Doctor en Ciencias del Posgrado en Ciencias Biológicas Experimentales” Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received the fellowship 581180 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico (CONACYT). We acknowledge the technical support of Miguel Ángel Pérez León of the del Departamento de Matemáticas, Facultad de Ciencias, UNAM, and Blanca Ortiz-Quintero, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, México for her support with the cell cytometer and software acquisition.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Selman, M.; King, T.E., Jr.; Pardo, A. Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Intern. Med.* **2001**, *134*, 136–151. [CrossRef] [PubMed]
2. King, T.E., Jr.; Pardo, A.; Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* **2011**, *378*, 1949–1961. [CrossRef]
3. Selman, M.; Pardo, A. The leading role of epithelial cells in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Signal.* **2020**, *66*, 109482. [CrossRef]
4. Negreiros, M.; Hagoood, J.S.; Espinoza, C.R.; Balderas-Martínez, Y.I.; Selman, M.; Pardo, A. Transforming growth factor beta 1 induces methylation changes in lung fibroblasts. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0223512. [CrossRef] [PubMed]
5. Renzoni, E.A.; Abraham, D.J.; Howat, S.; Shi-Wen, X.; Sestini, P.; Bou-Gharios, G.; Wells, A.U.; Veeraraghavan, S.; Nicholson, A.G.; Denton, C.P.; et al. Gene expression profiling reveals novel TGF β -1 targets in adult lung fibroblasts. *Respir. Res.* **2004**, *5*, 24. [CrossRef] [PubMed]
6. Zhang, Y.; Park, E.; Kim, C.S.; Paik, J.-H. ZNF365 promotes stalled replication forks recovery to maintain genome instability. *Cell Cycle* **2013**, *12*, 2817–2828. [CrossRef] [PubMed]
7. Zhang, Y.; Shin, S.J.; Liu, D.; Ivanova, E.; Foerster, E.; Ying, H.; Zheng, H.; Xiao, Y.; Chen, Z.; Protopopov, A.; et al. ZNF365 promotes stability of fragile sites and telomeres. *Cancer Discov.* **2013**, *3*, 798–811. [CrossRef] [PubMed]
8. Koyama, Y.; Hattori, T.; Shimizu, S.; Taniguchi, M.; Yamada, K.; Takamura, H.; Kumamoto, M.; Matsuzaki, S.; Ito, A.; Katayama, T.; et al. DBZ (DISC1-binding zinc finger protein)-deficient mice display abnormalities in basket cells in the somatosensory cortices. *J. Chem. Neuroanat.* **2013**, *53*, 1–10. [CrossRef]
9. Okamoto, M.; Iguchi, T.; Hattori, T.; Matsuzaki, S.; Koyama, Y.; Taniguchi, M.; Komada, M.; Xie, M.-J.; Yagi, H.; Shimizu, S.; et al. DBZ regulates cortical cell positioning and neurite development by sustaining the anterograde transport of Lis1 and DISC1 through control of Ndel1 dual phosphorylation. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 2942–2958. [CrossRef]

10. Hirohashi, Y.; Wang, Q.; Liu, Q.; Li, B.; Du, X.; Zhang, H.; Furuuchi, K.; Masuda, K.; Sato, N.; Greene, M.I. Centrosomal proteins Nde1 and Su48 form a complex regulated by phosphorylation. *Oncogene* **2006**, *25*, 6048–6055. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Bolaños, A.L.; Milla, C.M.; Lira, J.C.; Ramírez, R.; Checa, M.; Barreira, L.; García-Álvarez, J.; Carbajal, V.; Becerril, C.; Gaxiola, M.; et al. Role of Sonic hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2012**, *303*, L978–L990. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Sanders, Y.Y.; Ambalavanan, N.; Halloran, B.; Zhang, X.; Liu, X.; Crossman, D.K.; Bray, M.; Zhang, K.; Thannickal, V.J.; Hagoood, J.S. Altered DNA methylation profile in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2012**, *186*, 525–535. [\[CrossRef\]](#)
13. Casella, G.; Munk, R.; Kim, K.M.; Piao, Y.; De, S.; Abdelmohsen, K.; Gorospe, M. Transcriptome signature of cellular senescence. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 7294–7305. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Horowitz, J.C.; Rogers, D.S.; Sharma, V.; Vittal, R.; White, E.S.; Cui, Z.; Thannickal, V.J. Combinatorial activation of FAK and AKT by transforming growth factor- β -1 confers and anoikis resistant phenotype to myofibroblasts. *Cell. Signal.* **2007**, *19*, 761–771. [\[CrossRef\]](#)
15. Lee, J.S.; La, J.; Aziz, S.; Dobrinskikh, E.; Brownell, R.; Jones, K.D.; Achta-Zadeh, N.; Green, G.; Elicker, B.M.; Golden, J.A.; et al. Molecular markers of telomere dysfunction and senescence are common findings in the usual interstitial pneumonia pattern of lung fibrosis. *Histopathology* **2021**, *79*, 67–76. [\[CrossRef\]](#)
16. Álvarez, D.; Cárdenas, N.; Sellanés, J.; Bueno, M.; Corey, C.; Hanumanthu, V.S.; Peng, Y.; D’Cunha, H.; Sembrat, J.; Nouraei, M.; et al. IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2017**, *313*, L1164–L1173. [\[CrossRef\]](#)
17. Reyfman, P.A.; Walter, J.M.; Joshi, N.; Anekalla, K.R.; McQuattie-Pimentel, A.C.; Chiu, S.; Fernandez, R.; Akbarpour, M.; Chen, C.-I.; Ren, Z.; et al. Single-Cell transcriptomic analysis of human lung reveals complex multicellular changes during pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2019**, *199*, 1517–1536. [\[CrossRef\]](#)
18. Morse, C.; Tabib, T.; Sembrat, J.; Buschur, K.; Trejo Bittar, H.; Valenzi, E.; Jiang, Y.; Kass, D.J.; Gibson, K.; Chen, W.; et al. Proliferating SPPI/MERTK-expressing macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* **2019**, *54*, 1802441. [\[CrossRef\]](#)
19. Adams, T.S.; Schupp, J.C.; Poli, S.; Ayaub, E.A.; Neumark, N.; Ahangari, E.; Chu, S.G.; Raby, B.A.; DeIulius, G.; Janusyk, M.; et al. Single Cell RNA-seq reveals ectopic and aberrant lung resident cell populations in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sci. Adv.* **2019**, *6*, eaba1983. [\[CrossRef\]](#)
20. Habermann, A.C.; Gutiérrez, A.J.; Bui, L.T.; Yahn, S.L.; Winters, N.I.; Calvi, C.L.; Peter, L.; Chung, M.-I.; Taylor, C.J.; Jetter, C.; et al. Single-Cell RNA sequencing reveals profibrotic roles of distinct epithelial and mesenchymal lineages in pulmonary fibrosis. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaba1972. [\[CrossRef\]](#)
21. Yu, G.; Kovkarova-Naumovski, E.; Jara, P.; Parwani, A.; Kass, D.; Ruiz, V.; López-Otín, C.; Rosas, I.O.; Gibson, K.E.; Cabrera, S.; et al. Matrix metalloproteinase-19 is a key regulator of lung fibrosis in mice and humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2012**, *186*, 752–762. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Parra, E.R.; Lin, F.; Martins, V.; Rangel, M.P.; Capelozzi, V.L. Immunohistochemical and morphometric evaluation of COX-1 and COX-2 in the remodeled lung in idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis. *J. Bras. Pneumol.* **2013**, *39*, 692–700. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Keerthisingam, C.B.; Jenkins, R.G.; Harrison, N.K.; Hernandez-Rodriguez, N.A.; Booth, H.; Laurent, G.J.; Hart, S.L.; Foster, M.L.; McNulty, R.J. Cyclooxygenase-2 deficiency results in a loss of the anti-proliferative response to transforming growth factor-beta in human fibrotic lung fibroblasts and promotes bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am. J. Pathol.* **2001**, *158*, 1411–1422. [\[CrossRef\]](#)
24. Gorzález-Gualda, E.; Baker, A.G.; Fruk, L.; Muñoz-Espín, D. A guide to assess cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS J.* **2020**, *288*, 56–80. [\[CrossRef\]](#)
25. Di Micco, R.; Krizhanovsky, V.; Baker, D.; di Fagagna, F.D. Cellular senescence in ageing: From mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 75–95. [\[CrossRef\]](#)
26. Pardo, A.; Selman, M. The interplay of the genetic architecture, aging and environmental factors in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2020**, *64*, 163–172. [\[CrossRef\]](#)
27. Yao, C.; Guan, X.; Carraro, G.; Parimon, T.; Liu, X.; Huang, G.; Mulay, A.; Soukiasian, H.J.; David, G.; Weigt, S.S.; et al. Senescence of alveolar type 2 cells drives progressive pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2021**, *204*, 113. [\[CrossRef\]](#)
28. Arcamone, E.; Animati, F.; Cuprunico, G.; Lombardi, P. New developments in antitumor antracyclines. *Pharmacol. Ther.* **1997**, *76*, 117–124. [\[CrossRef\]](#)
29. Bojko, A.; Czarnecka-Herok, J.; Charzynska, A.; Dabrowski, M.; Sikora, E. Diversity of the senescence phenotype of cancer cells treated with chemotherapeutic agents. *Cells* **2019**, *8*, 1501. [\[CrossRef\]](#)
30. Da Silveira, W.A.; Renaud, L.; Hazard, E.S.; Hardiman, G. MiRNA and lncRNA expression networks modulate cell cycle and DNA repair inhibition in senescent prostate cells. *Genes* **2022**, *13*, 208. [\[CrossRef\]](#)
31. White, J.K.; Gerdin, A.-K.; Karp, N.A.; Ryder, E.; Buljan, M.; Bussell, J.N.; Salisbury, J.; Clare, S.; Ingham, N.J.; Podrini, C.; et al. Genome-wide generation and systematic phenotyping of knockout mice reveals new roles for many genes. *Cell* **2013**, *154*, 452–464. [\[CrossRef\]](#)
32. Skarnes, W.C.; Rosen, B.; West, A.P.; Koutsourakis, M.; Bushell, W.; Iyer, V.; Mujica, A.O.; Thomas, M.; Harrow, J.; Cox, T.; et al. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* **2011**, *474*, 337–342. [\[CrossRef\]](#)

33. Bradley, A.; Anastassiadis, K.; Ayadi, A.; Battey, J.E.; Bell, C.; Birling, M.-C.; Bottomley, J.; Brown, S.D.; Bürger, A.; Bult, C.J.; et al. The mammalian gene function resource: The international knockout mouse consortium. *Mamm. Genome* **2012**, *23*, 580–586. [CrossRef]
34. Pettitt, S.J.; Liang, Q.; Rairdan, X.Y.; Moran, J.L.; Prosser, H.M.; Beier, D.R.; Lloyd, K.C.; Bradley, A.; Skarnes, W.C. Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 493–495. [CrossRef]
35. Pardo, A.; Barrios, R.; Gaxiola, M.; Segura-Valdez, L.; Carrillo, G.; Estrada, A.; Mejía, M.; Selman, M. Increase of lung neutrophils and upregulation of neutrophil gelatinase B and collagenase in hypersensitivity pneumonitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2000**, *161*, 1698–1704. [CrossRef]
36. Cabrera, S.; Maciel, M.; Herrera, L.; Nava, T.; Vergara, E.; Gaxiola, M.; López Otín, C.; Selman, M.; Pardo, A. Essential role for the ATG4B protease and autophagy in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Autophagy* **2015**, *11*, 670–684. [CrossRef] [PubMed]
37. Adams, T.S.; Schupp, J.C.; Poli, S.; Ayaub, E.A. Single-cell RNA-seq reveals ectopic and aberrant lung-resident cell populations in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaba1983.
38. Team, R.C. Others. R: A language and environment for statistical computing. *Sci. Adv.* **2013**.
39. Gentleman, R.C.; Carey, V.J.; Bates, D.M.; Bolstad, B.; Dettling, M.; Dudoit, S. Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **2004**, *5*, R80.
40. Hao, Y. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* **2021**, *184*, 3573–3578.e29.
41. Wickham, Y. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer-Verlag: New York, NY, USA, 2016.
42. Available online: https://www.infracfrontier.eu/sites/infracfrontier.eu/files/upload/public/pdf/Resources%20and%20Services/eucomm-alleles-overview_infracfrontier-2016.pdf (accessed on 20 July 2022).
43. Available online: https://www.infracfrontier.eu/sites/infracfrontier.eu/files/upload/public/pdf/Resources%20and%20Services/eucomm_komp-csd_allele_conversion_guide_v3a_2016.pdf (accessed on 20 July 2022).
44. Available online: https://www.infracfrontier.eu/sites/infracfrontier.eu/files/upload/public/pdf/genotype_protocols/EM083_83_geno.pdf (accessed on 20 July 2022).