



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**MODIFICACIONES PULMONARES Y RESPUESTA ANTE EL DAÑO FIBROSANTE EN
RATONES CON ENVEJECIMIENTO ACELERADO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CALYECA GÓMEZ MARÍA DEL JAZMÍN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO CEMO

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DRA. MARINA MACÍAS SILVA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CD. MX.

FEBRERO 2019.



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

**MODIFICACIONES PULMONARES Y RESPUESTA ANTE EL DAÑO FIBROSANTE EN
RATONES CON ENVEJECIMIENTO ACCELERADO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CALYECA GÓMEZ MARÍA DEL JAZMÍN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANNIE PARDO CEMO

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DRA. MARINA MACÍAS SILVA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MÉXICO, CD. MX.

FEBRERO 2019.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/0133/2019

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 Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **14 de enero de 2019**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **CALYECA GÓMEZ MARÍA DEL JAZMÍN** con número de cuenta **303271505** con la tesis titulada: "**Modificaciones pulmonares y respuesta ante el daño fibrosante en ratones con envejecimiento acelerado**", realizada bajo la dirección de la **DRA. ANNIE PARDO CEMO**:

Presidente:	DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA
Vocal:	DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ
Secretario:	DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
Suplente:	DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE
Suplente:	DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 06 de febrero de 2019


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/VMVA/ASR/ipp

Agradecimientos Institucionales

- ❖ Primeramente, al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
- ❖ A los apoyos recibidos por parte de CONACYT (Becario) y proyecto CONACYT 281074.
- ❖ A mi tutora la Dra. Annie Pardo y a los miembros de mi comité tutoral, La Dra. Vilma Maldonado y la Dra. Marina Macías por su apoyo y consejos durante toda esta parte de mi formación académica.

Agradecimientos a título personal

A mis padres, que me dieron la vida y continúan apoyándome incondicionalmente. A mi abuelita Gloria que me educó; a mis hermanos, que sé que no importa donde estén, siguen a mi lado, y a toda mi familia.

Al amor de mi vida, que día a día me da un motivo para seguir esforzándome, me escucha y me soporta aún en días difíciles.

A la Dra. Annie que además de su apoyo académico, me ha brindado un gran apoyo moral; y es una fuente de admiración.

A la Dra Sandra Cabrera, por sus consejos y apoyo.

A todos mis compañeros del laboratorio de Fibrosis por su apoyo incondicional, consejos y enseñanzas. Particularmente, a la M. en C. Remedios Ramírez por todo su apoyo.

Al Dr Alberto Pizaña y a los miembros de su grupo del Biterio del INER, por su apoyo en el cuidado y amntenimiento de la colonia de ratones deficientes de Zmpste24.

A mi Universidad que me dio la oportunidad de llegar hasta donde estoy.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
Indice de abreviaturas.....	11
Resumen.....	13
Abstract.....	15
Introducción.....	17
La FPI, una enfermedad asociada al envejecimiento.....	19
El papel del epitelio alveolar en la FPI	19
Características del envejecimiento.....	21
El envejecimiento acelerado en la FPI.....	25
Cambios epigenéticos en la FPI.....	26
miRNAs:Biogénesis y función.....	27
El papel de los miRNAs en la fibrosis pulmonar.....	29
Ratones con envejecimiento acelerado.....	32
El envejecimiento acelerado en el ratón deficiente de Zmpste24.....	37
Modelo de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina	43
Antecedentes.....	45
Objetivos.....	45

GENERAL.....	45
ESPECIFICOS.....	45
Metodología.....	46
Resultados.....	56
Discusión.....	77
Conclusiones.....	82
Bibliografía.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la localización del pulmón en el cuerpo y magnificación del saco alveolar.....	17
Figura 2. Esquema de cambios del pulmón en el envejecimiento.	18
Figura 3. Papel del epitelio alveolar en la patogénesis de la Fibrosis Pulmonar Idiopática.....	20
Figura 4. Vías que participan en la biogénesis de los microRNAs.....	29
Figura 5. Participación de distintos microRNAs en la patogénesis de la FPI	30
Figura 6. Serie de modificaciones postraduccionales que sufre la Lámina A para su maduración.....	38
Figura 7. Esquema de la formación de la lámina A en condiciones normales y de la prelamina A en ausencia de Zmpste24.....	40
Figura 8. Construcción utilizada para la generación del ratón deficiente de Zmpste24.....	41

Figura 9. Genotipificación de la colonia.	57
Figura 10. Expresión y localización de Zmpste24 en pulmones de ratones jóvenes y viejos.	59
Figura 11. Genes diferencialmente expresados en el envejecimiento normal y acelerado del pulmón.....	61
Figura 12. Genes diferencialmente expresados en el pulmón de ratones viejos C57BL/6 comparados con su contraparte joven.....	63
Figura 13. Genes diferencialmente expresados en el pulmón de ratones deficientes de Zmpste24 comparados contra su contraparte joven.	65
Figura 14. En el envejecimiento del pulmón aumenta el contenido de colágena en ratones silvestres y deficientes de Zmpste24.....	67
Figura 15. Los ratones jóvenes silvestres y Zmpste24 -/- desarrollan una respuesta fibrótica similar después de la inducción de daño con bleomicina.....	69
Figura 16. El envejecimiento protege a los ratones deficientes de Zmpste24 del desarrollo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.	72

Figura 17. Análisis transcriptómico de pulmones dañados con bleomicina de ratones viejos deficientes de Zmpste24 comparados contra su contraparte silvestre.....74

Figura 18. Desregulación de la expresión de miRNAs y de sus genes blancos en pulmones tratados con bleomicina provenientes de ratones viejos Zmpste24 -/- y Zmpste24 +/+ analizada por PCR cuantitativa.
.....77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ratones con tiempo de vida corto.....	32
Tabla 2. Top 50 de genes sobreexpresados y disminuidos en el pulmón de ratones WT viejos comparados con su joven	98
Tabla 3. Top 50 de genes sobreexpresados y disminuidos en el pulmón de ratones viejos deficientes de Zmpste24 comparados con su joven.....	102
Tabla 4. Top 100 de genes sobreexpresados y disminuidos en el pulmón de ratones viejos deficientes de Zmpste24 21días posteriores al daño con bleomicina, comparados contra su respectivo WT.....	106
Tabla 5. miRNAs diferencialmente expresados en el pulmón de ratones viejos deficientes de Zmpste24 21días posteriores al daño con bleomicina, comparados contra su respectivo WT.....	119
Tabla 6. Genes diferencialmente expresados que tienen en común los pulmones de ratones con envejecimiento normal y acelerado.....	121

Índice de abreviaturas

<i>Abreviatura</i>	<i>Descripción</i>
FPI	Fibrosis Pulmonar Idiopática
Col1a1	Colágena tipo I alpha I
Col3a1	Colágena tipo III alpha I
Timp1	Inhibidor de las metaloproteasas I
MMP	Metaloproteasas de matriz
Mmp8	Metaloproteasa de matriz 8
Mmp12	Metaloproteasa de matriz 12
Mmp13	Metaloproteasa de matriz 13
Mmp19	Metaloproteasa de matriz 19
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA_m	Mensajero del Ácido ribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
HCl	Ácido clorhídrico
DEPC	Dietil pirocarbonato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TGFβ_i	Factor de crecimiento transformante beta inducido
TGFβ₁	Factor de crecimiento transformante beta 1
Eln	Elastina

Zmpste24	Metalopeptidasa de zinc 24
α-aml	Alpha actina de músculo liso
CTGF	Factor de crecimiento
Pparg	Receptor de peroxisoma-proliferador- activado gamma
NFκB	Factor nuclear de cadena delgada Kappa activador de células B
MgCl₂	Cloruro de magnesio
dNTP's	Deoxinucleotidos
cDNA	Cadena sencilla de ácido desoxirribonucleico
WT	Silvestre
miRNA	microRNA
Spp1	Fosfoproteína secretada 1
snoRNA	Ácido ribonucleico nucleolar pequeño
LBA	Lavado bronquialveolar
AEC2	Células epiteliales tipo II
WNT	Wingless/integrated

Resumen

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad progresiva y letal de etiología desconocida. Existe una fuerte evidencia que indica que el envejecimiento es una fuerza motora que incrementa la incidencia y prevalencia de la FPI. Sin embargo, los mecanismos que relacionan a la FPI con el envejecimiento no se conocen con precisión. Hasta el momento, son pocos los trabajos que utilizan modelos murinos de fibrosis pulmonar en ratones viejos, debido principalmente a las dificultades prácticas asociadas con la generación y mantenimiento de los animales. Debido a esto, existe un creciente interés por identificar modelos experimentales de envejecimiento acelerado para el estudio del envejecimiento y su asociación a múltiples enfermedades. Recientemente, se describió el ratón deficiente de la metaloproteinasa (Zinc Metallopeptidase STE24) *Zmpste24*, enzima que participa en el proceso de maduración de la proteína nuclear Lámina A, el cual presenta un fenotipo de envejecimiento acelerado que incluye cardiomiopatías, distrofia muscular, lipodistrofia y un tiempo de vida corto de alrededor de 20 semanas.

Con el interés de identificar posibles mecanismos que asocien el envejecimiento con el desarrollo de la fibrosis pulmonar se decidió estudiar el ratón deficiente de *Zmpste24* para analizar si podría ser un modelo de envejecimiento apropiado para este objetivo. Con este propósito, se evaluó la respuesta fibrótica inducida por la administración de bleomicina en estos ratones.

Los ratones jóvenes deficientes de *Zmpste24* desarrollaron fibrosis pulmonar semejante a los ratones jóvenes silvestres, sin embargo, sorpresivamente, los ratones mutantes viejos, no desarrollaron fibrosis pulmonar a diferencia de los silvestres viejos que presentaron una fibrosis pulmonar mayor. Para profundizar en los posibles mecanismos asociados a la protección de

fibrosis pulmonar, a través del estudio de la expresión global de genes se observó en los pulmones de los ratones transgénicos expuestos a bleomicina un incremento en la expresión de algunos microRNAs antifibróticos como, miR23a, miR27a, miR29a, miR145a y miR29b-1. Estos hallazgos fueron validados por qPCR. Del mismo modo, algunos de los blancos predichos de estos microRNAs se encontraron disminuidos, entre estos genes se encontraron *Tgfβ*, *Col1a1*, *Col3a1*, y algunas *Mmps*. Por otra parte, los análisis bioinformáticos revelaron que una serie de vías relacionadas con la respuesta inmune y la respuesta a daño estaban disminuidas en estos individuos.

En conclusión, estos resultados sugieren que el envejecimiento acelerado inducido por la ausencia de *Zmpste24*, resulta en la atenuación de la respuesta fibrótica mediada por la sobreexpresión de microRNAs antifibróticos y la disminución de la expresión de algunos de sus blancos.

Abstract

Idiopathic Pulmonary Fibrosis is a progressive and lethal disease of unknown etiology. Strong evidence indicates that aging is a driving force of the disease and the incidence and prevalence of IPF increases remarkably with age. Notwithstanding, the mechanisms linking IPF to aging are still uncertain. There are scanty works using old mice models of lung fibrosis, the main problem lies in the significant practical difficulties associated with the generation of aged mice, including time and costs of growing up. There is growing interest to identify experimental models of accelerated aging. Recently, it was shown that *Zmpste24* deficient mice displayed accelerated aging. *Zmpste24* is a zinc metalloproteinase responsible for the final cleavage step of nuclear envelop prelamin A, a critical step for its maturation process. This model may be useful to understand some aging-associated mechanisms that may contribute to the development of fibrosis.

To clarify the role of aging in the development of lung fibrosis and to unveil whether *Zmpste24* deficient mice could be an appropriate aging-model for this purpose, we examined their fibrotic response to bleomycin-induced lung damage.

Unexpectedly, we found that old but not young *Zmpste24* deficient mice seem to be protected to develop bleomycin-induced lung fibrosis. The attenuation of the fibrotic response was confirmed by a significant decrease in lung hydroxyproline content. Global gene expression analysis revealed an increased expression of several antifibrotic microRNAs including miR23a, miR27a, miR29a, miR145a and miR29b-1 in bleomycin damaged lungs of *Zmpste24* deficient mice, which was validated by qPCR. As expected, several targets of these microRNAs, including *Tgfβ*,

collagen 1 and 3, and some *Mmp* genes were decreased, and also immunological pathways were found dysregulated, too.

In conclusion, our results suggest that accelerated aging induced by the absence of *Zmpste24*, results in attenuated fibrotic response by the expression of miRNAs that target extracellular matrix targets mRNAs.

Introducción.

El pulmón es un órgano del sistema respiratorio en el que se realiza el intercambio gaseoso, tiene una forma piramidal y se conforma por dos órganos pareados que están conectados a la tráquea por el bronquio derecho e izquierdo; y cubiertos por el diafragma en la parte inferior. Los pulmones están cubiertos por la pleura, la cual está atada por el mediastino. En el humano el pulmón derecho es más pequeño que el izquierdo, aunque el pulmón izquierdo ocupa un menor volumen que el derecho. Visto desde un eje, el ápex de los pulmones es la parte superior, mientras que la base es la región cercana al diafragma(Figura 1).

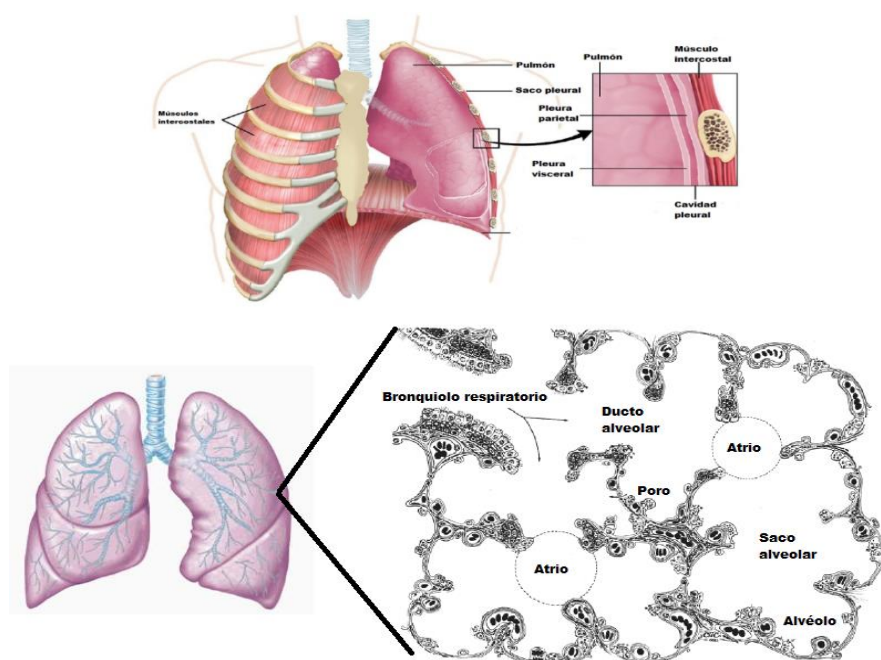


Figura 1. Localización del pulmón en el cuerpo y magnificación del saco alveolar. De arriba hacia abajo. Esquema de la localización del pulmón en el cuerpo. Maximización de la estructura alveolar donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso. (Modificada de Suarez C, 2012).

Las funciones principales del pulmón son obtener oxígeno a partir del aire hacia el interior y remover el dióxido de carbono del cuerpo. Sin embargo, durante la vejez estas funciones se ven deterioradas. Con el envejecimiento, se presenta una disminución de los niveles de oxígeno en el cuerpo, así como una disminución de la liberación de dióxido de carbono hacia el exterior (1).

Particularmente, un pulmón viejo disminuye progresivamente su función pulmonar y presenta un deterioro que puede continuar hasta la muerte. Algunos cambios fisiológicos en el pulmón asociados al envejecimiento, incluyen la pérdida de la elasticidad tanto en el alveolo como en las vías aéreas y una disminución de la fuerza de los músculos respiratorios debido a la dilatación del alveolo, el incremento en el tamaño de los espacios aéreos, la disminución del área de intercambio gaseoso, y la pérdida del soporte tisular de las vías aéreas inferiores (5) mediado en gran parte por la desregulación de la matriz extracelular (6) (Figura 2).

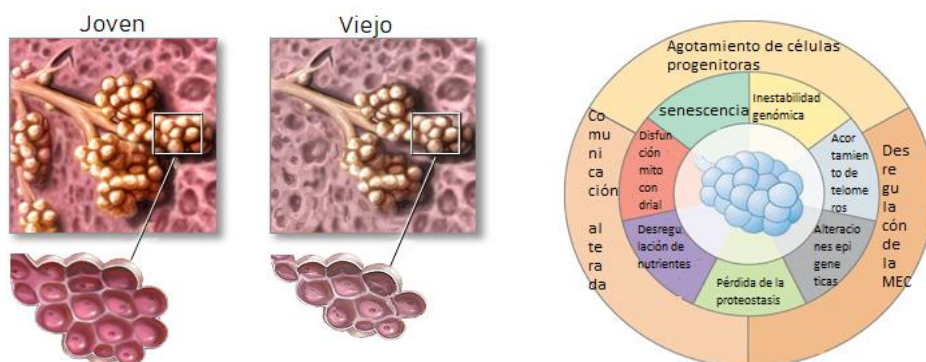


Figura 2. Esquema de cambios del pulmón en el envejecimiento. A) Esquema de un alveolo de una persona joven comparado con el de una persona de edad avanzada. B) Imagen de las características de un pulmón viejo (Meiners, 2015).

Del mismo modo, durante la vejez, en el pulmón aumenta la respuesta inflamatoria y la incidencia de enfermedades pulmonares tanto crónicas como agudas (2,7 y 8).

Fibrosis Pulmonar idiopática, una enfermedad asociada al envejecimiento.

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) es la forma más común y letal de las neumonías intersticiales idiopáticas y diversos estudios epidemiológicos indican que el envejecimiento está asociado con una mayor susceptibilidad al desarrollo de FPI (9,10) por lo que se le considera una enfermedad asociada al envejecimiento, que se presenta en personas mayores de alrededor de 55 años (11). El tiempo de vida de los pacientes es de 2-3 años posterior al diagnóstico y no existe un tratamiento efectivo para esta enfermedad, siendo el trasplante de pulmón una de las pocas opciones. La etiología de la FPI es desconocida, pero existen distintos factores de riesgo tanto genéticos, como ambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, se sabe que la prevalencia y la incidencia de esta patología incrementan significativamente con la edad (4 a 17 por cada 10,000 pacientes mayores de 75 años) (6), lo que caracteriza al envejecimiento como una fuerza motora para el desarrollo de la FPI.

Esta patología se caracteriza por la activación aberrante del epitelio alveolar y la subsecuente proliferación y migración de miofibroblastos seguida de un depósito excesivo de matriz extracelular, principalmente colágena tipo I, que se deposita en el intersticio alveolar, resultando en la pérdida de la arquitectura del parénquima pulmonar (12).

Recientemente, se ha propuesto que la FPI es el resultado de la convergencia de tres condiciones: la pérdida de la integridad alveolar, un envejecimiento acelerado y las modificaciones epigenéticas “profibrosantes” (13).

El papel del epitelio alveolar en la FPI.

Durante la FPI el pulmón sufre distintos cambios importantes en su estructura, tales como daño epitelial, hiperplasia de las células epiteliales alveolares tipo II, fibrosis densa y una proliferación aberrante de las células mesenquimales (14). En particular, el epitelio de los pacientes con FPI es disfuncional, y susceptible genéticamente a una respuesta aberrante al daño. Entre las características genéticas de las células epiteliales se encuentran mutaciones o variantes comunes que pueden desregular la síntesis de proteínas y la senescencia celular acompañada de la secreción de factores de crecimiento y citocinas, que desencadenarán la excesiva producción de matriz extracelular por las células mesenquimales, y la contribución a la población de fibroblastos mediante el proceso de transición epitelio-mesénquima. (15,16). En conjunto, estas anomalías disminuirán la capacidad de respuesta de las células epiteliales ante algún tipo de daño promoviendo un ambiente profibrosante (Figura 3).

Las células epiteliales alveolares se encuentran expuestas a micro daños a lo largo de la vida, estos micro daños van desde infecciones, la inhalación de agentes ambientales tóxicos o el humo del cigarro hasta reflujos gastro-esofágicos. En conjunto, esta serie de daños en el pulmón susceptible provoca una re-epitelización aberrante, característica de la FPI (12,17).

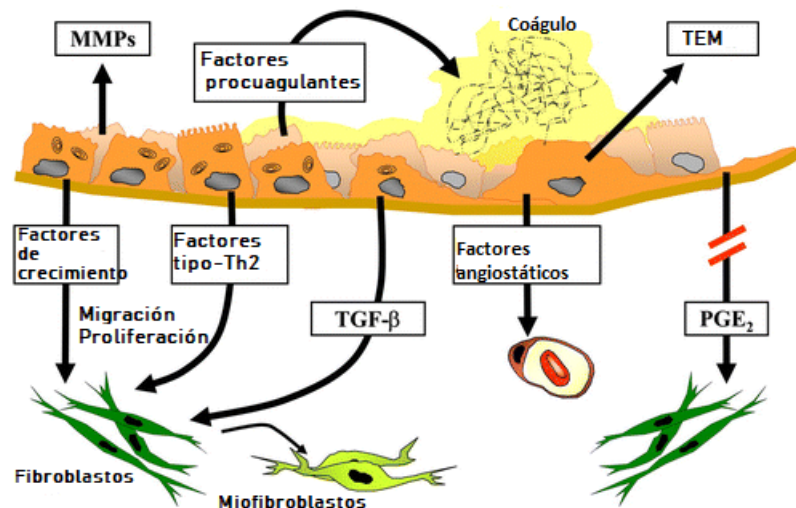


Figura 3. Papel del epitelio alveolar en la patogénesis de la Fibrosis Pulmonar Idiopática. Las células epiteliales secretan factores de crecimiento profibrosantes (TGF- β) que favorecen la proliferación y diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos e inhiben la producción de prostaglandinas. Además, contribuyen con la población de fibroblastos a través de la transición epitelio-mesénquima (TEM). Finalmente, las células epiteliales secretan metaloproteasas de matriz (MMPs) contribuyen con el ambiente fibrótico (Modificado de Selman y Pardo, 2006).

Características del envejecimiento

El envejecimiento puede definirse como un proceso fisiológico natural caracterizado por la disminución de la capacidad de homeostasis y de regulación de funciones apropiadas en respuesta a un daño (2,3). A nivel mundial, se estima que la proporción de la población que supera los 60 años está incrementando considerablemente (11% actualmente? a 22% para el 2050) (18).

Se han propuesto nueve características del envejecimiento que incluyen: Inestabilidad genómica, acortamiento de telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de la proteostasis, alteraciones en el censo de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de las células madre, comunicación celular alterada. (4).

Se sabe que, la acumulación de daños genéticos a lo largo de la vida es un factor determinante tanto en el envejecimiento como en el desarrollo de enfermedades. Por ejemplo, el desarrollo de síndromes asociados al envejecimiento prematuro derivados de un incremento en la acumulación de daño a DNA. Aunque, la integridad y estabilidad del DNA se altera continuamente tanto por estímulos externos como por factores internos, incluyendo los errores de replicación en el DNA y las especies reactivas de oxígeno (ROS), las lesiones genéticas se presentan por factores desencadenantes como las mutaciones puntuales, translocaciones, ganancia o pérdida de cromosomas y el acortamiento de telómeros.

Los telómeros son secuencias de DNA que se localizan en los extremos de los cromosomas, protegiéndolos del deterioro o de la fusión con cromosomas vecinos. Debido a que las polimerasas que replican el DNA no tienen la capacidad de replicar completamente las terminaciones de la cadena de DNA, existe una enzima especializada que cumple esta función, la telomerasa. Sin embargo, la mayoría de las células somáticas no expresan telomerasa derivando en una pérdida y un acortamiento progresivos de los telómeros. Los telómeros son particularmente susceptibles al deterioro asociado a la edad y, el mantenimiento de la longitud de los telómeros es tan importante que algunos de los efectos del envejecimiento pueden ser revertidos con la activación de la telomerasa (19).

Además de las alteraciones genéticas, las alteraciones epigénéticas afectan la homeostasis celular en el envejecimiento. Por ejemplo, durante el envejecimiento, los niveles de metilación global están aumentados (20). Tradicionalmente, los procesos epigenéticos se referían solo a las modificaciones de histonas y a la metilación a pesar de que los RNAs no codificantes pertenecen al epigenoma. Recientemente se ha puesto un gran interés en describir el papel de los miRNAs en la regulación de la expresión génica tanto en el envejecimiento como en múltiples enfermedades (21).

En general, se sabe que los patrones epigenéticos varían durante el envejecimiento normal y el patológico, sin embargo; en ambos los niveles de metilación del DNA están implicados en la regulación de la senescencia celular y de la longevidad (22).

En cuanto a la senescencia, el fenotipo de una célula senescente se caracteriza por la resistencia a la apoptosis, el arresto del ciclo celular y la secreción de moléculas asociadas a un fenotipo secretor (SASP) hacia el medio favoreciendo la expansión del fenotipo senescente entre células aledañas (23). Hasta el momento el fenotipo senescente se considera irreversible, ya que ningún estímulo fisiológico ha logrado sacar del arresto celular a las células senescentes. Sin embargo, la inactivación secuencial de genes supresores de tumores ha logrado reactivar la proliferación de estas células (24).

El fenotipo senescente puede ser inducido por diversas condiciones, por ejemplo, el acortamiento de telómeros y daño al DNA (senescencia replicativa), activación de oncogenes (senescencia inducida por oncogenes) o mediante estrés oxidante o radiación (senescencia prematura inducida por estrés) pero sin importar su origen se ha propuesto que las vías que se activan durante la senescencia convergen en la activación de los inhibidores del ciclo celular p21/Cdkn1a (25) y/o p16/Cdkn2a favoreciendo el desarrollo de múltiples enfermedades(26,27).

En lo que se refiere a la proteostásis, las células tienen mecanismos capaces de controlar la calidad que preservan la estabilidad y la funcionalidad de sus proteomas. Por una parte, existen proteínas, conocidas como proteínas de choque térmico, que estabilizan proteínas correctamente plegadas. Por otra parte, existen mecanismos de degradación de proteínas mal plegadas a través del proteosoma o del lisosoma. En conjunto, estos sistemas coordinados correctamente previenen la acumulación de componentes dañinos y aseguran la continua renovación de proteínas intracelulares. Sin embargo, durante el envejecimiento estos mecanismos se ven alterados, favoreciendo del desarrollo de severas enfermedades.

Otra característica del envejecimiento es la pérdida de la regulación de nutrientes. Distintas evidencias indican que, la restricción calórica o alteraciones en el consumo de nutrientes pueden alterar la esperanza de vida y la esperanza de salud tanto en roedores como en primates no humanos. Particularmente, la vía de mTOR, que regula aspectos esenciales del anabolismo, extiende la esperanza de vida de diversos organismos cuando es disminuida (28).

Durante el envejecimiento se reduce la mitocondriogénesis y se presentan alteraciones del DNA mitocondrial resultando en la alteración de la función mitocondrial. Por ejemplo, la disminución en la eficiencia de la cadena respiratoria derivando en la reducción de la producción de ATP. La disminución en la eficiencia bioenergética mitocondrial por el envejecimiento resulta en la convergencia de múltiples mecanismos, incluyendo la disminución de la biogénesis de las mitocondrias relacionada al acortamiento de telómeros. Esta convergencia, se da principalmente porque durante el envejecimiento se ven alteradas las vías de comunicación celular tanto a nivel endocrino como neuroendocrino y neuronal (29).

La inflamación asociada al envejecimiento es un ejemplo de alteraciones en la comunicación celular, y se deriva por diversos factores, incluyendo la acumulación de daño tisular proinflamatorio, como el secretado por las células senescentes, sugiriendo que la senescencia es un mecanismo compensatorio de respuesta al daño que es deletéreo y acelera el envejecimiento cuando los tejidos agotan su capacidad regenerativa, tal como la pérdida de las diferentes poblaciones de células progenitoras (4).

¿Cómo afecta el envejecimiento a los pulmones?

El pulmón es uno de los órganos internos expuestos al ambiente exterior. Estos estímulos ambientales externos que recibe afectan la estructura y función de los pulmones. En el humano, los pulmones alcanzan la madurez a los 20 y 25 años de edad. A partir de ese pico, comienza

un deterioro progresivo en las funciones de este órgano. Entre este deterioro se encuentra la pérdida significativa de la capacidad vital forzada (FVC) y el volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV1) y, la disminución del transporte gaseoso a través de las paredes alveolares resultando en alteraciones en la tensión arterial (30).

Entre los cambios en el sistema respiratorio asociados al envejecimiento se encuentra la disminución de la caja torácica, limitando el volumen de los pulmones y alterando los músculos respiratorios, así como la alteración de la estructura alveolar. Adicionalmente, el envejecimiento contribuye con la alteración de la función del sistema inmune. Específicamente, incrementan los niveles de interleucinas 1 y 6, y el factor de necrosis tumoral α contribuyendo a reducir la elasticidad y promoviendo la destrucción del parénquima (31).

En el humano, aunque alteraciones en la función mitocondrial son principalmente relacionadas con la pérdida de energía y apoptosis, existe evidencia que muestra alteraciones en la homeostasis en los pulmones sanos viejos. Entre otros aspectos, se han observado mitocondrias alargadas, así como una mayor área mitocondrial en las células alveolares tipo II durante el envejecimiento. Sumado, a la dificultad respiratoria que presentan roedores viejos y al incremento en la producción de ROS (32,33).

Adicionalmente, el flujo de autofagia se ha observado bloqueado durante el envejecimiento en el pulmón de ratones. Mientras que un mal funcionamiento de la actividad autofágica presente en fibroblastos de personas humanas sanas sugiriendo que este proceso es una implicación a una respuesta a estrés mal adaptada. (34,35)

En este contexto, un gran número de evidencias muestran que los mecanismos de protección del pulmón en contra del daño que incluyen la diferenciación de células progenitoras, alteraciones funcionales de la mitocondria, la inestabilidad genómica, las alteraciones

epigenéticas y la senescencia están alteradas con el envejecimiento en el pulmón (31,34,35,36,37).

El envejecimiento acelerado en la FPI.

Se sabe que están presentes casi todas las características del envejecimiento en la FPI (36). Incluyendo, la disminución de telómeros, el daño mitocondrial, la disminución de la autofagia como parte de la proteostasis. En lo que se refiere a la senescencia celular, que es un proceso fisiológico que recientemente se ha visto activo durante el desarrollo embrionario y placenta (37,38,), también ha sido asociado al desarrollo de la FPI (36).

En la FPI, las AEC2 son principalmente quienes presentan un fenotipo senescente que incluye la actividad de β - galactosidasa, y la sobreexpresión de los marcadores P21 y P16INK4 (39,40). Sumado a esto, existe una conexión entre el envejecimiento y la desregulación de vías activas durante el desarrollo embrionario y su alterada expresión en distintas patologías fibrosantes. Por ejemplo, la vía de WNT, es una vía de factores de crecimiento esenciales para el desarrollo embrionario, se ha visto que su expresión está alterada en el epitelio de pacientes con FPI favoreciendo la transición epitelio-mesénquima (41).

En conjunto, aspectos relacionados con el envejecimiento acelerado son un factor determinante en el desarrollo y progresión de la FPI.

Cambios epigenéticos en la FPI.

La FPI es el resultado de la activación aberrante de las células epiteliales quienes producen mediadores que favorecen la proliferación de fibroblastos residentes, el reclutamiento de fibrocitos resultando en la formación de focos de fibroblastos, seguidos de la acumulación

excesiva de matriz extracelular (12). Sin embargo, se ha ido incrementando la idea de que la FPI es un fenotipo heterogéneo afectado por un gran número de procesos moleculares involucrados, y que esta patología es el resultado de la compleja interacción entre factores genéticos como epigenéticos (42).

En la FPI, los mecanismos epigenéticos están asociados con el control de la expresión génica, especialmente se han observado asociaciones entre el humo del cigarro y cambios en los niveles de metilación o modificaciones de histonas, principalmente. Sin embargo, el control de la expresión génica puede además estar regulada por miRNAs, factores determinantes en la dirección de la patogénesis de esta enfermedad, que a diferencia de las modificaciones epigenéticas actúan a un nivel post-transcripcional (13).

miRNAs: biogénesis y función

Los miRNAs o microRNAs son RNAs pequeños de alrededor de 22 nucleótidos de largo y funcionan como reguladores primarios modulando la expresión génica, al unirse a la región no traducida (UTR) 3', a la región codificante o la UTR 5' del RNA mensajero blanco, promoviendo la inhibición de la traducción o la degradación del RNA mensajero (43). La mayoría de los miRNAs se transcriben a partir de secuencias de DNA, principalmente de zonas intragénicas, en el núcleo y son sometidos a una serie de procesamientos en el citoplasma para generar su forma madura. Recientemente, se ha visto que los miRNAs son transportados hacia diferentes compartimentos subcelulares para controlar los niveles de traducción y transcripción (44) o en casos particulares activar la expresión de genes (45).

Hasta 1993, no se conocía la función de los miRNAs y, fueron Ambros y Ruvkun quienes describieron por primera vez la regulación postranscripcional de Lin-14, mediada por el RNA pequeño no codificante, Lin-4. Hasta ese momento, Lin-4 era considerado una proteína, y había

sido fuertemente estudiado con el único objetivo de conocer los diferentes fenotipos asociados a una mutación génica en *Caenorhabditis elegans* (46,47,48).

La actividad de los miRNAs está principalmente mediada por la formación de un complejo nucleoproteico. Pero la secuencia de RNA puede tener un procesamiento a través de la vía canónica o no canónica.

Vía canónica

Es la vía principal de procesamiento e inicia con la transcripción de un pri-miRNA a partir del gen; posteriormente, el complejo microprocesador formado por la proteína de unión a RNA (DGCR8) y la ribonucleasa III mejor conocida como Drosha corta el pri-miRNA en la base generando el pre-miRNA (49). Una vez generado, el pre-miRNA es exportado hacia el citoplasma con la ayuda del complejo formado por exportina 5 y RanGTP y, después procesado por la endonucleasa III, Dicer. Dicer remueve el asa terminal, generando un miRNA maduro de 2 hebras. Por la direccionalidad de la cadena se determinará como se nombrará la hebra madura. Debido a que ambas cadenas provienen de una forma dúplex de miRNA maduro las dos hebras pueden ser cargadas en las proteínas Argonauta (50). Las proteínas Argonauta son una familia de proteínas que de forma dependiente de ATP junto con el miRNA forman el complejo de silenciamiento inducido por RNA conocido como RISC (51).

Finalmente, la estabilidad termodinámica en el lado terminal 5' del dúplex del miRNA determinará que hebra, 5p o 3p, formará parte del complejo RISC y cual será degradada (52,53)

Vías no canónicas

Recientemente, se han descrito distintas vías no canónicas que participan en la biogénesis de los miRNAs, y aunque utilizan mucha de las proteínas de la vía canónica como Drosha, Dicer,

exportina 5 y AGO 2, se diferencian porque pueden no necesitar DGCR8/Drosha o Dicer (54). Por ejemplo, miR320, un pre-miRNA con una cubierta de 7 metilguanosa (m7G), puede ser translocado hacia el citoplasma por exportina 1 pero sin necesidad del previo corte por Drosha, este procesamiento favorece que la hebra 3p sea la que se cargue a la proteína Argonauta (55). En el otro caso, en la vía independiente de Dicer los pre-miRNAs generados requieren que AGO2 termine su maduración en el citoplasma (56). Esto sugiere, que los miRNAs son moléculas reguladoras importantes que pueden ser procesados mediante distintas vías.

En condiciones fisiológicas, los miRNAs participan en distintos procesos celulares, incluyendo la proliferación, migración, y apoptosis. Pero también su aberrante activación está relacionada con el desarrollo de múltiples enfermedades.

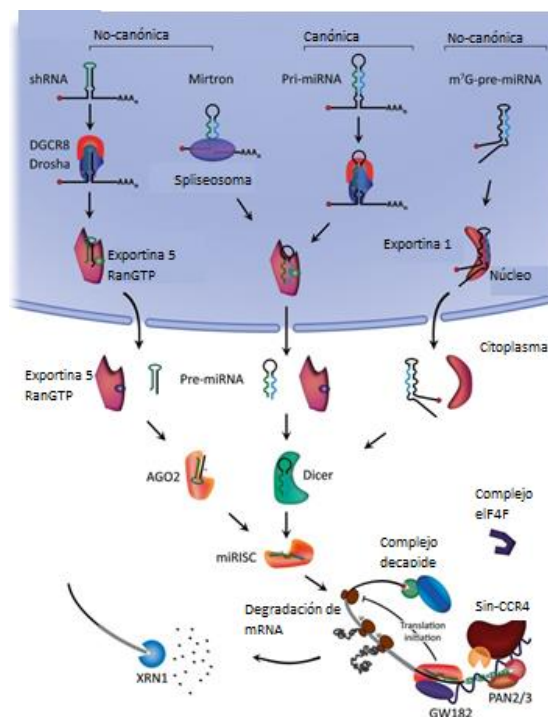


Figura 4. Vías que participan en la biogénesis de los microRNAs. De derecha a izquierda, las vías no canónica de biogénesis de miRNAs a partir de RNAs de hasa corta, a partir de corte y empalme (vía de mirtrones); la vía canónica dependiente del complejo microprocesador, exportina 5 y Dicer; y finalmente, la vía no canónica independiente de exportina 5. (Modificada de O'Brien, 2018)

El papel de los miRNAs en la fibrosis pulmonar

Recientemente, se han podido identificar firmas transcripcionales de expresión de miRNAs en diversas patologías, incluida la FPI. Dentro de esta firma transcripcional, los diferentes miRNAs regulan la expresión de mediadores pro-inflamatorios, la proliferación y diferenciación de fibroblastos, vías profibrosantes incluyendo la de TGF- β (sobreexpresión de Let7d y miR145a), la activación de vías del desarrollo (sobreexpresión de miR154) y la expresión de componentes de la matriz extracelular como la colágena tipo I (Disminución de miR29). En la figura 5, se enlista estos y otros miRNAs que participan en la regulación de distintos procesos que favorecen el desarrollo de FPI(57).

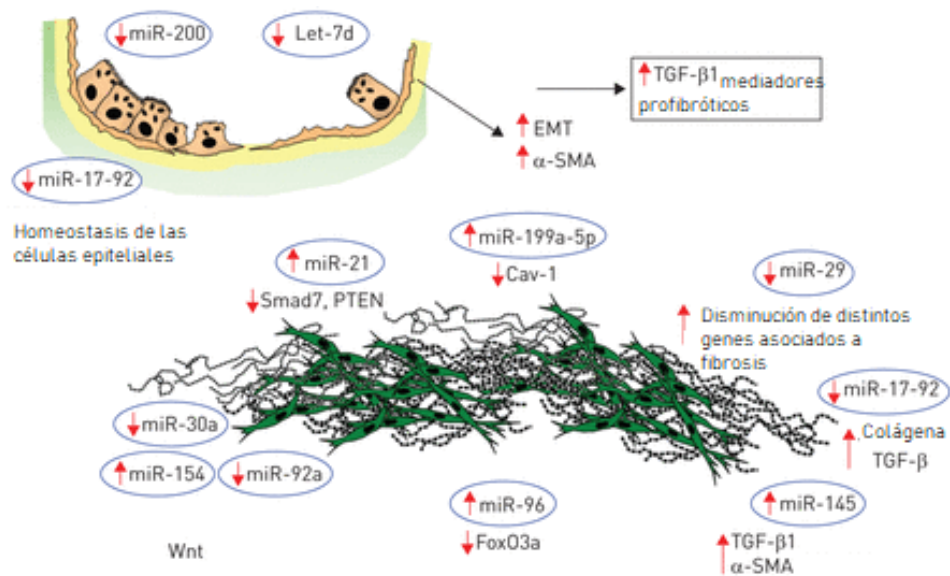


Figura 5. Participación de distintos microRNAs en la patogénesis de la FPI. (Modificada de Selman, 2016).

En particular, miR29b, un miembro de la familia de miR29, del cual existe evidencia que sugiere que por una parte regula la respuesta inmune *in vivo*, disminuyendo el número de células inflamatorias en los LBA's de ratones tratados con bleomicina y una forma sintética de miR29b

(58,59), además de disminuir la expresión de Col3a1 y fibronectina en el tejido pulmonar. Y por otra, controla la expresión de colágena tipo I en fibroblastos pulmonares tratados o no con TGF- β 1.

Consistente con lo anterior, otro de los miembros de la misma familia, el miembro miR29a se ha descrito como un miRNA con un papel antifibrótico al regular de forma negativa la fosforilación de PI3K-Akt mediada por TGF- β 1(60). Acorde con estos hallazgos, los tres miembros de la familia (miR29a, miR29b y miR29c) están disminuidos en el tejido de pulmonar de pacientes con FPI y de otros tipos de fibrosis (60, 61, 62).

Cui, *et. al.* 2016); demostró la actividad antifibrótica de miR27a, reduciendo la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en los ratones administrados con una forma sintética de miR27a. Sugiriendo que la actividad antifibrótica de miR27a se debía a la inhibición de la expresión de su blanco, α -aml, evitando la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, la principal fuente celular de producción de colágena tipo I.

En conjunto esta evidencia sugiere un papel clave de los miRNAs en la progresión y desarrollo de la FPI, así mismo también dejan una ventana abierta de posibles blancos terapéuticos para tratar esta enfermedad.

Basado en lo anterior existe un gran y creciente interés en considerar al envejecimiento una variable importante en el estudio de la fibrosis pulmonar en modelos animales. Debido a que los pocos estudios publicados utilizando ratones viejos apoyan la importancia del envejecimiento en el desarrollo de la fibrosis pulmonar; por ejemplo, han revelado que el envejecimiento incrementa la susceptibilidad del pulmón al desarrollo de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina o secundaria a la infección de Herpes virus (63,64). Y aunque la respuesta fibrótica es similar entre ratones jóvenes y viejos, los ratones viejos presentan una alteración en la capacidad de

resolución del daño fibrótico (65). Sin embargo, hasta el momento son escasos los trabajos publicados utilizando animales viejos, ya que la mayoría de las investigaciones relacionadas con la patogénesis de la FPI se han llevado a cabo utilizando ratones entre 6 y 8 semanas de edad (66). Principalmente por las dificultades prácticas asociadas con la obtención de los ratones, incluyendo los costos y tiempos de espera.

Un ratón se considera senescente a partir de los 18 meses de edad, por ello recientemente se ha propuesto la utilización de ratones con envejecimiento acelerado como modelos de estudio en el envejecimiento y distintas patologías (67, 68, 69).

Esto ha llevado recientemente a utilizar modelos experimentales de envejecimiento acelerado para estudiar el efecto del envejecimiento en el desarrollo de la fibrosis pulmonar. Por ejemplo, se ha evaluado el desarrollo de fibrosis en ratones con senescencia prematura (SAM) así como en ratones modificados genéticamente deficientes de la telomerasa (70).

Ratones con envejecimiento acelerado.

En la actualidad, existen, además de los ratones con senescencia prematura (SAM), un gran número de cepas con modificaciones genéticas en las que está alterada la esperanza de vida. Particularmente, aquellos con esperanza de vida corta o reducida se enlistan en la tabla siguiente:

Vía	Gen blanco o modelo murino	Características	Referencia

Maduración de la lámina A	Zmpste24-/-	Crecimiento retrasado, lipodistrofia y distrofia muscular, cardiomiopatías y esperanza de vida de 20 semanas.	Bergo et al. (2002), Pendas et al. (2002)
	LmnaH222p/H222p	Los machos mueren entre los 4 y 9 meses de vida, mientras que las hembras entre los 7 y 13 meses.	Arimura et al. (2005)
	LmnaG609G/G609G	Reducción en la tasa de crecimiento, pérdida progresiva de peso, además presenta una tasa de crecimiento reducida, infertilidad, deformaciones óseas, anomalías cardiovasculares y metabólicas, curvatura de la columna vertebral, y una vida media de 100 días	Osorio et al. (2011)
	LmnaL530P/L530P	Fenotipo parecido al de los pacientes con progeria, presentan crecimiento retrasado a partir de los 4-6 días y mueren entre las 4-5 semanas de vida.	Mounkes (2003)
	Lmna-/-	A partir de la segunda o tercera semana de edad había una reducción en la tasa de crecimiento, también presentaban cifosis, una marcha rígida, atrofia del timo, reducción de la grasa subcutánea, distrofia muscular, así como miopatías cardíacas y esqueléticas, con una vida media de 8 semanas	Sullivan et al. (1999)

GH-IGF-1	bGH-Tg	Tienen sobreexpresada la hormona de crecimiento heteróloga (GH), presenta patología renal (glomeruloesclerosis y glomerulonefritis), astrogliosis, una vida reproductiva acortada, cambios en la función cognitiva relacionados con la edad	Bartke (2003)
	hg/hg	Ganancia del 30-50% de su peso, sin incrementar el tejido adiposo. Incremento de IGF-1 en plasma, y tiempo de vida corto	Casellas y Medrano (2008)
	XpdR722W/R722W	Presentan osteoporosis y osteoclerosis, infertilidad y esperanza de vida reducida.	de Boer et al. (2002)
	ku86-/-	Osteopenia prematura, piel y foliculos atróficos; y degeneración hepatocelular	Vogel (1999)
	Erc1-/-	Presentan un desarrollo retardado y dejan de crecer a la segunda semana, generalmente mueren a la cuarta semana de edad. También muestran anomalías en la piel, el hígado y la médula ósea, ataxia, insuficiencia renal, cifosis y senescencia celular	Niedernhofer et al. (2006)
Replacación del ADN	topβ-/-	Sin fenotipo aparente hasta la madurez, su esperanza de vida es de 15 meses	Kwan and Wang (2001)
	PolgAmut/PolgAmut	Pérdida de peso y de grasa subcutánea, alopecia, anemia y esperanza de vida corta.	Trifunovic et al. (2004)

	Terc-/- Atm-/-	Sucumben por linfoma en el timo, con una media latente de 48 semanas.	Wong et al. (2003)
Estrés oxidante	Prdx1-/-	Desde los 9 meses comienza a sufrir de anemia hemolítica severa, y son subseptibles al desarrollo diversos tipos de cancer, tienen una esperanza de vida corta.	Neumann et al. (2003)
	Sod1-/-	No presentan anormalidades durante el desarrollo ni en la adultez, pero tienen una mayor incidencia de cambios neoplásicos en hígado y un tiempo de vida corto	Elchuri et al. (2005)
	Sod2-/-	Los homocigos nulos mueren durante los primeros 10 días de vida con cardiomiopatía dilatada, acidosis metabólica y acumulación de grasa en hígado, esqueleto y musculo.	Li et al. (1995)
	MsrA-/-	vulnerables al estrés oxidativo, presentan una esperanza de vida reducida y un comportamiento atípico al caminar	Moskovitz et al. (2001)
	p62-/-	No presenta anormalidades hasta la semana 7 de edad, tiene pérdida de grasa subcutánea y su esperanza media de vida es de 68 semanas.	Kwon et al. (2012)
Sirtuinas	SIRT1-/-	Esperanza de vida reducida bajo condiciones normales o bajo restricción calórica.	Li (2008), Boily (2008) y Mercken (2014)

	Sirt6-/-	fenotipo degenerativo similar al envejecimiento agudo, en las primeras semanas se observan con un tamaño corporal reducido y mueren a las 4 semanas, y desarrollan anomalías como pérdida de grasa subcutánea, cifolordosis, linfopenia, osteopenia y otros defectos metabólicos graves	Mostoslavsky et al. (2006)
Hormona	kl/kl	Arteriosclerosis, atrofia en piel, y osteoporosis, mueren prematuramente entre las 8 -9 semanas de edad	Kuro-o et al. (1997)
Inflamación	p53+/m	fenotipo asociado con el envejecimiento, como una esperanza de vida corta, osteoporosis, atrofia generalizada de órganos y una tolerancia al estrés disminuida	Tyner et al. (2002)
	mTR-/-	presentan telómeros cortos, fenotípicamente muestran canas en el pelaje, alopecia, hiperqueratosis, y una esperanza de vida de 18 meses	Rudolph et al. (1999)
	AIMP3 Tg	Presentan características tipo progeria como pérdida de peso, alopecia, piel arrugada con reducción del tejido adiposo y curvatura de la columna.	Oh (2010)
	SnoNm/m	Sensibles a estrés ambiental, dificultad para quedar embarazadas en las hembras, y	Pan (2012)

		dificultad para cerrar heridas. Un 20 % de la población muere al año de vida.	
--	--	---	--

Tabla (1). Ratones con tiempo de vida corto. (Modificada de Liao & Kennedy, 2014).

Recientemente, se propuso el uso del ratón deficiente de *Zmpste24*, enzima que participa en el procesamiento de maduración de la lámina A, que tiene un envejecimiento prematuro como modelo de estudio del envejecimiento. Este ratón, al igual que los antes mencionados en la tabla 1 tiene un tiempo de vida más corto y comparte características presentes en el envejecimiento natural. Particularmente, el ratón deficiente de *Zmpste24* tiene una vida media de 20 semanas, y desde la doceava semana de edad presenta características asociadas al envejecimiento que incluyen, la activación del sistema del sistema inmune conocido como “inflamaging”, alteraciones en la tasa de transcripción de genes ribosomales, pérdida de pelo y bigotes, y alteraciones óseas como la displasia y la escoliosis, todas características descritas en el envejecimiento fisiológico en ratones silvestres (71,72).

A diferencia de otros ratones con envejecimiento acelerado, la vida media de 20 semanas del ratón *Zmpste24* *-/-* te permite hacer experimentos crónicos como el del modelo de fibrosis inducido por bleomicina, que requiere al menos 21 días de espera posterior a la administración del fármaco para ver un daño fibrótico, el cual no sería posible realizar cuya esperanza de vida sea más corta como la de los ratones *Sod2* *-/-* que viven solamente 10 días (73).

Finalmente, se ha observado la acumulación de prelamina/progerina, forma inmadura de la lámina A que no fue procesada por *Zmpste24*, en tejidos humanos y de ratón durante el envejecimiento (74,75); sugiriendo que existe un mecanismo en común entre el envejecimiento fisiológico y el envejecimiento acelerado. Convirtiendo al ratón deficiente de *Zmpste24* en un

buen prospecto como modelo de estudio del envejecimiento y enfermedades asociadas al envejecimiento.

El envejecimiento acelerado en el ratón deficiente de *Zmpste24*.

Lámina A: Procesamiento y maduración.

Cómo se mencionó anteriormente, *Zmpste24* es una enzima que participa en el proceso de maduración de una de las láminas nucleares, la lámina A. Brevemente, las láminas son proteínas tipo filamento V que se expresan exclusivamente en el núcleo (76). Las láminas pueden interactuar entre sí formando un andamio que rodea la membrana nuclear interna llamada Lamina, la cual principalmente mantiene la forma y estructura del núcleo, así como su rigidez. Debido a la estrecha interacción que tienen las láminas con la cromatina, son reguladores clave en la expresión de genes y en las modificaciones de la cromatina (77). En los mamíferos, las láminas se pueden dividir en tipo A y B. Las láminas tipo A contienen dos miembros principalmente, la isoforma A y la isoforma C generadas a partir de un mismo gen (*LMNA*) mediante splicing alternativo; mientras que las isoformas B1 y B2 de las láminas tipo B se transcriben de los genes *LMNB1* y *LMNB2*, respectivamente (78,79). En general, todas las células nucleadas contienen una isoforma B, mientras las de tipo A se expresan en células somáticas diferenciadas, principalmente las que tienen un origen mesenquimal (80, 81, 82).

Durante la traducción, la lámina A como las demás proteínas CaaX pasa bajo una serie de modificaciones en el carboxilo terminal donde se encuentra la secuencia conservada (CaaX) (83,84).

Primero, se requiere una modificación postranscripcional que inicia con la farnesilación de la cisteína catalizada por una franesiltransferasa, esta modificación dirigirá la unión de forma correcta de la lámina A con la envoltura nuclear interna (85,86). Posteriormente, Rec1 o

Zmpste24 cortarán la secuencia conservada aaX, exponiendo la cisteína farnesilada para su metilación mediada por una isoprenilcisteinmetiltransferasa. Finalmente, Zmpste24 corta parte del carboxilo terminal de la prelamina A (RSY-LLD) generando dos segmentos, un péptido de 15 aminoácidos que incluye la secuencia farnesilada y la cisteína metilada el cual será degradado y el otro que corresponde a la forma madura de la lámina A (86,71) (Figura 6).

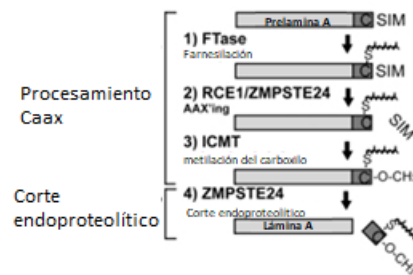


Figura 6. Serie de modificaciones postraduccionales que sufre la Lámina A para su maduración. (Barrowman, 2012).

Aunque la expresión de la lámina es amplia, en algunos tipos celulares como las neuronas del sistema nervioso central, la expresión de la lámina A esta apagada por la acción de miR9 (87). Además, el hecho de que las células madre y algunos linajes derivados de células hematopoyéticas tienen niveles bajos o nulos de lámina A sugiere que el papel de esta proteína no es esencial en este proceso, particularmente. En conjunto, esta evidencia sugiere que la lámina A tiene expresión amplia y participa en la regulación de diferentes procesos biológicos pero en los procesos patológicos tampoco está excluida.

Hasta la fecha, se han descrito alrededor de 400 mutaciones que afectan directamente al gen LMNA, lo que se ha identificado como la causa de enfermedades conocidas como laminopatías, las cuales tienen una serie de alteraciones específicas en cada tejido. Dentro de las laminopatías se encuentran desordenes que afectan principalmente a los tejidos de origen mesenquimal, incluyendo el tejido adiposo, sistema nervioso periférico, la piel, músculo y hueso, y causan un

fenotipo de envejecimiento acelerado, estos desordenes son mejor conocidos como síndromes de progeria. Particularmente, el síndrome de progeria Hutchinson-Gilford, que recibe su nombre de quienes fueron los primeros en describirlo, se presenta principalmente por una mutación en el exón 11 de la lámina A, lo cual activa un splicing en sitios crípticos resultando en la formación de un RNAm mutante que se traduce en una lámina A que carece de 50 aminoácidos, conocida como progerina. La deleción de esta región incluye el sitio donde la endoproteasa ZMPSTE24 realizaría el segundo corte, dejando una proteína farnesilada (83,84).

La acumulación en el núcleo de la progerina o de la prelamina A farnesilada es altamente tóxica para la célula, causando daño a DNA, alteraciones en la organización de la cromatina y, arresto del ciclo celular (85,86,87,88,89). Además del papel de la progerina en el envejecimiento prematuro (90,91,92); recientemente, fibroblastos derivados de donadores de edad avanzada o derivados de líneas celulares en senescencia replicativa muestran una alta acumulación de progerina (74). Sugiriendo, que podría existir un proceso que ligue al envejecimiento prematuro con el envejecimiento natural, sin embargo, hasta el momento el mecanismo es desconocido.

Resumiendo, el procesamiento post-transcripcional de la lámina A incluye la prenilación, el corte del tripéptido del carboxilo terminal seguida de la metilación del residuo de cisteína prenilado, y finalmente, la remoción proteolítica por la metaloproteasa Zmpste24 del péptido del carboxilo terminal previamente prenilado (71).

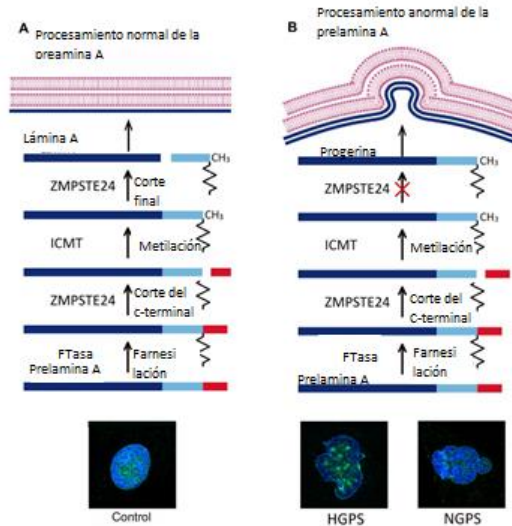


Figura 7. Esquema de la formación de la lámina A en condiciones normales y de la prelamina A en ausencia de Zmpste24. De izquierda a derecha, esquema del arreglo normal de la envoltura nuclear cuando se genera la forma madura de la lámina A, y alteraciones de la estructura nuclear en ausencia de la forma madura de la lámina A por mutaciones en el gen, así como por la ausencia de Zmpste24 (Modificado de Carrero,2016).

En el laboratorio del Dr López-Otín en Oviedo, España, se generó el ratón deficiente de *Zmpste24*. Para poder apagar la expresión del gen, se eliminaron los exones 2 y 3, insertando un cassette de neomicina como se muestra en la figura 4.

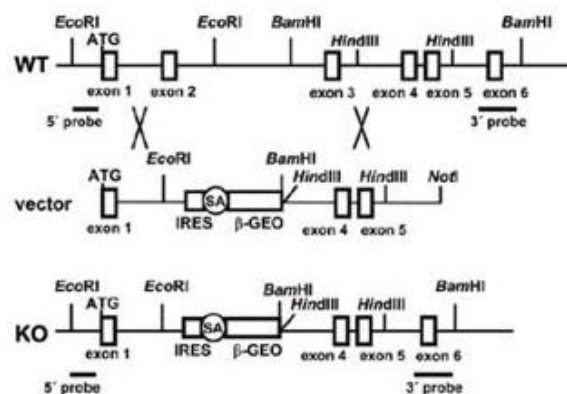


Figura 8. Construcción utilizada para la generación del ratón deficiente de Zmpste24. Esquema que muestra la construcción que se insertó para sustituir los exones 2 y 3 de *Zmpste24*. (Péndas, 2010)

Como se mencionó, *Zmpste24* es una enzima que forma parte de la maquinaria involucrada en el proceso de maduración de la lámina A, tiene una estructura secundaria formada por siete barriles α -helicoidales transmembranales (TMH) TMH1, TMH2, TMH3, TMH4, TMH5, TMH6 y TMH7, están empaquetadas en un haz α -helicoidal antiparalelo, con el dominio de peptidasa de zinc entre TMH5 y TMH6 del lado nucleoplasmático. En el lumen del retículo endoplásmico se encuentran tres α -hélices de lumen (LH) LH1, LH2 y TMH7A. El pliegue central de proteasa abarca dos regiones, el primer segmento consta de una hoja β de cuatro cadenas interrumpida por una α -hélice MH1 (hélice 1 metaloproteasa), la hoja β es seguida por una α -hélice corta y la hélice HEXXH (MH3) que contiene las histidinas que coordinan al zinc y al glutamato involucrado en la catálisis. El segundo segmento contiene la TMH7 con los residuos de coordinación de zinc, MH4-MH6, una histidina conservada implicada en la catálisis y una arginina conservada (87).

Esta enzima se expresa ampliamente en distintos tejidos de mamíferos. Particularmente, en el ratón se expresa altamente desde la etapa embrionaria principalmente en corazón, en riñones y en la cuerda neural. El fenotipo del ratón KO además de un tiempo de vida corto (vida media de 20 semanas) incluye cardiomiopatías, distrofia muscular y lipodistrofia. Probablemente secundario a las anomalías en la estructura del núcleo por la falta de una forma madura de la lámina A. Durante las primeras cuatro semanas de edad, los ratones homocigotos nulos no se distinguen de los silvestres, pero a partir del segundo mes y de forma progresiva comienzan con pérdida de peso y reducción del tamaño, resultando en una postura característica del envejecimiento, conocida como escoliosis (71).

Distinta evidencia sugiere que la falta de lámina A promueve la activación de vías de señalización de respuesta a estrés (93) y metabólicas (94), un fenotipo senescente a nivel celular y un envejecimiento acelerado a nivel del organismo (95). Y a diferencia de lo que ocurre en el envejecimiento natural en un ratón silvestre que disminuyen los niveles de autofagia, en el ratón deficiente de *Zmpste24* aumenta la autofagia. Posiblemente como un mecanismo de supervivencia activado en respuesta a estrés.

Actualmente, los modelos animales juegan un papel importante en la investigación de los mecanismos que participan en distintas enfermedades, y particularmente, se han establecido un gran número de modelos para estudiar la patobiología pulmonar. Entre otras limitantes, la etiología desconocida de la FPI ha sido un factor limitante en el uso de modelos animales. Distintos modelos de fibrosis pulmonar han sido desarrollados con el paso del tiempo. La mayoría de los cuáles mimetizan algunas, pero no todas las características de la FPI humana, especialmente las condiciones naturales de la progresión e irreversibilidad del daño. Entre los métodos más comunes se encuentra el daño por radiación, infecciones por herpes virus y la instilación de bleomicina, sílice o asbestos. Aunque, el agente más común de inducción de fibrosis pulmonar experimental en animales es la bleomicina (96).

Modelo de fibrosis pulmonar inducido por Bleomicina

Bleomicina

La Bleomicina pertenece a un grupo de antibióticos producidos por la bacteria *Streptomyces verticillus*, y fue aislada por primera vez en los sesentas (97). Además de su actividad como antibiótico, la bleomicina ha sido utilizada en el tratamiento de distintos linfomas y carcinomas

debido a su potente actividad anti-tumorogénica; sin embargo, su uso ha sido vigilado estrictamente debido a que tiene como efecto adverso producir toxicidad pulmonar (98).

Se sabe que, tras su administración la bleomicina puede distribuirse en distintos tejidos, pero la mayor concentración de este compuesto se encuentra en la piel y en los pulmones. Este antibiótico puede permanecer hasta dos semanas en el pulmón, en niveles más altos que en hígado o riñones, tras una sola dosis administrada vía intravenosa (99).

Sin importar la vía de administración de la bleomicina, ésta se acumula en una mayor concentración en el pulmón; sin embargo, el porcentaje que se almacena con respecto a la dosis inicial administrada varía dependiendo de su forma de administración. Siendo la administración intratraqueal la forma con el mayor porcentaje recuperado (95%) comparada con otras vías como la subcutánea con la cual se recupera menos del 1% de la dosis inicial (100).

Por otra parte, la hidrolasa de bleomicina, enzima inactivadora de la bleomicina, influye determinantemente en los efectos que tiene este compuesto en los diferentes tejidos. Se especula que debido a que los pulmones tienen bajos niveles de esta enzima son más susceptibles al daño tisular inducido por la bleomicina (101). La bleomicina tiene la capacidad de romper al DNA en un proceso dependiente de la presencia de oxígeno y de un metal iónico incluidos el cobre, manganeso, vanadio, hierro y cobalto. El complejo formado por la bleomicina con el hierro es el más descrito. Una gran evidencia muestra que la bleomicina se une de forma simultánea al DNA y a Fe (II) y, que en presencia de oxígeno molecular se inicia la liberación de radicales hidroxilos libres seguida de daño al DNA y la oxidación del Fe (II) (102).

Las especies reactivas de oxígeno pueden producir directamente la cito-toxicidad mediada por la participación de reacciones tipo REDOX y, además, producir la subsecuente oxidación de ácidos grasos, que causan la inestabilidad de la membrana.

La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno desencadena una respuesta inflamatoria ocasionando cito-toxicidad pulmonar, la activación de fibroblastos y el subsecuente desarrollo de fibrosis (103).

El daño pulmonar se desarrolla en las primeras 48 horas después de su administración intratraqueal. Este daño se caracteriza de manera histológica por edema perivascular y adelgazamiento de la pared alveolar. Además, se presenta un infiltrado de células inflamatorias en las paredes y espacios alveolares, junto con una hemorragia intra-alveolar. Interesantemente, a pesar de la severidad del daño pulmonar, este proceso se da en forma de mosaico, con áreas normales entre zonas severamente dañadas. El daño y la activación de las células epiteliales alveolares resulta en la liberación de citocinas y factores de crecimiento, particularmente TGF- β , que estimulan la proliferación de miofibroblastos y la secreción de una excesiva matriz extracelular resultando en fibrosis (104, 105).

Durante la primera etapa de daño, se presenta una elevación en los niveles de citocinas proinflamatorias incluidas las interleucinas -1 y -6, y el factor de necrosis tumoral, seguida de un aumento en la expresión de marcadores profibróticos como fibronectina, procología I y el factor de crecimiento transformante beta 1, desde el día 14. El “switch” entre el proceso inflamatorio y fibrótico puede irse observando posterior al día 9 de la administración de la bleomicina, pero la fibrosis puede observarse desde el día 21 (105).

Antecedentes

Existen evidencias de que la FPI es una enfermedad asociada al envejecimiento. Sin embargo, los procesos que ocurren en el envejecimiento y que contribuyen al desarrollo de la fibrosis pulmonar no han sido definidos. Por otra parte, existen diversos estudios que sustentan el uso de modelos de ratones con envejecimiento acelerado en el estudio de diversas enfermedades.

En este contexto, en este trabajo se propuso utilizar al ratón deficiente de *Zmpste24* con envejecimiento acelerado para entender posibles mecanismos del envejecimiento que participen en el desarrollo de fibrosis pulmonar.

Objetivo General

identificar los cambios morfológicos y de la expresión génica en el pulmón de ratones con envejecimiento acelerado (*Zmpste24* ^{-/-}) y silvestre, y evaluar la respuesta al daño fibrosante inducido por bleomicina en ambos genotipos en animales jóvenes y viejos.

Objetivos específicos

- Observar los cambios en la expresión de genes en pulmones de ratones viejos deficientes de *Zmpste24* y silvestres.
- Determinar vías funcionales alteradas en el envejecimiento prematuro y normal en el ratón deficiente de *Zmpste24* y silvestre, respectivamente.
- Evaluar la respuesta fibrótica en ratones jóvenes *Zmpste24* ^{-/-} y *Zmpste24* ^{+/+} 21 días después de la administración de bleomicina.
- Evaluar la respuesta fibrótica en ratones viejos *Zmpste24* ^{-/-} y *Zmpste24* ^{+/+} (13 y 79 semanas de edad, respectivamente) 21 días después de la administración de bleomicina.

Metodología.

Población de estudio.

Se utilizaron ratones silvestres C57BL/6 (WT) y ratones deficientes de *Zmpste24* (KO) a las siguientes edades:

Zmpste24	Jóvenes	Viejos
+/+	4 semanas de edad	79 semanas de edad
-/-	4 semanas de edad	13 semanas de edad

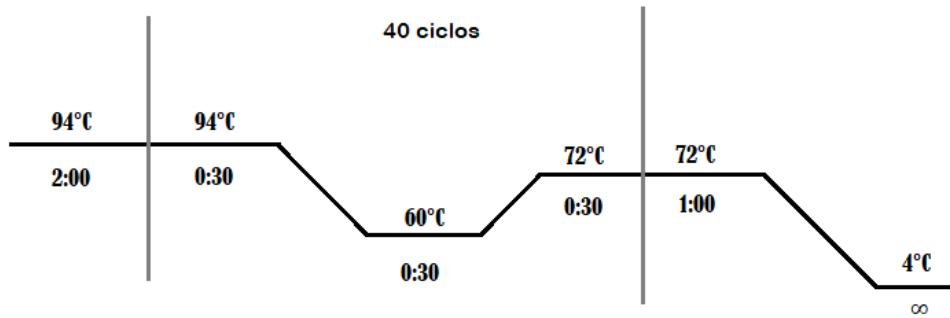
Para determinar el genotipo de los ratones, se extrajo DNA de las colas:

1. Colas de 0.5mm se incubaron en buffer Hotshot a 99°C durante 1 hora.
2. Se agregaron 75 µl de buffer neutralizante, y se guardó el DNA a -20°C para su posterior utilización, como se describió previamente (106).

Para la PCR, se tomó 1 µl en una reacción final de 10 µl de la siguiente mezcla:

Reactivos	1x
Buffer para PCR 10x	1 µl
dNTP's 100mM	1 µl
MgCl₂ 50mM	0.3 µl
F1-01	0.25 µl
F1/F02-02	0.25 µl
F1/03	0.5 µl
Taq polimerasa	0.1 µl
Agua DEPC	5.6 µl

Bajo las siguientes condiciones:



Modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

Para inducir fibrosis pulmonar en los ratones se administró 0.1U de Bleomicina en solución salina (BLEOLEM, Lemery) por vía orofaríngea. Los ratones se sacrificaron 7 ó 21 días después del daño. El pulmón derecho se fijó en formol 10% (Sigma, St Louis, MO) y se utilizó para el análisis histológico. El pulmón izquierdo se congeló en nitrógeno líquido para ser utilizado posteriormente en diversos experimentos.

Cuantificación de hidroxiprolina.

Para cuantificar la síntesis de colágena en los pulmones de los ratones silvestres y deficientes de *Zmpste24* en condiciones basales o posterior al daño con bleomicina.

1. El pulmón izquierdo se secó a 110°C por 48 horas, aproximadamente.
2. Se hidrolizó en HCl 6N (JT Baker, Xolostoc, Mex) durante 24 horas.
3. El hidrolizado se resuspendió en 500 µl de agua
4. Se tomaron 10 µl del hidrolizado y se diluyeron 1:1 con buffer de citratos 0.01M (Sigma, St Louis, MO) pH6.5

5. Se tomaron 10 μ l de la dilución y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente con 100 μ l de Cloramina T 0.56 M (Sigma, St Louis, MO) en una microplaca
6. Se agregaron 100 μ l del Reactivo de Ehrlich 1M y se incubó a 65°C durante 20 minutos.
7. Se leyó a 550nm

Los datos se normalizaron con una curva de Hidroxiprolina, y se expresaron como: μ g de hidroxiprolina/mg de pulmón izquierdo seco (107).

Análisis morfométrico.

El pulmón derecho se fijó en paraformaldehído 4% inflando a una presión constante de 25 cm de mercurio, y se embebieron en parafina. Se cortaron secciones de pulmones y se tiñeron con Hematoxilina & Eosina o con Tricrómica de Masson para poder determinar la severidad del daño y su extensión.

La severidad de la fibrosis se determinó utilizando un método semicuantitativo (108).

Extracción de RNA total.

Para poder obtener el RNA total a partir del tejido pulmonar 100 mg de pulmón izquierdo se homogeneizó en 1000 μ l de Trizol (Life Technologies, Grand Island, New York, NY) con ayuda de un politrón a velocidad media.

1. El homogeneizado se incubó 10 minutos con 200 μ l Cloroformo (Sigma, St Louis, MO), y se centrifugó a 12,000g durante 15 minutos a 4°C.

2. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el RNA con 500 µl de Isopropanol (Sigma, St Louis, MO), se agitó suavemente y se centrifugó a 12,000g durante 10 minutos a 4°C.
3. Se decantó el sobrenadante y el pellet se lavó en 1000 µl de Etanol (Sigma, St Louis, MO) 75% en agua DEPC.
4. Se centrifugó a 7,500 g durante 5 minutos a 4 °C.
5. Se decantó el sobrenadante y el pellet de RNA se dejó secar durante 15 minutos.
6. El pellet se resuspendió en 50 µl de agua DEPC o libre de RNAsas a 55°C durante 5 minutos.

La pureza y la eficiencia de la extracción se verificó usando un espectrofotómetro (NanoDrop; Wilmington, DE) y un bioanalizador (Agilent; Palo Alto, CA).

PCR cuantitativo.

El equivalente a 1 µg de RNA se sintetizó en cDNA con la ayuda de RT² First strand Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El RNA obtenido se trató con DNasa I para la eliminación del DNA genómico. Este procedimiento consiste en eliminar DNA de doble cadena que pudiera estar presente en la muestra de RNA y enmascaré la expresión de los genes blanco. Para este proceso se preparó la siguiente mezcla:

Componentes	Volumen
RNA	Variable (25ng-5 µg)
Buffer GE	2 µl
Agua libre de RNAsas	Variable
Volumen Total	10 µl

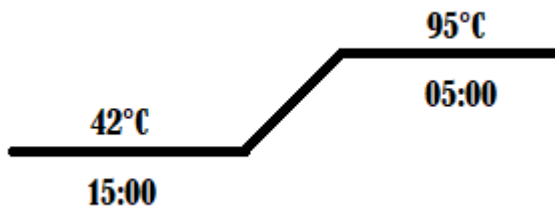
La mezcla se incubó a 42°C durante 5 minutos y se pasa inmediatamente a hielo.

Cuantificación de PCR en tiempo real.

Para la síntesis de cDNA se preparó la mezcla de transcripción reversa de acuerdo a la siguiente tabla:

Componentes	Volumen (1x)
5x buffer BC3	4 µl
Control P2	1 µl
RE3 reverse transcriptase mix	2 µl
Agua libre de RNAsas	3 µl
Volumen Total	10 µl

Se agregaron 10 µl de la mezcla de transcripción reversa en un tubo con 10 µl de la mezcla de eliminación de DNA genómico. Se mezcló gentilmente pipeteando de arriba abajo y se incubó con el siguiente protocolo:

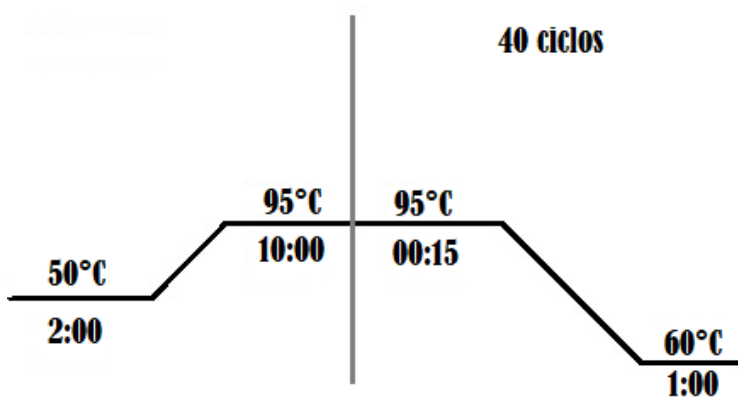


Se agregaron 91 µl de agua libre de RNAsas a cada reacción y se mezcló por pipeteo.

La reacción se pasó a hielo y se procedió con el protocolo de PCR para tiempo real:

Componentes	Volumen 1x
Master mix 2x	5 μ l
Sonda Taqman	0.5 μ l
Agua libre de RNAsas	3.5 μ l
cDNA	1 μ l

Y se incubó en las siguientes condiciones en un termociclador BIORAD CFX-96 (Bio-Rad):



Se utilizaron las siguientes sondas Taqman (Applied Biosystems):

Sonda	Clave
Col1a1	Mm00801666_g1
Col3a1	Mm00802300_m1
Mmp8	Mm00439509_m1
Mmp12	Mm00500554_m1

Mmp13	Mm00439491_m1
Mmp19	Mm00491296_m1
Ppar_γ	Mm00440940_m1
Spp1	Mm00436767_m1
Eln	Mm00514670_m1
Tgfβ1	Mm01178820_m1
Tgfβi	Mm01337605_m1
Timp1	Mm00441818_m1

Los resultados fueron normalizados con la expresión del endógeno 18S rRNA.

Análisis global de genes

Se purificó cRNA biotiniliado y se hibridó con un GeneChip™ Mouse Gene 2.0 ST Assay (Affymetrix®) para medir la expresión del transcriptoma completo. Se utilizaron tres muestras biológicas para cada grupo y, los resultados se analizaron en R software (<http://www.r-project.org/>) y Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>). Para poder identificar las diferencias estadísticas en la expresión génica para cada condición, todos los datos se analizaron por el modelo lineal de Limma basado en el método empírico de Bayes. Los datos considerados estadísticamente significativos (adjusted p-value < 0.05) y con un logfold change mayor a 0.5 para miRNAs o mayor a 1.0 para el resto del transcriptoma se representaron en gráficas de volcán y tablas.

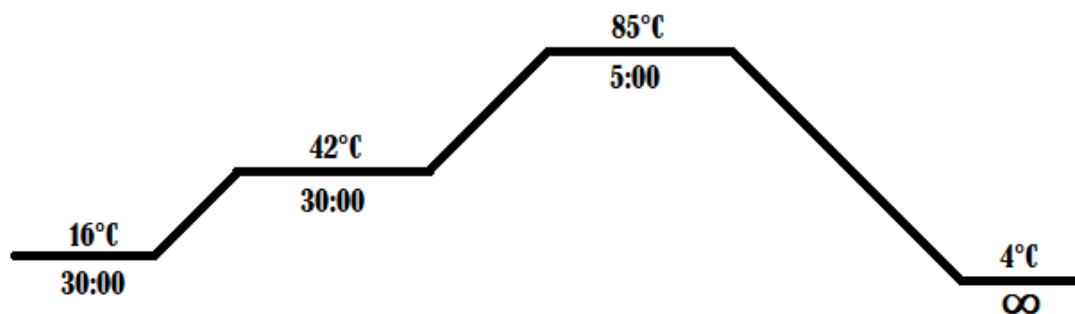
Los datos completos de los microarreglos se subieron a la base Ominibus expression Gene (<http://www-ncbi-nlm-nih-gov.ezproxy.galter.northwestern.edu/geo/>), con número de acceso : **GSE123293**.

Expresión de microRNAs

El equivalente a 10 ng de RNA total en un volumen de 5 μ l se mezcló con 3 μ l del 5x RT primer para cada una de las sondas, y se preparó la siguiente mezcla:

Componentes	Volumen 1x
100 mM dNTP's (con dTTP)	0.15 μ l
Multiscribe Reverse Transcript 50u/ μ l	1.0 μ l
10x Buffer de transcripción reversa	1.5 μ l
Inhibidor de RNAsas	0.19 μ l
Agua libre de RNAsas	4.16 μ l
Volumen Total	7.0 μl

A la mezcla del RNA total y el primer se agregó 7 μ l de la mezcla anterior y se incubó 5 minutos sobre hielo. Y se incubó bajo los siguientes parámetros:

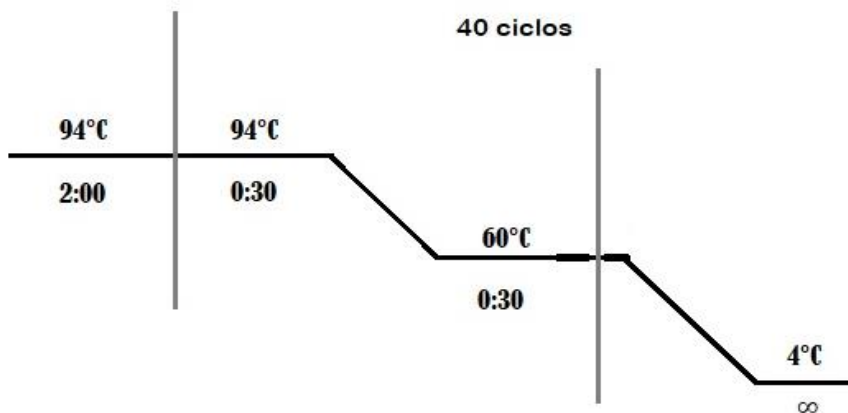


Para la PCR, se preparó la siguiente mezcla:

Componentes	Volumen 20 μ l de reacción
-------------	--------------------------------

TaqMan smallRNA Assay (20x)	1.00 μ l
Producto de la reacción de RT	1.33 μ l
TaqMan Universal PCR master mix	10.0 μ l
Agua libre de RNAsas	7.67 μ l
Volumen Total	20.0 μ l

La mezcla se centrifugó gentilmente y se incubó bajo las siguientes condiciones:



Para medir la expresión de los miRNAs se utilizaron las siguientes sondas (Applied Biosystems):

Sonda	Clave
mmu-miR23a-5p	002439
mmu-miR27a-3p	000408
mmu-miR29a-3p	002112
mmu-miR29b-3p	000413
mmu-miR145a-3p	002514
snoRNA202	001232/AF357327

Inmunohistoquímica

Cortes de tejido pulmonar de ratones jóvenes y viejos silvestres fueron tratados como se describe previamente (109). La recuperación del antígeno fue realizada con buffer de citratos 10 mM, pH 6.0 durante 6 minutos en microondas a nivel máximo. Las muestras fueron incubadas con anti-*Zmpste24* (Sigma) a 4°C toda la noche.

Los tejidos fueron después incubados con un anticuerpo secundario conjugado a biotina seguido de un anticuerpo con estreptavidina conjugada a peroxidasa (BioGenex, San Ramon, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se reveló con 3-amino-9etil-carbazol (AEC, BioGenex) en buffer acetatos y 9.05% de H₂O₂. Las muestras se contratiñeron con hematoxilina. Para los controles negativos, los anticuerpos primarios se sustituyeron por suero.

Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre 3 o más grupos se determinó mediante ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Tuckey o prueba de T-student para diferencias entre dos grupos. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Para evaluar el grado de fibrosis, se utilizó un método no paramétrico, la prueba de Kruskal-wallis, seguida de la prueba de Mann-Whitney U. Todos los resultados se expresaron como la media \pm SD (desviación estándar) o SEM (Error estándar).

Resultados.

Debido a que no es viable realizar cruzas entre los ratones homocigotos nulos de *Zmpste24*, ya que son infértiles, la colonia se expandió mediante cruzas de animales heterocigotos de *Zmpste24*. Como durante las primeras semanas de edad los animales son fenotípicamente

indistinguibles, se determinó su genotipo a partir de DNA de colas mediante PCR. En la figura 9 A se muestra un gel de agarosa de un grupo representativos de ratones genotipificados, donde bandas de 303 pb corresponden al homocigoto nulo, las de 520 pb para el homocigoto silvestre o ambas en el caso de los ratones heterocigotos. La figura 9 B representa la proporción génica de la población obtenida en cada uno de los lotes.

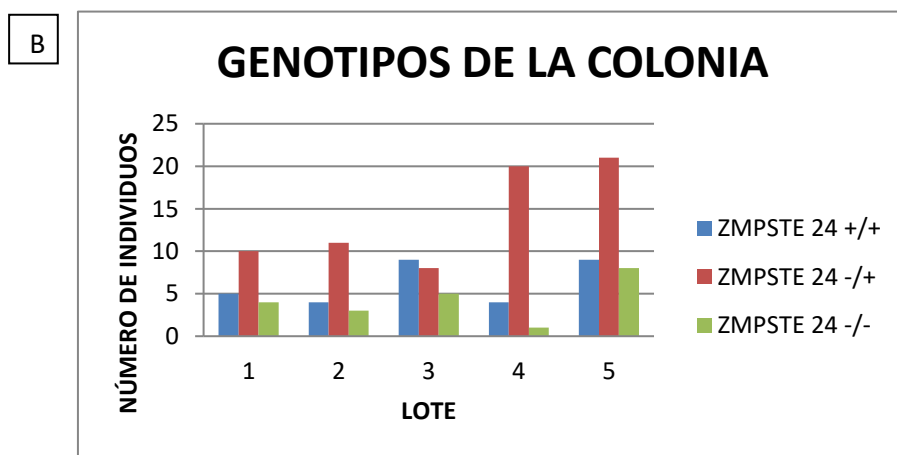
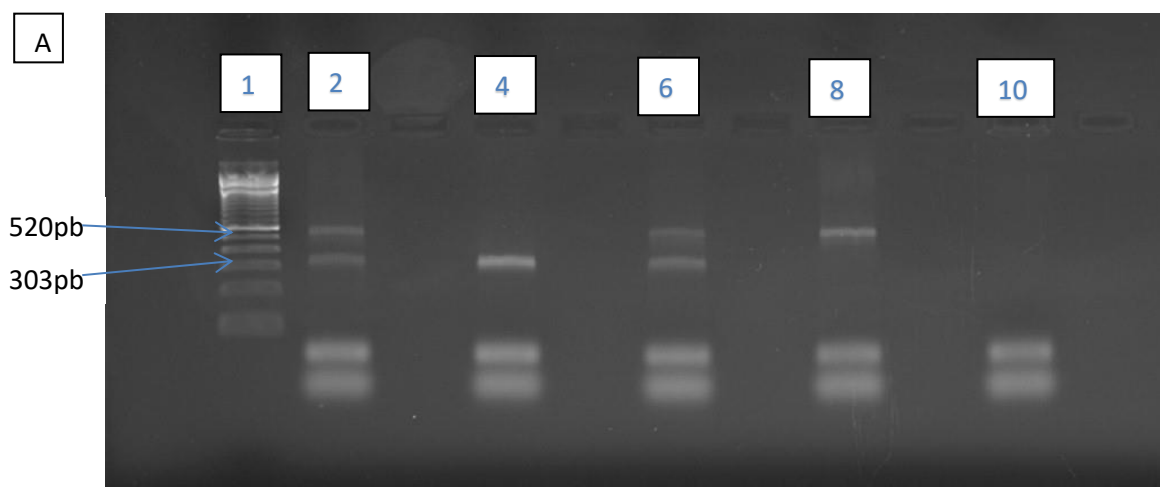
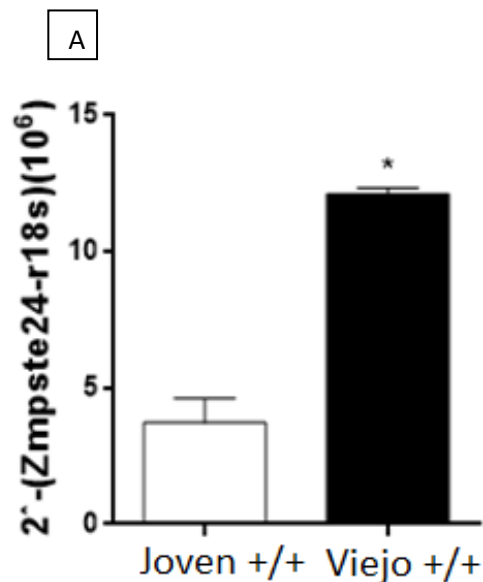


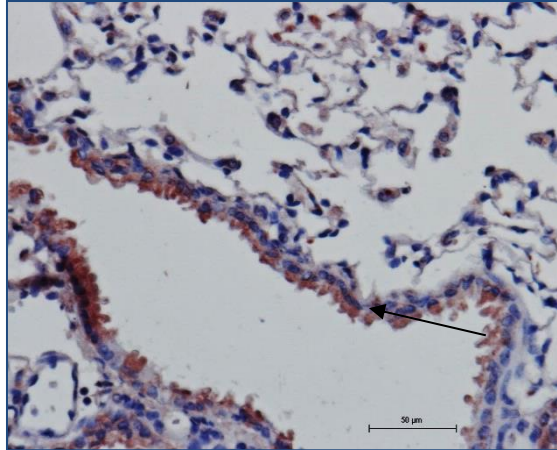
Figura 9 Genotipificación de la colonia. A) Gel de agarosa ejemplificando las bandas de DNA correspondientes según el genotipo. El carril 1 Pesos moleculares (100pb), el carril 2 ratón HT, el carril 4 ratón KO, el carril 6 ratón HT, el carril 8 ratón WT, el carril 10 control negativo sin DNA y los carriles no numerados están vacíos (520pb=WT, 303pb=deficiente de *Zmpste24*), B).Gráfica de barras que muestran el número de individuos de cada genotipo obtenidos en los diferentes lotes.

Una vez establecida la colonia se midió la expresión del gen de *Zmpste24* en ratones silvestres jóvenes (7 semanas) y viejos (82 semanas) para determinar si había un cambio en la expresión de la enzima en el pulmón durante el envejecimiento. Como se muestra en la figura 10 A, mediante qPCR se determinó que *Zmpste24* se expresa significativamente más en el pulmón de los ratones WT viejos comparados con los WT jóvenes y, cómo se muestra en la imagen histológica de una tinción tricrómica de Masson, se localiza en células del epitelio bronquialveolar principalmente. (Figura 10 B). Sugiriendo un papel de esta enzima en el envejecimiento pulmonar.



B

Joven +/+



Viejo +/+

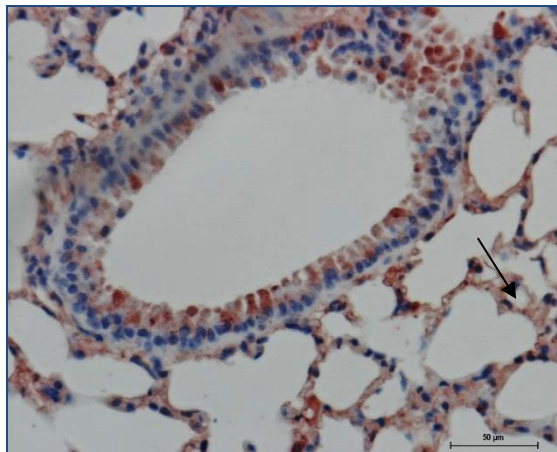
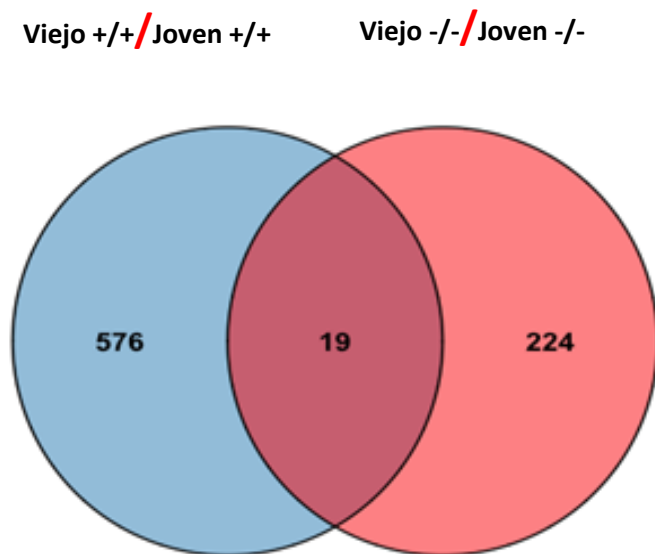


Figura 10. Expresión y localización de Zmpste24 en pulmones de ratones jóvenes y viejos. A) qPCR de Zmpste24 en pulmones de ratones WT jóvenes y viejos en condiciones basales. Los resultados se muestran como media \pm SD (Unidades arbitrarias), y las diferencias estadísticas está determinada por la prueba de t- de student (* $p < 0.05$). B) Fotomicrografías representativas de la tinción de inmunohistoquímica específica usando un anticuerpo contra la proteína Zmpste24 en pulmones de ratones WT jóvenes y viejos en condiciones basales. Las señales positivas se observaron en células del epitelio bronquialveolar (flechas negras). Todas las secciones se contratiñeron con hematoxilina. Con una magnificación de 20x. Escala de 50 µm.

Para profundizar en las posibles diferencias en el pulmón durante el envejecimiento natural y el envejecimiento prematuro, se evaluó la expresión global de genes, través de un análisis de microarreglos del transcriptoma completo de ratón, en pulmones derivados de 3 ratones KO viejos (16 semanas de edad) y 3 WT viejos (82 semanas de edad) comparados contra su respectivo joven (7 semanas de edad) y, se graficaron los genes diferencialmente expresados ($\log\text{Fold change} > 1.0$, $\text{adjusted } p < 0.05$) del transcriptoma completo. En la figura 11A, el diagrama de venn muestra que cambiaron 576 genes únicamente en el pulmón de ratones WT viejos, y 224 en el pulmón de ratones KO viejos. Así mismo, solamente 19 genes se encontraron diferencialmente expresados en común en ambos grupos. Algunos de los genes compartidos entre el envejecimiento natural y acelerado se enlistan en Figura 11B.

Con ayuda de herramientas bioinformáticas, se encontró que estaban desreguladas diversas vías asociadas a patologías (Figura 11 C) y de respuesta inmune (Figura 11D) en el envejecimiento acelerado en el ratón viejo KO comparado contra el envejecimiento natural en el ratón WT.

A

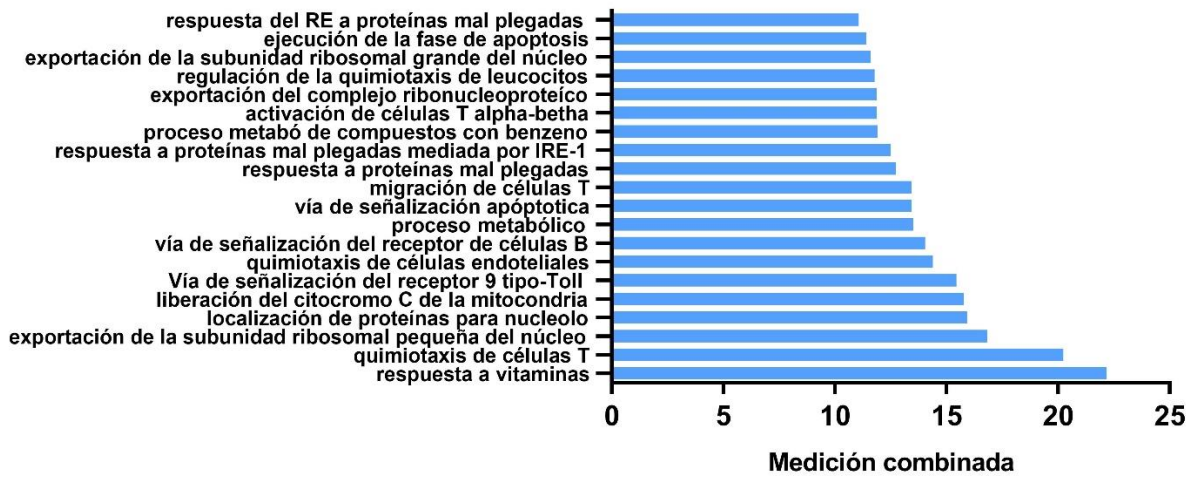


B

Simbolo	+/+	-/-
Rgs5		Disminuido
Mir664	Aumentado	Disminuido
Nrcam		Disminuido
Fgfr4		Disminuido
Il7r	Aumentado	
Sp140		
Car3	Disminuido	Disminuido
Sprr1a	Aumentado	Disminuido
Cxcl13	Aumentado	Aumentado
Prdm8		Disminuido
Spp1	Aumentado	
Cxcl10	Aumentado	
Igk	Disminuido	Aumentado
Slc7a10	Disminuido	Disminuido

■ Aumentado
■ Disminuido

C



D

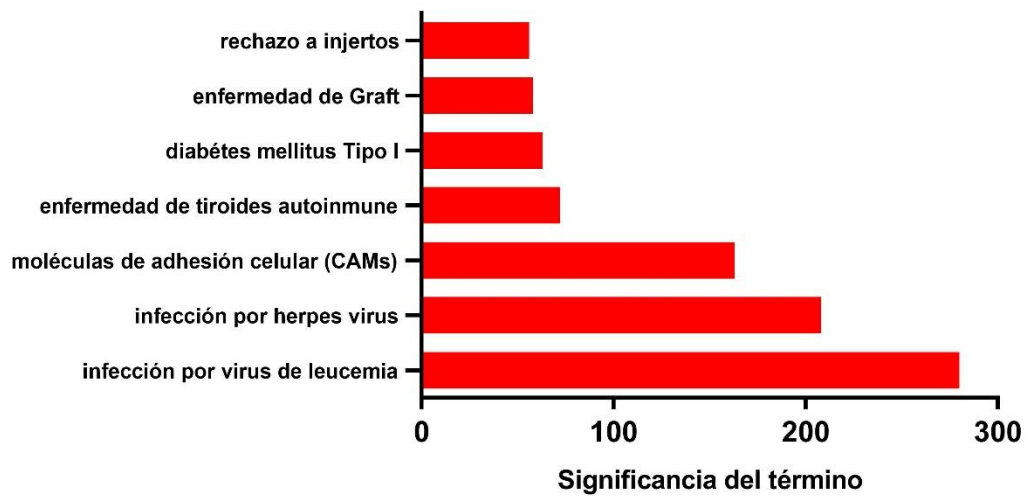
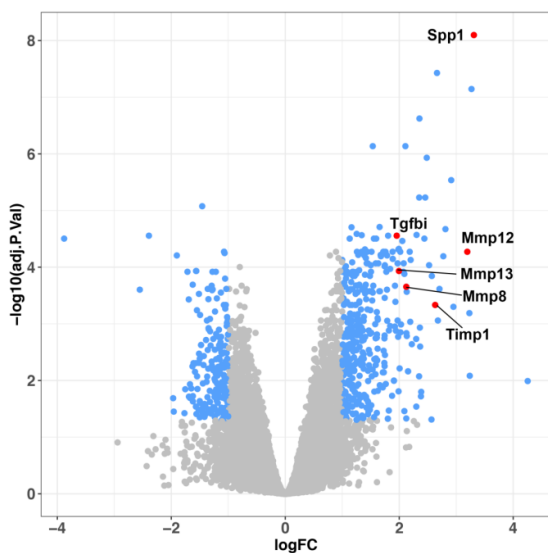


Figura 11. Sobrelapamiento de genes diferencialmente expresados en el envejecimiento normal y acelerado del pulmón. A) Diagrama de Venn mostrando 19 genes (pruebas únicas) diferencialmente expresados tanto en el ratón viejo silvestre comparado contra su joven y en el ratón viejo deficiente de Zmpste24 comparado contra su contraparte joven. Los genes sobrelapados fueron listados en B). Finalmente, se muestran los procesos biológicos enriquecidos asociados a la Ontología de Gnes (GO) C) y KEGG D) para los genes desregulados mostrados en la lista

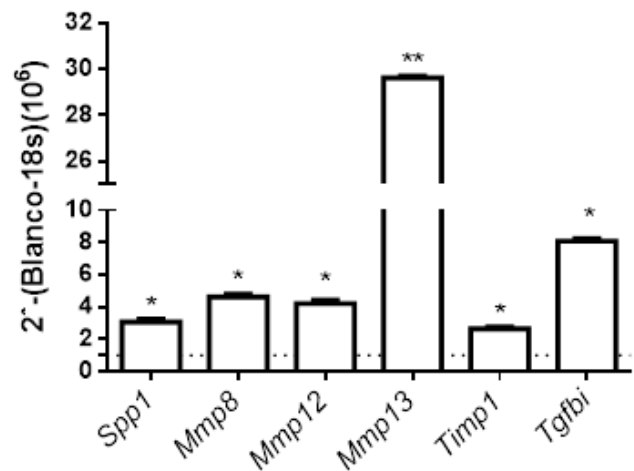
En el caso de los ratones jóvenes *Zmpste24* +/+ y -/-, se encontró que, entre los genes diferencialmente expresados entre el pulmón de ratones KO comparados contra su contraparte WT, se encontraban principalmente genes de inmunoglobulinas, así como variantes de inmunoglobulinas y de los complejos de inmunohistocompatibilidad (datos no mostrados). Una vez más, estos datos apoyan que la deficiencia de *Zmpste24* esta asociada a la regulación de la respuesta inmune.

Posteriormente, cuando se analizaron los resultados de microarreglos para cada grupo de forma independiente, se observó que en los pulmones de ratones viejos silvestres comparados contra su contra parte joven cambiaron 576 genes. Interesantemente, algunos de estos genes pertenecen al corazón del matrisoma (110) o a los genes asociados al matrisoma (110) (Figura 12 A). Se seleccionaron *Spp1*, *Mmp8*, *Mmp12*, *Mmp13*, *Timp1* y *Tgfb1* para validar los cambios en su expresión obtenida en la evaluación del transcriptoma mediante microarreglos, y se midió la expresión de cada gen mediante PCR en tiempo real. Los resultados validaron la sobreexpresión de estos genes en los pulmones de ratones WT viejos comparados contra su contraparte joven (Figura 12B).

A

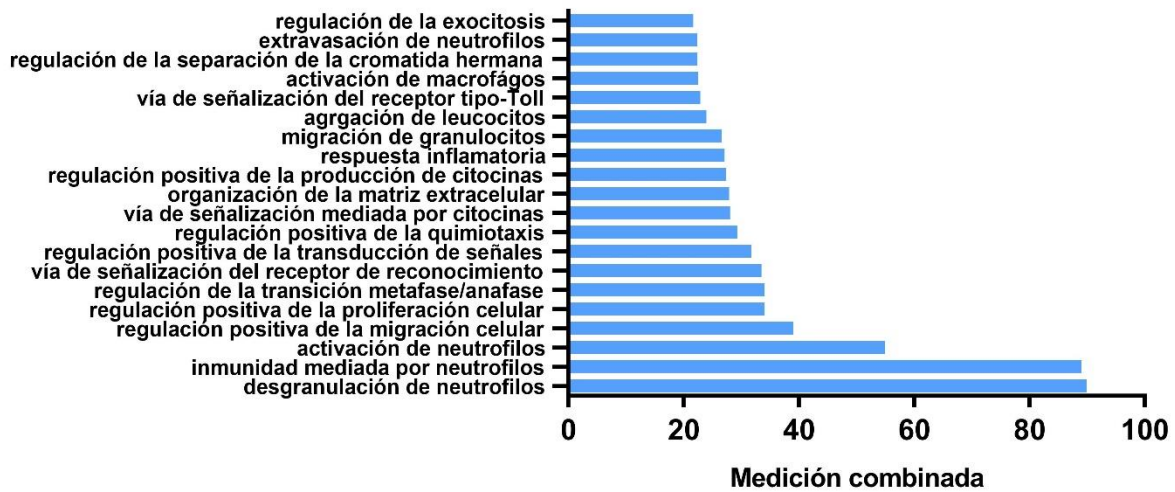


B



Así mismo, el análisis bioinformático arrojó que las principales vías alteradas en estos pulmones estaban relacionadas con cambios en la respuesta inflamatoria (Figuras 12C y D).

C



D

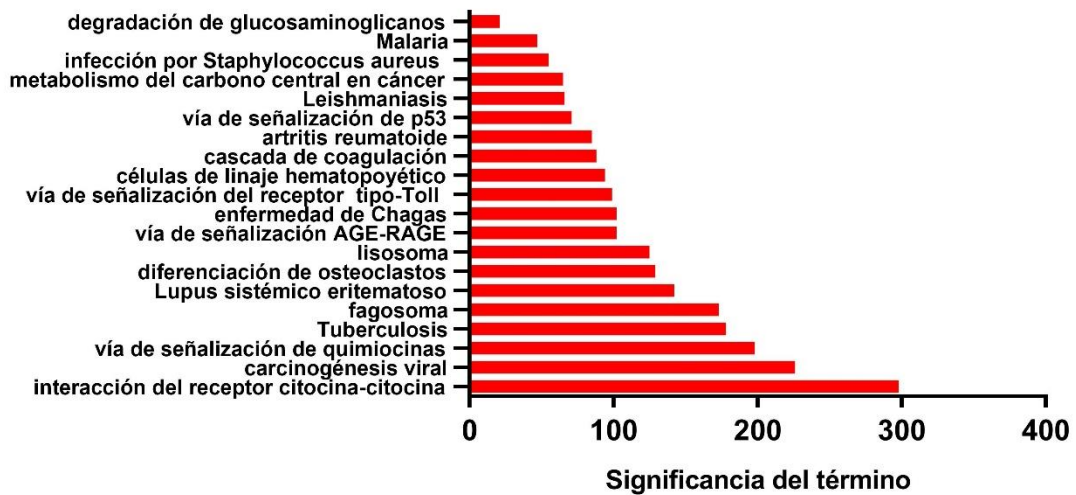
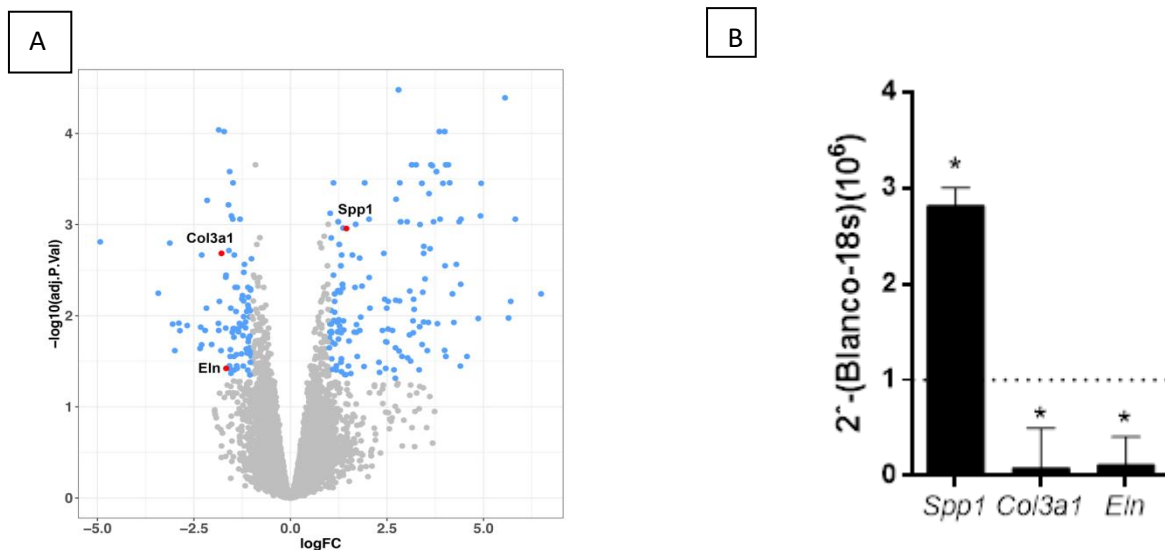


Figura 12. Genes diferencialmente expresados en el pulmón de ratones viejos C57BL/6 comparados con su contraparte joven. A) Gráfica de volcán de la expresión global de genes en el pulmón de ratones viejos silvestres contra su contraparte joven. Cada punto representa el cambio en la expresión (expresada en logaritmo) entre ambos grupos de ratones en relación al valor nivel estadístico. Los puntos azules representan los genes diferencialmente expresados ($\log \text{fold-change} > 1$ (excepto miRNAs, $\log \text{fold-change} > 0.05$), $\text{adjusted } p < 0.05$), a la derecha los sobreexpresados y a la izquierda los disminuidos. Algunos genes del core o asociados al matrisoma fueron

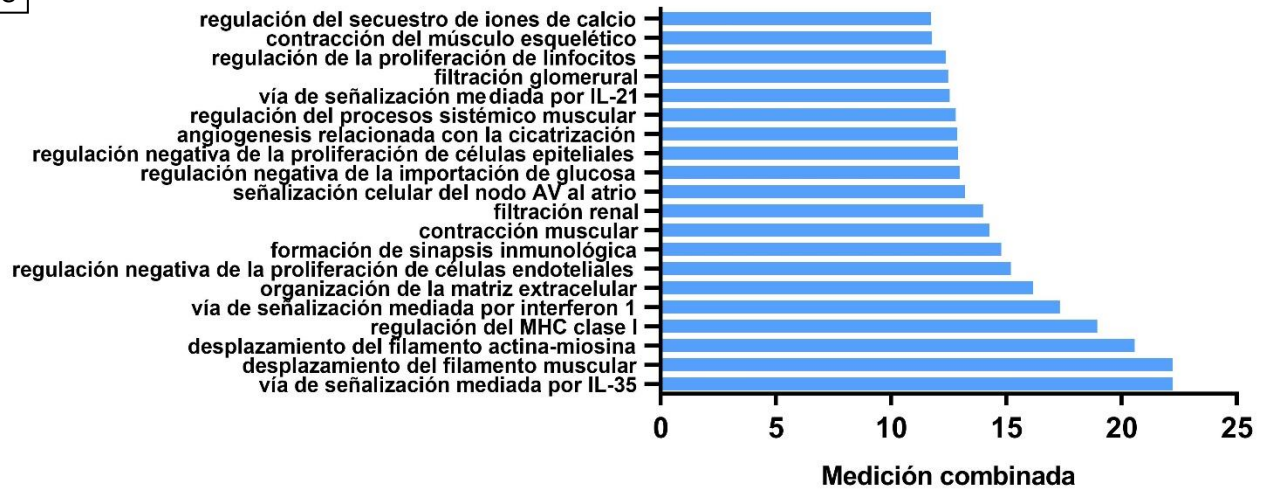
seleccionados y señalados en rojo y su expresión fue validada por PCR cuantitativo en B). Ensayo de RT-qPCR de algunos genes seleccionados (*Spp1*, *Mmp8*, *mmp12*, *Mmp13*, *Timp1* y *TGF-β*) Las barras representan las veces de cambio de los ratones viejos sobre los jóvenes (línea punteada). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Finalmente, se muestran los procesos biológicos enriquecidos asociados a la Ontología de Gnes (GO) C) y KEGG D) para los genes desregulados en los pulmones de ratones WT viejos comparados contra WT jóvenes.

De forma contraria a lo que ocurre en el envejecimiento natural del pulmón, a excepción de *Spp1*, en el ratón viejo deficiente de *Zmpste24* los genes del matrisoma desregulados se encuentran principalmente subexpresados (Figura 13A). Como se muestra en la Figura 13B, se validó mediante qPCR la disminución del RNAm de algunos genes incluyendo *Spp1*, *Col3a1* y *Eln* en 3 pulmones de ratones KO viejos comparados contra 3 ratones KO jóvenes.

Del mismo modo, se realizó un análisis funcional de enriquecimiento en términos de GO y KEGG que reveló vías alteradas relacionadas con la organización de la matriz extracelular, senescencia celular, respuesta inmune, así como de regulación negativa de vías de proliferación de células epiteliales y endoteliales (Figuras 13C y D).



C



D

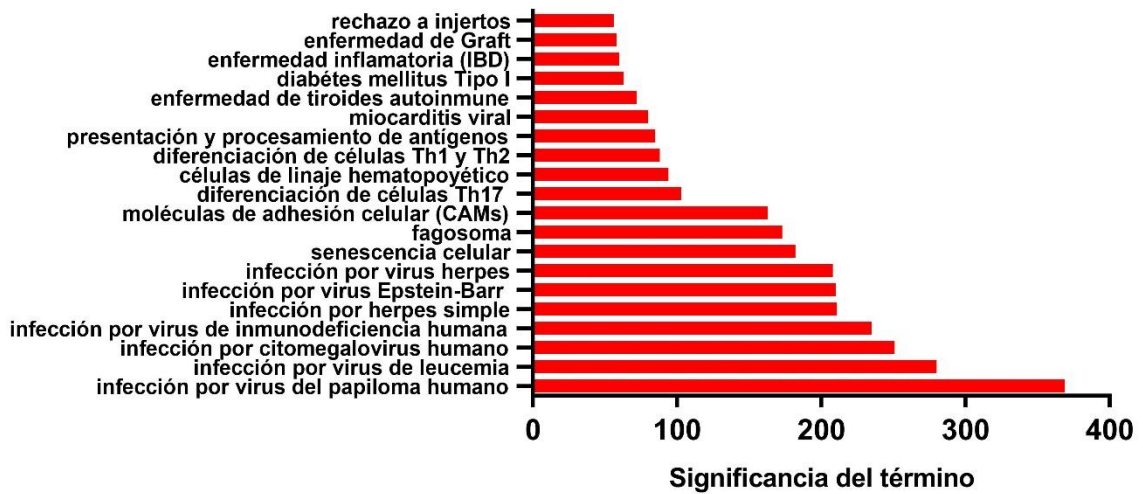
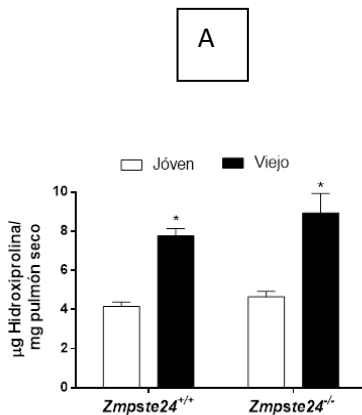


Figura 13. Genes diferencialmente expresados en el pulmón de ratones deficientes de *Zmpste24* comparados contra su contraparte joven. A) gráfica de volcán de la expresión global de genes expresados en el pulmón de ratones viejos deficientes de *Zmpste24* comparados contra su joven. Cada punto representa la diferencia en la expresión (log fold-change) entre los dos grupos graficada contra su significancia estadística. Los puntos azules representan los genes diferencialmente expresados (log fold-change > 1, excepto miRNAs = log fold-change > 0.5) a un nivel significativo de adjustedp < 0.05. Se seleccionaron algunos genes del core del matrisoma señalados en rojo, y se validó su expresión mediante PCR cuantitativo en B) * p< 0.05 . Los datos representan las veces de cambio comparadas con el joven deficiente de *Zmpste24* (líneas punteadas). Finalmente, se muestran los procesos

biológicos enriquecidos asociados a la Ontología de Gnes (GO C) y KEGG D) para los genes desregulados en el envejecimiento acelerado de 3 ratones KO comparados contra su contraparte joven.

Con el objeto de evaluar el daño fibrosante pulmonar posterior a la administración de bleomicina en ratones silvestres y deficientes de *Zmpste24*, primero se midió en condiciones basales el contenido de colágena en 3 ratones jóvenes WT y 3 viejos, así como en 3 ratones deficientes de *Zmpste24* jóvenes y 3 viejos mediante la cuantificación de hidroxiprolina. Como se observa en la Figura 14A, se observó un mayor contenido de colágena en el pulmón de los ratones viejos deficientes de *Zmpste24* y silvestres comparados contra su respectivo joven, pero no se encontraron diferencias entre ambos viejos. (Viejo *Zmpste24* +/+ : $6.9 \pm 1.5 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs joven $4.2 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{mg}$ y, viejo WT: $6.4 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs joven $4.5 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{mg}$, $p \leq 0.05$). Para poder determinar en qué zonas se estaban depositando las fibras de colágena se realizó una tinción de Masson del tejido pulmonar de 3 ratones viejos deficientes de *Zmpste24* y 3 ratones viejos silvestres, en las que se muestra que las fibras de colágena se localizan alrededor de las vías aéreas (Figura 14B).



B

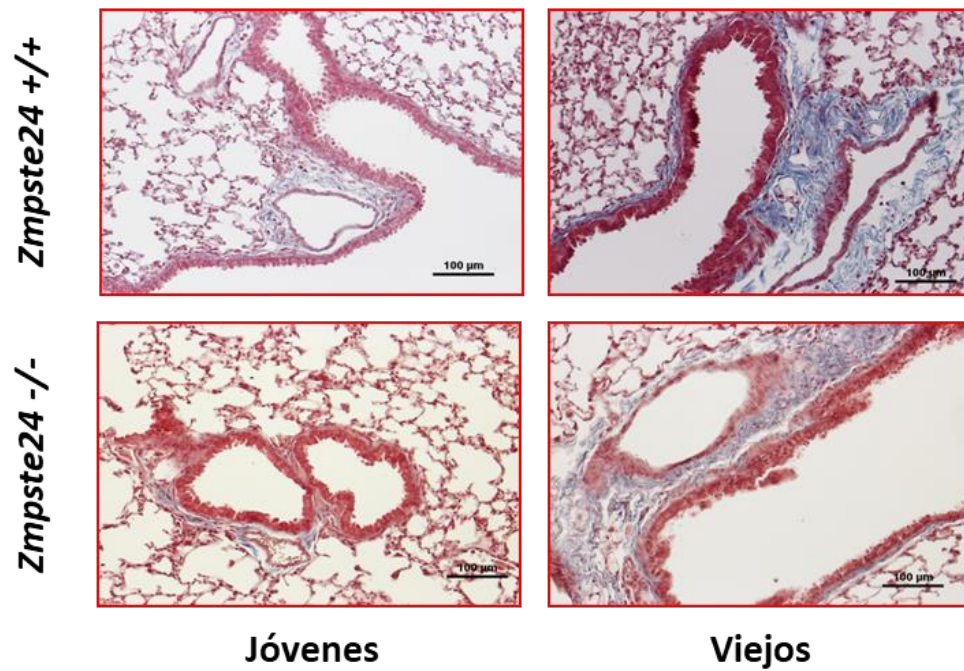
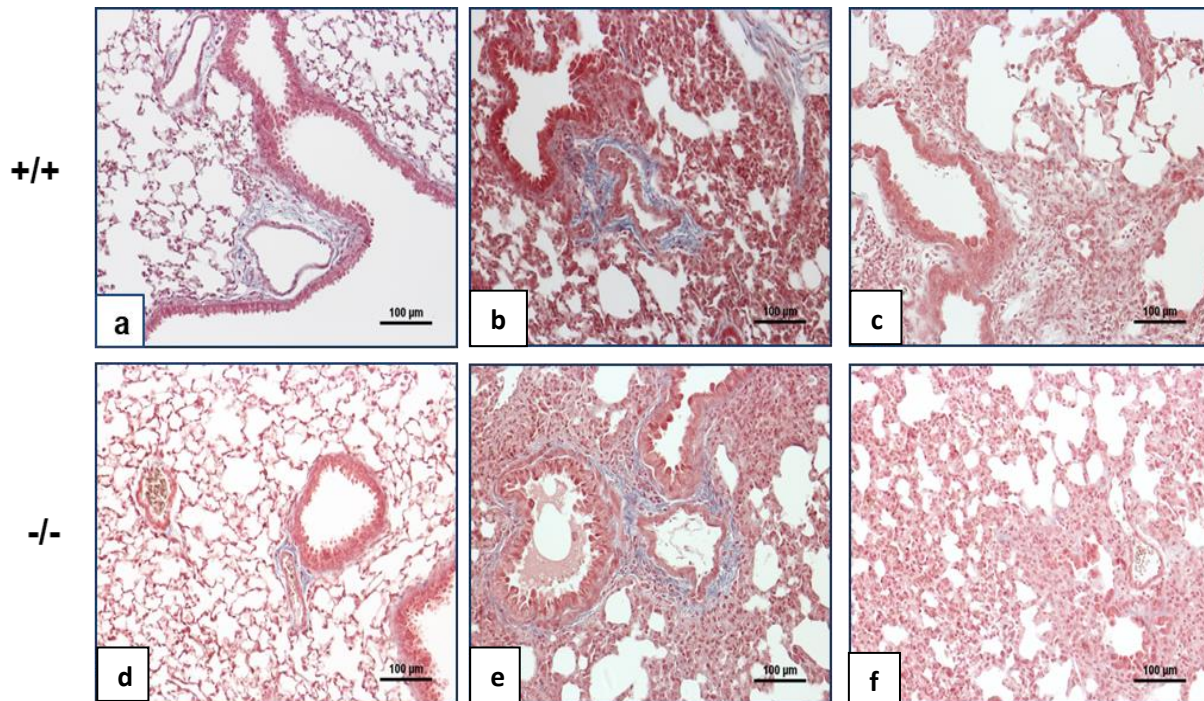


Figura 14. Aumento de colágena en vías aéreas superiores asociado al envejecimiento. A) Contenido de hidroxiprolina. Los datos representan la media \pm la desviación estándar (n=4); *p< 0.05. B) Imágenes representativas de la morfología del pulmón de ratones jóvenes o viejos, silvestres y *Zmpste24* $-/-$ bajo la tinción de tricrómica de Masson. La barra de escala representa 100 μm . Las gráficas representan la media \pm SD. *p< 0.05

Respuesta ante el daño fibrosante inducido por bleomicina en ratones KO y WT.

Posteriormente, con el objetivo de analizar la respuesta fibrótica pulmonar de estos ratones se instilaron con bleomicina 6 ratones deficientes de *Zmpste24* y 6 ratones silvestres jóvenes de 4 semanas de edad. Después de 21 días, los ratones se sacrificaron y se evaluó por análisis histológico el grado de fibrosis y la extensión del daño (Figura 15 A). Se observó que tanto en los ratones WT como en los KO el porcentaje de extensión del daño y el grado de fibrosis era similar (Figuras 15 B y C). El análisis bioquímico del contenido de colágena mediante la determinación de hidroxiprolina mostró un incremento en los grupos tratados con bleomicina comparados contra el grupo administrado solamente con solución salina, pero no se encontraron diferencias significativas entre los ratones silvestres comparados con los *Zmpste24* $-/-$ (6.1 ± 0.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ y 6.3 ± 1.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$, para el WT y KO, respectivamente). (Figura 15D).

A



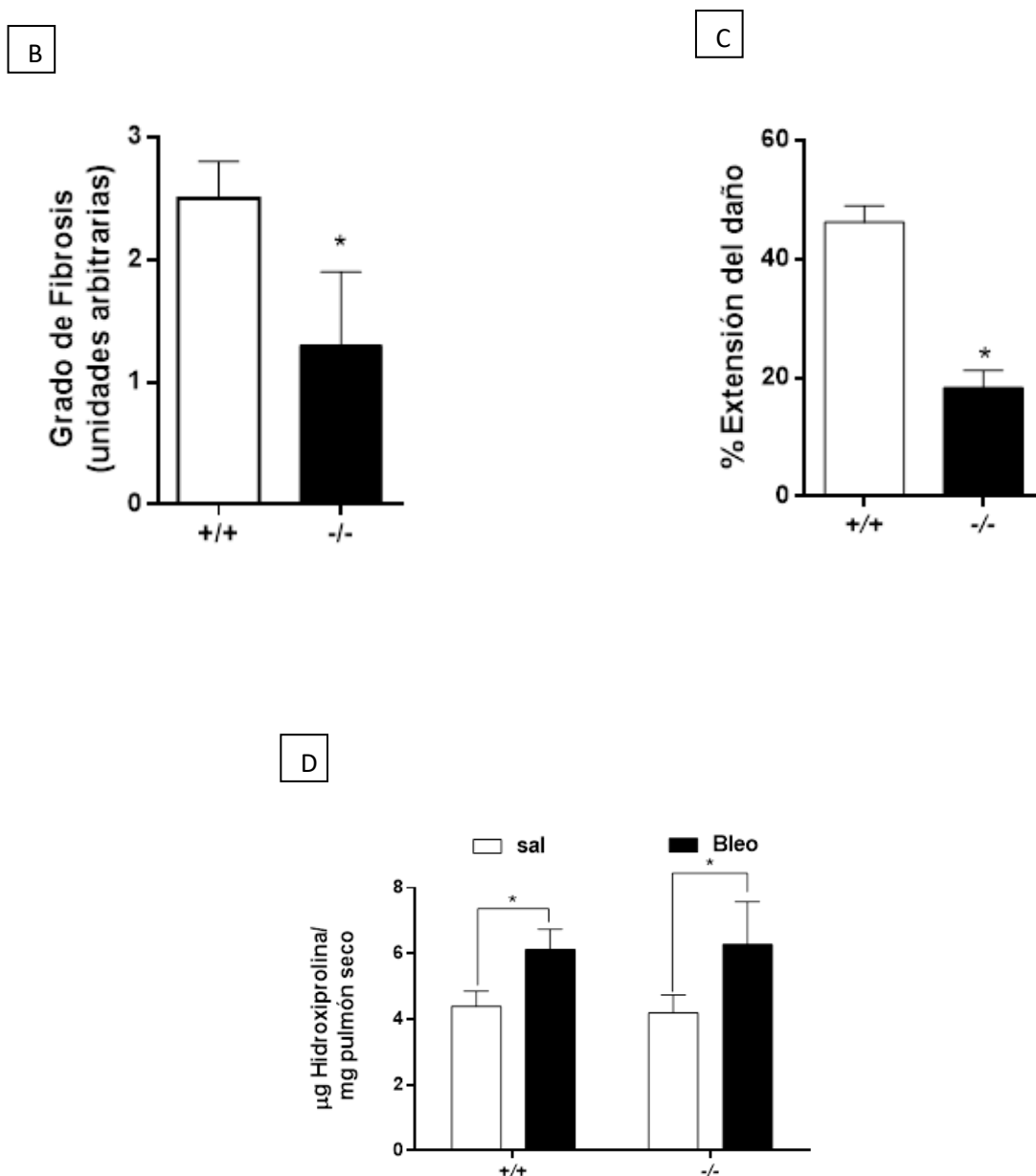
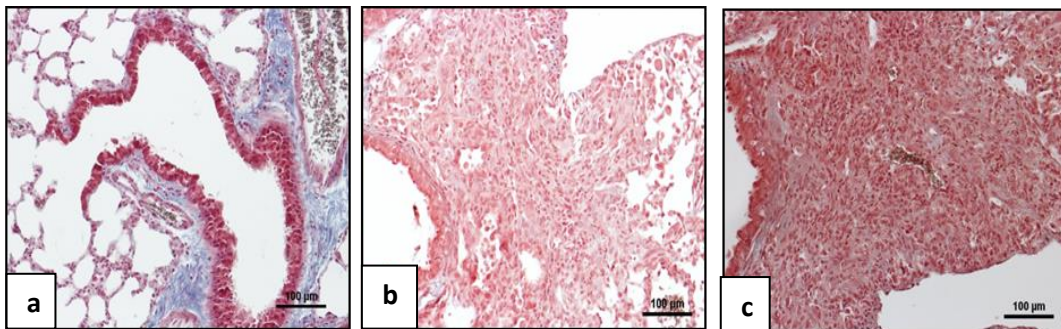


Figura 15. Los ratones jóvenes silvestres y *Zmpste24* *-/-* desarrollan una respuesta fibrótica similar después de la inducción de daño con bleomicina. A) Imágenes representativas de tinciones con tricrómica de Masson de secciones pulmonares de ratones control administrados con solución salina (Panel a) y 21 días después de la administración de bleomicina (panel b y c), y de ratones *Zmpste24* *-/-* control administrado con solución salina (panel d) y administrados con bleomicina (paneles e y f). La barra de la escala representa 100 µm. B) Grado de fibrosis y C) extensión del daño del grado de cambios histopatológicos en el pulmón. D) Contenido de hidroxiprolina en los pulmones de ratones silvestres y *Zmpste24* *-/-* después de la administración de solución salina o 21 días después de la administración de bleomicina. * $p < 0.05$; (n=6). Las gráficas representan la media \pm SD.

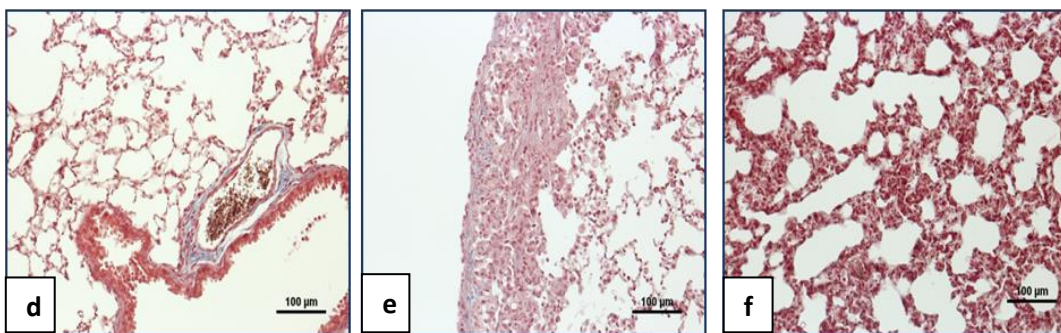
Hasta el momento, existen pocos trabajos en los que se evalúa la respuesta fibrótica pulmonar inducida por bleomicina en ratones viejos. Sin embargo, éstos concuerdan que los ratones viejos son más susceptibles al desarrollo de fibrosis pulmonar que su contraparte joven. Basados en esto, me interesaba conocer si la respuesta fibrótica posterior al daño con bleomicina en los ratones con envejecimiento acelerado deficientes de *Zmpste24* viejos (16 semanas de edad) era similar a la de los ratones viejos silvestres (82 semanas de edad). Para poder contestar esa pregunta, se evaluó la respuesta fibrótica 21 días posteriores al daño con bleomicina, y se midió la acumulación de hidroxiprolina en 6 ratones deficientes de *Zmpste24* viejos y 6 silvestres viejos. En el caso de los ratones viejos WT, el análisis histológico mostró zonas del tejido pulmonar severamente dañadas, acompañadas de un depósito excesivo de fibras de colágena en los ratones dañados con el fármaco comparados con los controles (Figura 16 A, paneles a, b y c). Corroborando lo anterior, se encontró un mayor contenido de hidroxiprolina tras el daño con bleomicina en estos ratones ($8.8 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs salina: $6.4 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mg}$, $*p \leq 0.05$) (Figura 16 D). Sorpresivamente y contrario a lo que ocurre en los ratones silvestres, los ratones viejos deficientes de *Zmpste24* parecían estar protegidos al desarrollo de fibrosis pulmonar, mostrando sólo un ligero daño en el tejido pulmonar en respuesta a la bleomicina (Figura 16 A, paneles c, d y e). Acorde con lo anterior, el contenido de hidroxiprolina también fue significativamente menor en el pulmón de estos ratones que el de su contraparte silvestre (-/- 1.3 ± 0.6 versus WT: 2.5 ± 0.3 $*p \leq 0.05$) (Figura 16 D). Finalmente, con la ayuda de un patólogo, observó que tanto el grado de fibrosis como la extensión del daño era significativamente menor en los ratones KO viejos comparados con los viejos silvestres (Figura 16 B y C). Sugiriendo que, la ausencia de *Zmpste24* y el envejecimiento protegen a los ratones del desarrollo de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina.

A

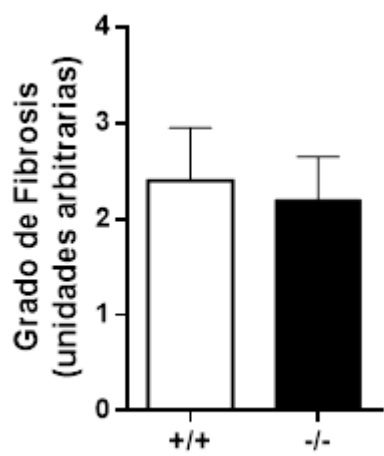
+/+



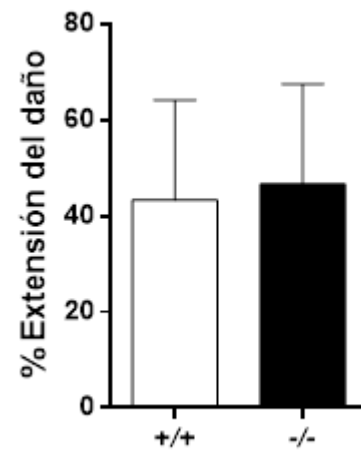
-/-



B



C



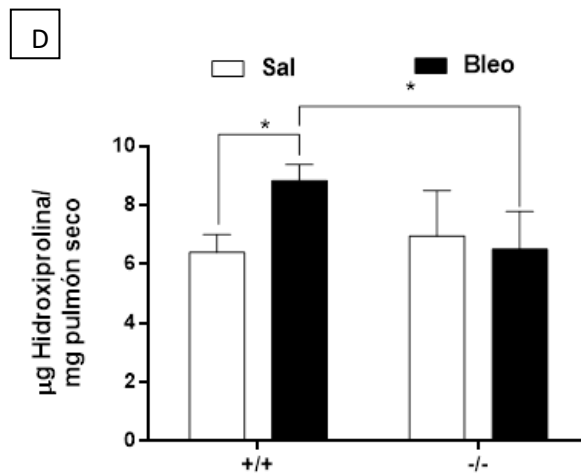


Figura 16. El envejecimiento protege a los ratones deficientes de *Zmpste24* del desarrollo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. A) Imágenes representativas de secciones de pulmón teñidas con tricrómica de Masson de ratones viejos silvestres control administrados con solución salina (panel a) y 21 días después de la administración de bleomicina (paneles b y c), y de ratones viejos *Zmpste24* *-/-* control administrados con solución salina (panel d) y 21 días después del daño con bleomicina (paneles e y f). La barra de la escala representa 100 μ m. B) Grado de fibrosis y C) extensión del daño del grado de cambios histopatológicos en el pulmón. D) Contenido de OH-prolina en los pulmones de ratones viejos silvestres y *Zmpste24* *-/-* después de la administración de solución salina o 21 días después de la administración de bleomicina. * $p < 0.05$; (n=6). Las gráficas representan la media \pm SD.

Para elucidar qué posible mecanismo estaba participando en la protección de fibrosis pulmonar de los ratones viejos deficientes de *Zmpste24* se midió la expresión diferencial del transcriptoma completo mediante un análisis de microarreglos en el pulmón de 3 ratones deficientes de *Zmpste24* viejos 21 días después del daño con bleomicina comparados contra su contraparte silvestre.

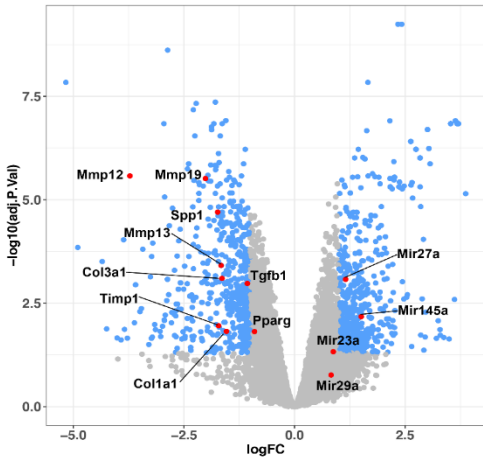
El análisis develó la expresión de 1165 diferencialmente expresados en el pulmón del ratón deficiente de *Zmpste24* comparado contra su contraparte silvestre (Figura 17A).

Entre los genes disminuidos se encontraron varios genes de moléculas asociadas al matrisoma como *Mmp12*, *Mmp19*, *Mmp13*, *Timp1* y *Ppar γ* , así como *Col1a1*, *Col3a1* y *Spp1* que pertenecen al core del matrisoma. Además, se encontraron sobreexpresados algunos genes con actividad antifibrótica como *NAPDHO4* (111), *TGF β III* y *Dcn*.

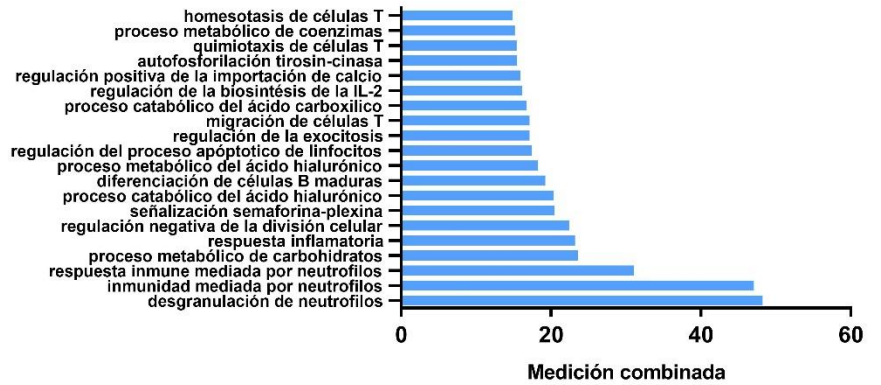
Utilizando el software key Pathway Advisor-Clarivate se encontraron desregulados 6 factores de transcripción incluyendo al factor de transcripción expresado paternalmente (Peg3), el regulador negativo de la respuesta inflamatoria del receptor nuclear subfamilia 4 grupo A miembro 1 (NR4A1), el receptor relacionado a RAR (RORC), el factor tipo Kruppel 15 (KLF15), el factor 3a inducible por hipoxia (HIF 3a) y el factor de respuesta de crecimiento temprano (Egr1). Mientras que los análisis funcionales de enriquecimiento GO y KEGG, revelaron que estaban alteradas distintas vías principalmente aquellas relacionadas con la respuesta inmunológica/inflamatoria en pulmón dañado de los ratones viejos KO comparados con el de su contraparte silvestre (Figura 17 B y C).

Interesamente, 42 de los genes deregulados resultaron ser miRNAs, correspondiendo a más del 3.6% de los genes diferencialmente expresados en el pulmón de los ratones KO viejos dañados comparados contra su contraparte silvestre. Entre este grupo de miRNAs, se encontraron sobreexpresados miR23a, miR27a, miR29 y miR145a, todos miRNAs relacionados con la fibrosis pulmonar en humano y/o en modelos animales. Sugiriendo que los miRNAs podrían estar involucrados en la resistencia al desarrollo de fibrosis pulmonar en los ratones viejos KO.

A



B



C

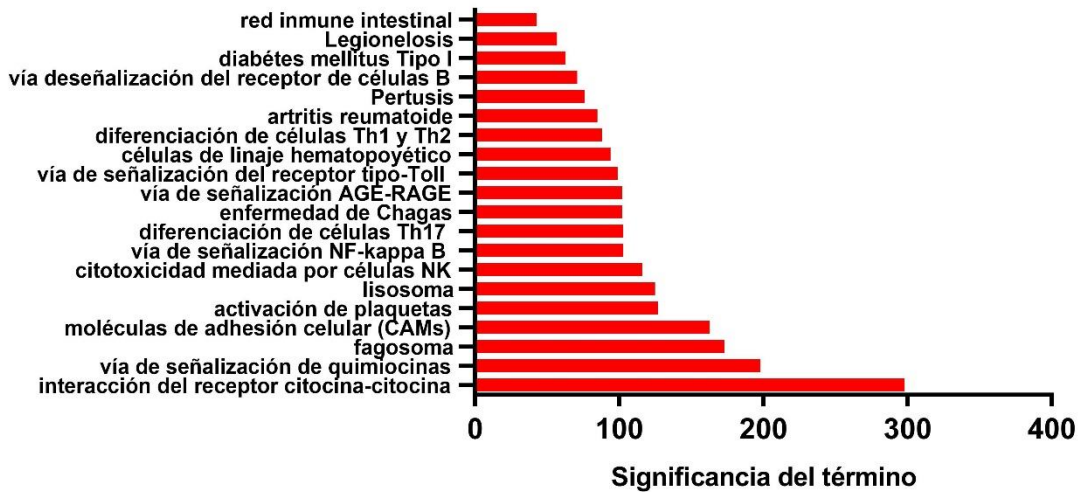


Figura 17. Análisis transcriptómico de pulmones dañados con bleomicina de ratones viejos deficientes de *Zmpste24* comparados contra su contraparte silvestre. A) Gráfica de volcán de los significativamente diferentes RNAs (puntos azules) o no (puntos grises) y algunos genes seleccionados para su validación por qPCR (puntos rojos). B) Gráfica de pastel mostrando los RNAs significativamente diferentes (up= 1296, down= 800) y miRNAs (up= 22, down= 20) en pulmones de ratones viejos *Zmpste24* *-/-* comparados contra su contraparte silvestre. Para todos los experimentos se utilizaron 3 ratones *Zmpste24* *-/-* y 3 ratones *Zmpste24* *+/+*, y el pulmón se obtuvo 21 días después de la administración de bleomicina.

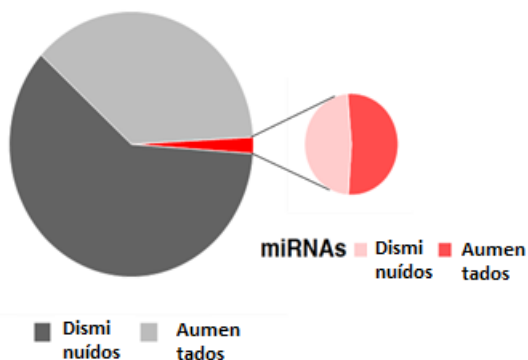
Para poder profundizar un poco más en este hallazgo (Figura 18 A), se midió la expresión por PCR cuantitativo de la forma madura de los miRNAs antifibróticos: miR23a, miR27a, miR29a, miR29b, miR491 y miR145a. Corroborando los resultados obtenidos por los microarreglos, estos 5 miRNAs estaban sobreexpresados en el pulmón de ratones deficientes de *Zmpste24* viejos comparados con ratones silvestres viejos (Figura 18B).

Posteriormente, para poder profundizar en el posible papel de estos miRNAs en la protección del desarrollo de fibrosis pulmonar del ratón viejo deficiente de *Zmpste24*, se identificaron los blancos predichos con la ayuda de dos bases de datos (mirTarbase y TargetScan) para miR29, miR27a y miR145a. Una vez obtenidos los blancos predichos, se seleccionaron aquellos cuya expresión se mostraba alterada en los microarreglos. De la listas obtenidas, para miR29 se seleccionaron los tres genes blancos *Col1a1*, *Col3a1* y *TGF-β1* y se midió su expresión por PCR cuantitativo. Como se muestra en la figura 18 C, la expresión de los 3 blancos está disminuida en el pulmón de ratones deficientes de *Zmpste24* viejos comparados con ratones silvestres viejos 21 días después del daño con bleomicina.

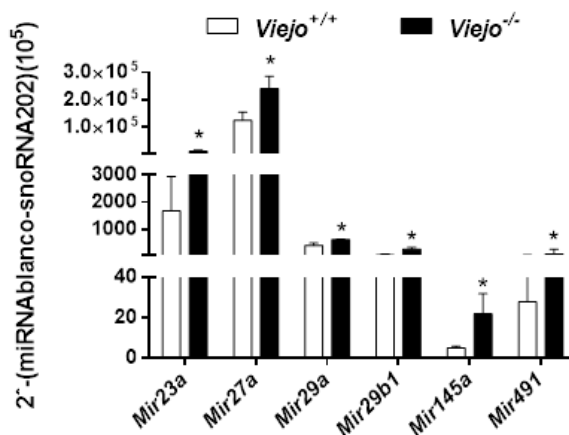
En el caso de los blancos de miR27a, se seleccionaron *Ppar γ* y *Spp1*, confirmando lo esperado la expresión de estos dos mensajeros también estaba disminuida en el pulmón de ratones deficientes de *Zmpste24* viejos comparados con ratones silvestres viejos (Figura 18 D).

Finalmente, para miR145a se seleccionaron como blancos tres moléculas asociadas al matrisoma, *Mmp12* y *Mmp19*, así como su inhibidor, *Timp1*. Para validar su expresión, se midió mediante PCR cuantitativo la expresión de los mensajeros de estos tres blancos, y se graficó la expresión media en el pulmón de 3 ratones viejos deficientes de *Zmpste24* y de 3 silvestres viejos. Los resultados mostraron que la expresión del RNA mensajero de *Mmp12*, *Mmp19* y *Timp1* era significativamente menor en el pulmón de ratones deficientes de *Zmpste24* viejos comparados con ratones silvestres viejos (Figura 18 E).

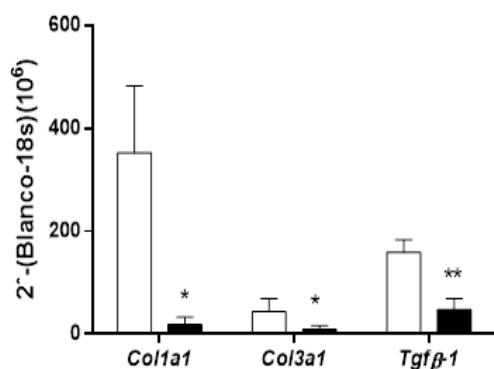
A



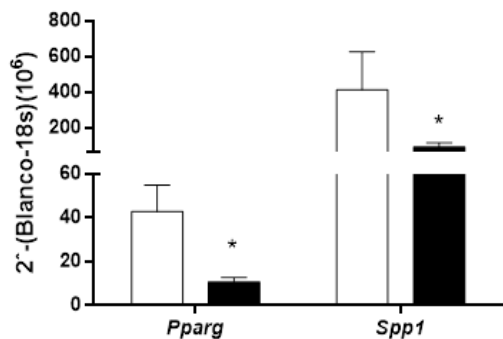
B



C



D



E

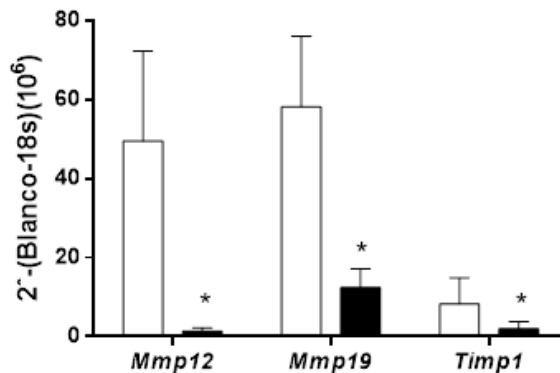


Figura 18. Desregulación de la expresión de miRNAs y de sus genes blancos en pulmones tratados con bleomicina provenientes de ratones viejos *Zmpste24* ^{-/-} y *Zmpste24* ^{+/+} analizada por PCR cuantitativa. A) Expresión de miRNAs seleccionados. Expresión de genes blancos de B) miR29, C) miR27a y D) miR145a. Las barras blancas representan el valor de la media de la expresión en el pulmón de ratones silvestres, y las barras blancas representan la media de la expresión en 3 ratones *Zmpste24* ^{-/-} ± S.E.M. *p < 0.05 and ** p< 0.01.

Discusión.

El envejecimiento se caracteriza por la pérdida de respuesta al daño. Debido a esas características, el envejecimiento es el principal factor de riesgo de múltiples enfermedades, incluyendo las enfermedades pulmonares. En particular, el envejecimiento no solo es el mayor factor de riesgo para desarrollar FPI, sino que empeora la respuesta fibrótica en el humano y en modelos experimentales. Diversos estudios sustentan que en ratones viejos la resolución posterior al daño pulmonar se encuentra alterada, asemejando el comportamiento patofisiológico presente en la fibrosis humana asociada con la edad (112,113).

Sin embargo, el uso de animales viejos en el estudio de la fibrosis pulmonar está limitado por los altos costos de mantenimiento y largos tiempo de espera, y la mayoría de los trabajos dentro del campo se han llevado a cabo utilizando ratones entre 6 -8 semanas de edad.

Recientemente, ratones senescentes que exhiben un envejecimiento acelerado han sido utilizados como modelos que asemejen lo que ocurre en la FPI y en otras enfermedades pulmonares (112,113).

Para este trabajo, nosotros evaluamos la respuesta fibrótica posterior al daño con bleomicina en el ratón deficiente de *Zmpste24* que tiene un fenotipo de envejecimiento prematuro ya marcado a partir de las 8 semanas de edad (71, 114, 115). Debido a que antes de las 5 semanas de edad no se observan diferencias fenotípicas entre los ratones *Zmpste24*^{-/-} y ^{+/+}, se seleccionaron como jóvenes ratones ^{-/-} de 4 semanas de edad y como viejos animales de 13 semanas de edad. Cabe mencionar, que no se encontraron diferencias morfológicas en el pulmón entre los ratones silvestres y deficientes de *Zmpste24*^{-/-} utilizando un microscopio de luz convencional (datos no mostrados) en condiciones basales a las 4 semanas de edad .

Lo primero que se realizó fue un análisis para medir los cambios en la expresión en el transcriptoma completo en el pulmón de ratones viejos silvestres y viejos *Zmpste24*^{-/-} comparados contra su respectivo joven. El análisis reveló un gran número de diferencias en la expresión génica pulmonar durante el envejecimiento natural y acelerado. Interesantemente, uno de los 19 genes compartidos resultó ser miR664 que ha sido fuertemente relacionado con la esperanza de vida (116), donde se muestra que existe una correlación positiva entre la expresión de miR664 y una mayor esperanza de vida. Acorde con lo anterior, mir664 se encontró aumentado en los ratones silvestres, pero disminuido en los deficientes de *Zmpste24*.

Adicionalmente, en el pulmón del ratón silvestre viejo se sobrerreguló la expresión de diversos genes de proteínas de matriz extracelular, tanto del core como asociadas al matrisoma (110). Mientras que, de forma opuesta, con la excepción de *Spp1*, genes del core del matrisoma estaban subexpresados en el ratón *Zmpste24*^{-/-}. Interesantemente, aunque no se encontraron genes de colágenas sobrepresados, cuando examinamos el contenido de hidroxiprolina, observamos un incremento similar en el pulmón de los ratones viejos silvestres y *Zmpste24*^{-/-}. Sugiriendo que lo observado se debe a una acumulación de la proteína con la edad, la cual se localizó alrededor de las vías aéreas.

Posteriormente, se evaluó la respuesta fibrótica utilizando uno de los modelos de fibrosis pulmonar más usado (117), el modelo de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina. En ratones silvestres y deficientes de *Zmpste24* jóvenes o durante el envejecimiento se comparó la extensión del daño y el depósito de colágena 21 días después de la administración del fármaco.

La evaluación del daño pulmonar reveló que mientras los ratones jóvenes silvestres y *Zmpste24*^{-/-} desarrollan una remodelación de la arquitectura pulmonar similar en respuesta a la bleomicina, así como una similar acumulación de colágena, en el pulmón del ratón *Zmpste24*^{-/-} viejo las lesiones están marcadamente atenuadas en comparación contra el ratón viejo silvestre.

Para poder entender el mecanismo por el cual los ratones deficientes de *Zmpste24* estaban protegidos del desarrollo de fibrosis en la vejez, se examinó la expresión del transcriptoma completo en los ratones viejos WT y *Zmpste24*^{-/-} posterior al daño con bleomicina. Los resultados demuestran que un gran número de genes del core del matrisoma o asociadas al matrisoma estaban disminuidos en el ratón viejo *Zmpste24*^{-/-}.

Interesantemente, uno de los genes disminuidos fue *Spp1*, que codifica a la proteína osteopontina, que se había encontrado sobrepresado en condiciones basales tanto en el

envejecimiento natural como acelerado. La osteopontina es un mediador profibrótico (118), que favorece la migración y proliferación de fibroblastos, e induce la síntesis de colágena mientras atenúa la expresión de MMP-1. Sumado a esto, en el modelo experimental, los ratones deficientes de osteopontina acumulan significativamente menos colágena que su contraparte silvestre en respuesta a la bleomicina (119).

Acorde a lo anterior, se encontró que el pulmón de los ratones *Zmpste24*^{-/-} viejos sintetiza menos colágena en respuesta al daño cuando se compara contra los ratones viejos silvestres. Además, de una significativa disminución en los niveles de expresión de los genes de *Col1a1* y *Col3a1*.

Entre la lista de genes que se encontraron disminuidos en el ratón deficiente de *Zmpste24* también aparecieron distintos genes de *Mmps*, incluido el de *Mmp8* que codifica una enzima con actividad colagenolítica, y su deficiencia sistémica protege a los ratones del desarrollo de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina (120).

Debido a que existe una fuerte evidencia de la participación de los miRNAs en la patogénesis de fibrosis pulmonar tanto favoreciendo como atenuando las vías fibrogénicas, se examinó el patrón de expresión de miRNAs, y se identificaron 42 miRNAs diferencialmente expresados en el pulmón de ratones deficientes de *Zmpste24* viejos en respuesta al daño con bleomicina y comparados contra su contraparte silvestre. Entre ellos, se encontró la sobreexpresión de miR23a, miR27a, miR29a/b, miR145a y miR491, cuyos blancos son componentes de la matriz extracelular, por lo que estos miRNAs a excepción de miR23a pueden ser considerados antifibróticos.

Particularmente, miR29b inhibe las vías de Tgf- β 1, CTGF y Smad3, actuando como un co-regulador potencial de la vía profibrótica TGF- β /Smad3/CTGF (121). Consistentemente, se

encontró disminuida la expresión de *Tgf-β1* en los pulmones de ratones *Zmpste24*^{-/-} viejos que sobreexpresaban miR29b-1.

Sumado a lo anterior, la evaluación de la expresión de miR29 en el pulmón a diferentes tiempos posterior al daño con bleomicina reveló una disminución gradual durante el desarrollo de la fibrosis con un subsecuente incremento que correlacionaba con la resolución del daño en las lesiones fibróticas (122).

Por su parte, miR27a es un miRNA antifibrótico que protege a los ratones del desarrollo de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina, funcionando como un mecanismo de retroalimentación negativa que disminuye la diferenciación a miofibroblastos (123). Además, nuestra búsqueda *in silico* predijo a la osteopontina como uno de sus blancos.

Otro de los miRNAs que se encontraron sobreexpresados en el pulmón de los ratones deficientes de *Zmpste24* fue miR491, el cual ha sido evaluado arduamente en cáncer; sin embargo, se le ha relacionado fuertemente con diversas vías profibrosantes incluida las vías de TGF-β/SMAD3/NF-κB y Wnt3a/β-catenina (123,124).

Por otra parte, la ausencia de la lámina A, la proteína blanco de *Zmpste24*, ha sido fuertemente asociada con la regulación negativa de componentes de la matriz extracelular en células pulmonares adultas, pero no embrionarias de ratón (125). Entre eso, distintas MMP's que tienen como blanco componentes de la matriz extracelular han sido encontradas desreguladas en la fibrosis pulmonar además de que fuerte evidencia muestra que juegan un papel central en la remodelación tisular (126) por lo que tienen una regulación rigurosa a múltiples niveles, que van desde la regulación transcripcional mediada por factores de crecimiento hasta la regulación post-transcripcional ejercida por miRNAs (127). En el pulmón del ratón viejo *Zmpste24*^{-/-} aumentó la

expresión de *miR145a* mientras sus blancos predichos *Mmp12* y *Mmp19* se encontraron disminuidos en respuesta al daño por bleomicina.

Seguramente, otros mecanismos además de la desregulación de miRNAs y sus blancos están contribuyendo a proteger a los ratones *Zmpste24*^{-/-} viejos del desarrollo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Por ejemplo, la actividad autofágica se activa tras la acumulación de macromoléculas dañadas, y se sabe que este proceso disminuye significativamente con la edad y está particularmente reducido en la fibrosis pulmonar. Mientras que el ratón deficiente de *Zmpste24* tiene una exacerbada actividad autofágica causada por la reducción de la actividad de mTOR (94).

En adición a lo anterior, recientemente se observó que cambios en la mecanotransducción mediados por la lámina A madura previene a estos ratones de daño en el epitelio alveolar secundario a hiperventilación debido a la ausencia de *Zmpste24* (128).

En este contexto, estos resultados sugieren que la ausencia de *Zmpste24* en el envejecimiento resulta en la alteración de la respuesta fibrótica pulmonar inducida por bleomicina mediada en parte por la desregulación de miRNAs antifibróticos y sus blancos.

Conclusiones.

- En condiciones basales, durante el envejecimiento natural en el pulmón del ratón viejo C57BL/6 se sobreexpresan genes de moléculas del matrisoma central así como moléculas asociadas al matrisoma.
- En el envejecimiento acelerado del pulmón del ratón deficiente de *Zmpste24* se encontraron disminuidos algunos genes del matrisoma central.

- Solo 19 genes diferencialmente expresados se comparten en los pulmones de los WT viejos y los *KO* viejos comparados contra sus respectivos jóvenes.
- En los ratones jóvenes WT y *KO* el desarrollo de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina fue similar, incluyendo la extensión del daño y el incremento de colágena.
- Los ratones WT viejos tratados con bleomicina tuvieron un incremento en el depósito de colágena comparado con los ratones tratados con solución salina.
- Los ratones *KO* viejos expuestos a bleomicina, no desarrollaron fibrosis pulmonar.
- En la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, en los ratones viejos *KO* a diferencia de los WT se sobreexpresaron miRNAs antifibróticos (miR23a, miR27a, miR29a/b, miR145a y miR491)
- La expresión de los genes blancos de miR27a (*Pparγ* y *Ssp1*), de miR29a/b (*Col1a1*, *Col3a1* y *Tgf-β1*) y de miR145a (*Mmp12*, *Mmp19* y *Timp1*) se encontraron disminuidos en los pulmones de los ratones viejos deficientes de *Zmpste24* comparados con su contraparte silvestre.

Literatura citada.

1. Suarez C, Dintzis S, Frevert C. Comparative Anatomy and Histology. Academic Press.2012:121-134.
2. Faner R, Rojas M, Macnee W, Agustí A. Abnormal lung aging in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2012;186:306–313.

3. Selman M, Rojas M, Mora AL, Pardo A. Aging and interstitial lung diseases: unraveling an old forgotten player in the pathogenesis of lung fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2010; 31:607–617.
4. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013;153 :1194–1217
5. Janssens JP, Pache JC, Nicod LP. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur. Respir. J.* 1999, 13, 197–205
6. Meiners S, Eickelberg O, Konigshoff M. Hallmarks of the ageing lung. *Eur Respir J,* 2015,45: 807-827
7. Torres-González E, Bueno M, Tanaka A, Krug LT, Cheng DS, Polosukhin VV, Sorescu D, Lawson WE, Blackwell TS, Rojas M, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in age-related susceptibility to lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012; 46:748–756.
8. Sueblinvong V, Neujahr DC, Mills ST, Roser-Page S, Ritzenthaler JD, Guidot D, Rojas M, Roman J. Predisposition for disrepair in the aged lung. *Am J Med Sci.* 2012; 344:41–51.
9. Calabresi C, Arosio B, Galimberti L, Scanziani E, Bergottini R, Annoni G, Vergani C. Natural aging, expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in rat lung. *Exp. Gerontol.* 2007, 42, 1003–1011.
10. Ley B; Collard H. Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin. Epidemiol.* 2013, 5: 483–492.
11. Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford W, Oster G. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 174: 810–816.
12. Selman M, Pardo A. The Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis. In Fishman’s *Pulmonary Diseases and Disorders*, 4th edition, McGraw-Hill, New York, 2008 pp. 371-383

13. Selman M, Pardo A. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. An integral model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014; 189:1161–72.
14. Liu Y-M, Nepali K, Liou J-P. Idiopathic pulmonary fibrosis: current status, recent progress, and emerging targets. *J Med Chem*. 2017; 60:527–53.
15. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE Jr, Lynch DA, Nicholson AG, Ryerson CJ, Ryu JH, Selman M, Wells AU, Behr J, Bouros D, Brown KK, Colby TV, Collard HR, Cordeiro CR, Cottin V, Crestani B, Drent M, Dudden RF, Egan J, Flaherty K, Hogaboam C, Inoue Y, Johkoh T, Kim DS, Kitaichi M, Loyd J, Martinez FJ, Myers J, Protzko S, Raghu G, Richeldi L, Sverzellati N, Swigris J, Valeyre D; ATS/ERS Committee on Idiopathic Interstitial Pneumonias. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013; 188:733-748
16. Betensley A, Sharif R, Karamichos D A systematic review of the role of dysfunctional wound healing in the pathogenesis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Med*. 2016; 6:2.
17. Selman Moisés and Pardo Annie. Role of Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: From Innocent Targets to Serial Killers. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2006; 3: 364-72.
18. Bloom DE, Shannon S. The demographic of aging. In: *Molecular Aspects of Aging: Understanding Lung Aging*. Rojas M, Meiners S, Le Saux CJ, eds. Hoboken, New Jersey, USA: Wiley-Blackwell; 2014:1–12

19. Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat. Med.* 2006; 12: 1133-1138
20. Tsai PC, Spector TD, Bell JT. Using epigenome-wide association scans of DNA methylation in age-related complex human traits. *Epigenomics.* 2012;4(5):511–526
21. Bell JT, Tsai PC, Yang TP, Pidsley R, Nisbet J, Glass D, Mangino M, Zhai G, Zhang F, Valdes A, Shin SY, Dempster EL, Murray RM, Grundberg E, Hedman AK, Nica A, Small KS; MuTHER Consortium, Dermitzakis ET, McCarthy MI, Mill J, Spector TD, Deloukas P. Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population. *PLoS Genet.* 2012;8(4):e1002629
22. Bell JT, Tsai PC, Yang TP, Pidsley R, Nisbet J, Glass D, Mangino M, Zhai G, Zhang F, Valdes A, Shin SY, Dempster EL, Murray RM, Grundberg E, Hedman AK, Nica A, Small KS; MuTHER Consortium, Dermitzakis ET, McCarthy MI, Mill J, Spector TD, Deloukas P. Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population. *PLoS Genet.* 2012;8(4): e1002629
23. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* 2013; 75: 685–705
24. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 2003; 22:4212–22.
25. Passos J, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor C, Miwa S, Olijslagers S, Hallinan J, Wipat A, Saretzki G, Rudolph K, Kirkwood T, von Zglinicki T. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol.* 2010; 6:347.

26. Baker D, Childs B, Durik M, Wijers M, Sieben C, Zhong J, Saltness R, Jeganathan K, Verzosa G, Pezeshki A, Khazaie K, Miller J, van Deursen J. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*. 2016;530:184-189.
27. Burd C, Sorrentino J, Clark K, Darr D, Krishnamurthy J, Deal A, Bardeesy N, Castrillon D, Beach D, Sharpless N. Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16(INK4a)-luciferase model. *Cell*. 2013;152:340-351.
28. Weichhart T. mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology*. 2017;64(2):127-134.
29. Chen H., McCaffery J.M., and Chan D.C. 2007. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*. 130:548–562
30. Copley SJ, Wells AU, Hawtin KE, Gibson DJ, Hodson JM, Jacques AE, Hansell DM. Lung morphology in the elderly: comparative CT study of subjects over 75 years old versus those under 55 years old. *Radiology*. 2009;251(2):566–573.
31. Kovacs EJ, Boe DM, Boule LA, Curtis BJ. Inflammaging and the Lung. *Clin Geriatr Med*. 2017;33(4):459-471
32. Bueno M, Lai YC, Romero Y, Brands J, St Croix CM, Kamga C, Corey C, Herazo-Maya JD, Sembrat J, Lee JS, Duncan SR, Rojas M, Shiva S, Chu CT, and Mora AL. PINK1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes lung fibrosis. *J Clin Invest*. 2015;125(2):521–538
33. Braidy N, Guillemin GJ, Mansour H, Chan-Ling T, Poljak A, Grant R. Age related changes in NAD⁺ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *PLoS One*. 2011;6(4):e19194
34. Sosulski ML, Gongora R, Danchuk S, Dong C, Luo F, Sanchez CG. Deregulation of selective autophagy during aging and pulmonary fibrosis: the role of TGFβ1. *Aging Cell*. 2015;14(5):774–783

35. Romero Y, Bueno M, Ramirez R, Álvarez D, Sembrat JC, Goncharova EA, Rojas M, Selman M, Mora AL, and Pardo A. mTORC1 activation decreases autophagy in aging and idiopathic pulmonary fibrosis and contribute to apoptosis resistance in IPF fibroblasts. *Aging Cell*.2016; 15: 1103-1112
36. Thannickal VJ. Mechanistic links between aging and lung fibrosis. *Biogerontology*. 2013;14:609-615
37. Xu J, Gonzalez ET, Iyer SS, Mac V, Mora AL, Sutliff RL, Reed A, Brigham KL, Kelly P, Rojas M. Use of senescence-accelerated mouse model in bleomycin-induced lung injury suggests that bone marrow-derived cells can alter the outcome of lung injury in aged mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2009; 64:731-739.
38. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 482–496.
39. Campisi J. Cell biology: The beginning of the end. *Nature*. 2013;505:35-36.
40. Lehmann M, Korfei M, Mutze K, et al. Senolytic drugs target alveolar epithelial cell function and attenuate experimental lung fibrosis ex vivo. *Eur Respir J* 2017; 50: 1602367
41. Melanie Königshoff, Nisha Balsara, Eva-Maria Pfaff, Monika Kramer, Izabella Chrobak, Werner Seeger, Oliver Eickelberg Functional Wnt Signaling Is Increased in Idiopathic Pulmonary Fibrosis
42. Yang IV, Schwartz DA. Epigenetics of idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Res*. 2014;165(1):48-60
43. Almeida M, Reis R, Calin G. MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2011;717:1-8
44. Lee R, Feinbaum R, Ambros V. A short history of a short RNA. *Cell*.2002; 116:S89-S92

45. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. From repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*.2007; 318:1931-1934
46. Horvitz HR, Sulston JE. Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*.1980;96:435–54
47. Lee R, Feinbaum R, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75:843-854
48. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*.*Cell*. 1993; 75:855-862
49. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* (2004) 432:231–5.
50. Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, Liu Q, et al. . ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol*.2010; 17:17–23.
51. Bartel D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*.2009; 136, 215–233
52. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*.2003;115:209–16.
53. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15:509–24
54. O'Brien Jacob, Hayder Heyam, Zayed Yara, Peng Chun. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*.2018;9:402.
55. Xie M, Li M, Vilborg A, Lee N, Shu MD, Yartseva V, et al. Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell*.2013;155:1568–80.

56. Makarova JA, Shkurnikov MU, Wicklein D, Lange T, Samatov TR, Turchinovich AA, et al. Intracellular and extracellular microRNA: an update on localization and biological role. *Prog Histochem Cytochem.* 2016; 51:33–49
57. Selman M, López-Otín C and Pardo A. Age-driven developmental drift in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2016; 48: 538-552.
58. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics.* 2012;44:237-44.
59. Montgomery RL, Yu G, Latimer PA, et al. MicroRNA mimicry blocks pulmonary fibrosis. *EMBO Mol Med.* 2014;6:1347-56.
60. Calin GA, Croce CM. Chromosomal rearrangements and microRNAs: a new cancer link with clinical implications. *J Clin Invest.* 2007;117:2059-66.
61. Cushing L, Kuang PP, Qian J, Shao F, Wu J, Little F, Thannickal VJ, Cardoso WV, and Lü J. miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45:287–294.
62. Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C, Luedde T. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology.* 2011;53:209-218
63. Selman S, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolution hypothesis about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001.134:136-51
64. Pardo A and Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.*2002.34:1534-1538

65. Pardo A and Selman M. Matrix Metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am thorac Soc.*2006.3:383-388
66. Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson S, Wilson K, Aziz N, Kaminski N y Zlotnik A. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med.*2006.173:188-198
67. Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci.* 2016;152:244-248
68. Carrero D, Soria-Valles C, López-Otín C. Hallmarks of progeroid syndromes: lessons from mice and reprogrammed cells. *Dis Model Mech.* 2016;9:719-35.
69. Barnhoorn S, Uittenboogaard L, Jaarsma D, Vermeij W, Tresini M, Weymaere M, Menoni H, Brandt R, de Waard M, Botter S, Sarker A, Jaspers N, van der Horst G, Cooper P, Hoeijmakers J, van der Pluijm I. Cell-autonomous progeroid changes in conditional mouse models for repair endonuclease XPG deficiency. *PLoS Genet.*2014; 10, e1004686
70. Garrod R, Marshall J, Barley E, Jones PW. Predictors of succes and failure in pulmonary rehabilitation. *Eur Respir J.*2006.4:788-794.
71. Pendás AM¹, Zhou Z, Cadiñanos J, Freije JM, Wang J, Hultenby K, Astudillo A, Wernerson A, Rodríguez F, Tryggvason K, López-Otín C. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in *Zmpste24* metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet.* 2002;31(1):94-99
72. Osorio FG, Obaya AJ, López-Otín C, Freije JM. Accelerated ageing: from mechanism to therapy through animal models. *Transgenic Res.* 2009; 18:7-15.
73. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.*1995; 11:376–381.

74. Candelario J, Borrego S, Reddy S, Comai L. Accumulation of distinct prelamin A variants in human diploid fibroblasts differentially affects cell homeostasis. *Exp Cell Res.* 2011;317:319–329.
75. Skoczyńska A, Budzisz E, Dana A, Rotsztejn H. New look at the role of progerin in skin aging. *Prz Menopauzalny.* 2015;14:53-58
76. Gerace L, Huber MD. Nuclear lamina at the crossroads of the cytoplasm and nucleus. *Journal of Structural Biology.* 2012;177 (1):24-3
77. Fichtman B, Ramos C, Rasala B, Harel A, Forbes DJ. Inner/Outer Nuclear Membrane Fusion in Nuclear Pore Assembly: Biochemical Demonstration and Molecular Analysis. Weis K, ed. *Molecular Biology of the Cell.* 2010;21(23):4197-4211
78. Lin F, Worman HJ. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem,*1993, 268: 16321–16326
79. Hoger T.H., Zatloukal K., Waizenegger I., Krohne G. Characterization of a second highly conserved B-type lamin present in cells previously thought to contain only a single B-type lamin. *Chromosoma.* 1990;99:379–390
80. Worman HJ, Yuan J, Blobel G, and Georgatos SD. A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad.Sci. U. S. A.*1998; 85, 8531– 8534
81. Constantinescu D, Gray HL, Sammak PJ, Schatten GP, Csoka AB. Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells.*2006; 24: 177–185
82. Furukawa K, Inagaki H, Hotta Y. Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. *Exp Cell Res.* 1994;212(2):426-30
83. Trigueros-Motos L, Gonzalez JM, Rivera J and Andres V. Hutchinson-Gilford progeria syndrome, cardiovascular disease and oxidative stress. *Front Biosci (Schol Ed).* 3:1285-1297

84. Corrigan DP, Kuszczak D, Rusinol AE, Thewke DP, Hrycyna CA, Michaelis S, Sinensky MS. Prelamin A endoproteolytic processing in vitro by recombinant Zmpste24. *Biochem J*,2005, 387: 129–138
85. Lutz RJ, Trujillo MA, Denham KS, Wenger L, Sinensky M. Nucleoplasmic localization of prelamin A: Implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina. *Proc Natl Acad Sci*.1992; 89: 3000–3004
86. Liu B, Wang J, Chan KM, Tjia WM, Deng W, Guan X, Huang JD, Li KM, Chau PY, Chen DJ, et al. Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med*.2005; 11: 780–785
87. Jung H. J., Coffinier C., Choe Y., Beigneux A. P., Davies B. S., Yang S. H., Barnes R. H. 2nd., Hong J., Sun T., Pleasure S. J., Young S. G., Fong L. G. Regulation of prelamin A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*2012
88. Navarro CL1, Cau P, Lévy N. Molecular bases of progeroid syndromes. *Hum Mol Genet*. 2006;15(2): R151-61
89. De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M, and Levy N.Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* .2006,300 : 2055
90. Hennekam RC.Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet A*. 2006;140:2603-2624
91. Constantinescu D, Gray HL, Sammak PJ, Schatten GP, and Csoka A. B. Lamin A/C Expression Is a Marker of Mouse and Human Embryonic Stem Cell Differentiation. *STEM CELLS*,2006; 24: 177–185
92. Cerdà-Costa N, Gomis-Rüth FX. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. *Protein Sci*. 2013;23(2):123-44.

93. Varela I, Cadinanos J, Pendas A, Gutierrez-Fernandez A, Folgueras A, Sanchez L, Zhou Z.; Rodriguez F, Stewart C, Vega J, Tryggvason K, Freije J, and Lopez-Otin C. Accelerated ageing in mice deficient in zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature*. 2005, 437: 56564–56810
94. Mariño G, Ugalde A, Salvador-Montoliu N, Varela I, Quirós P, Cadiñanos J, I van der Pluijm I, Freije J and López-Otín C. Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction. *Hum. Mol. Genet.*2008;17 (14): 2196-2211
95. Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y. New antibiotics, Bleomycin A and B. *Cancer*.1966;19:201-209
96. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis?. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;40(3):362-82.
97. Adamson I Y. Pulmonary toxicity of bleomycin. *Environ Health Perspect.*1976;16:119–125
98. Umezawa H, Ishizuka M, Hori S, Chimura H, Takeuchi T, Komai T. The distribution of 3H-bleomycin in mouse tissue. *J Antibiot.*1968; 21:638-649
99. Lazo JS, Pham ET. Pulmonary fate of [3H] bleomycin A2 in mice.*J Pharmacol Exp Ther.*1984;228: 13-18
100. Umezawa H, Hori S, Sawa T, Yoshioka T, Takauchi T. A bleomycin inactivating enzyme in mouse live. *J Antibiot.*1974;27:419-424
101. Burger R M, Peisach J, and Horwitz S B. Activated bleomycin. A transient complex of drug, iron, and oxygen that degrades DNA. *J Biol Chem.*1981;256:11636–11644
102. Sikic BI. Biochemical and cellular determinants of bleomycin cytotoxicity.*Cancer Surv.*1986;5: 81–91

103. Lee VY, Schroedl C, Brunelle JK, Buccellato LJ, Akinci OI, Kaneto H, Snyder C, Eisenbart J, Budinger GR, Chandel NS. Bleomycin induces alveolar epithelial cell death through JNK-dependent activation of the mitochondrial death pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;289: L521–L528
104. Wallach-Dayana SB, Izbicki G, Cohen PY, Gerstl-Golan R, Fine A, Breuer R. Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290:L790–L796
105. Adamson I Y, and Bowden D H. The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol*. 1974;77:185–197
106. Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*. 2000;29:52-54.
107. Cabrera S, Maciel M, Herrera I, Nava T, Vergara F, Gaxiola M, López-Otín C, Selman M, and Pardo A. Essential role for the ATG4B protease and autophagy in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Autophagy*. 2015, 11:670–684.
108. Pardo A, Ruiz V, Arreola JL, Ramírez R, Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Barrios R, Kala SV, Lieberman MW, Selman M. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:925-932.
109. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, Pardo A. Timp -1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing non degradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000,279:l652-l574.
110. Hynes RO, Naba A. Overview of the Matrisome-An Inventory of Extracellular Matrix. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012; 4:1-15.

111. Hecker L, Logsdon NJ, Kurundkar D, Kurundkar A, Bernard K, Hock T, Meldrum E, Sanders YY, Thannickal VJ. Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance. *Sci Transl Med*. 2014; 6:231-247.
112. King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2011; 378:1949-1961
113. Naikawadi RP, Disayabutr S, Mallavia B, Donne ML, Green G, La JL, Rock JR, Looney MR, Wolters PJ. Telomere dysfunction in alveolar epithelial cells causes lung remodeling and fibrosis. *JCI Insight*. 2016; 1:e86704
114. Ugalde AP, Ramsay AJ, de la Rosa J, Varela I, Mariño G, Cadiñanos J, Lu J, Freige J, López-Otín C. Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53. *The EMBO J*. 2011; 30:2219-2232.
115. 114.Lee B, Burić I, George-Pandeth A, Flurkey K, Harrison D, Yuan R, Peters L, Kuchel G, Melzer D, Harries, L. MicroRNAs miR-203-3p, miR-664-3p and miR-708-5p are associated with median strain lifespan in mice. *Sci Rep*. 2017;7:44620.
116. Moore B, Lawson WE, Oury TD, Sisson TH, Raghavendran K, Hogaboam CM. Animal models of fibrotic lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013; 49:167-179.
117. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becerril C, Yousem S, Herrera I, Ruiz V, Selman M, Kaminski N. Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med*. 2005; 2:e251
118. Berman JS, Serlin D, Li X, Whitley G, Hayes J, Rishikof DC, Ricupero DA, Liaw L, Goetschkes M, O'Regan AW. Altered bleomycin-induced lung fibrosis in osteopontin-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004; 286:1311-1318.
119. García-Prieto E, González-López A, Cabrera S, Astudillo A, Gutiérrez-Fernández A, Fanjul-Fernandez M, et al. Resistance to bleomycin-induced lung fibrosis in MMP-8 deficient mice is mediated by interleukin-10. *PLoS ONE*. 2010;5, e13242

120. Guo J, Lin Q, Shao Y, Rong L, Zhang D. miR-29b promotes skin wound healing and reduces excessive scar formation by inhibition of the TGF- β 1/Smad/CTGF signaling pathway. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017;95:437-442.
121. Xiao J, Meng XM, Huang XR, Chung AC, Feng YL, Hui DS, Yu CM, Sung JJ, Lan HY. miR-29 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Mol Ther.* 2012; 20:1251-1260.
122. Cui H, Banerjee S, Xie N, Ge J, Liu RM, Matalon S, Thannickal VJ, Liu G. MicroRNA-27a-3p Is a Negative Regulator of Lung Fibrosis by Targeting Myofibroblast Differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016; 54:843-852.
123. Jiang F, Wang X, Liu Q, Shen J, Li Z, Li Y, Zhang J. Inhibition of TGF- β /SMAD3/NF- κ B signaling by microRNA-491 is involved in arsenic trioxide-induced anti-angiogenesis in hepatocellular carcinoma cells. *Toxicol Lett.* 2014; 231:55-61.
124. Sun R, Liu Z, Tong D, Yang Y, Guo B, Wang X, Zhao L, Huang C. miR-491-5p, mediated by Foxi1, functions as a tumor suppressor by targeting Wnt3a/ β -catenin signaling in the development of gastric cancer. *Cell Death Dis.* 2017; 8:e2714.
125. Kind J, van Steensel B. Genome-nuclear lamina interactions and gene regulation. *Curr Opin. Cell Biol.*, 2010;22:320-325
126. Pardo A, Selman M and Kaminski N. Approching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.*2008.40:1141-1155
127. Gaffney J, Solomonov I, Zehorai E, Sagi I. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix Biol.* 2015;44–46:191–9.
128. López-Alonso I, Blázquez-Prieto J, Amado-Rodríguez L, González-López A, Astudillo A, Sánchez M, Huidobro C, López-Martínez C, Dos Santos CC, Albaiceta GM.

Preventing loss of mechanosensation by the nuclear membranes of alveolar cells reduces lung injury in mice during mechanical ventilation. *Sci Transl Med.*2018;10: eaam7598

TABLA 2: Top 50 de genes sobreexpresados y disminuidos en el pulmón de ratones WT viejos comparados con su joven.

SYMBOL	GENENAME	logFC
Spp1	secreted phosphoprotein 1	3.30
Gpnmb	glycoprotein (transmembrane) nmb	3.30
Saa3	serum amyloid A 3	3.20
Tnc	tenascin C	3.20
Mmp12	matrix metalloproteinase 12	3.20
Sprr1a	small proline-rich protein 1A	3.00
C3ar1	complement component 3a receptor 1	2.90
Clec4n	C-type lectin domain family 4, member n	2.80
Arg1	arginase, liver	2.80
C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	2.70
Ifi204	interferon activated gene 204	2.70
Msr1	macrophage scavenger receptor 1	2.70
Timp1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	2.60
Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5	2.60
Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9	2.50
Cd177	CD177 antigen	2.50

Ms4a7	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7	2.50
Tlr13	toll-like receptor 13	2.40
Chl1	cell adhesion molecule L1-like	2.40
Clec7a	C-type lectin domain family 7, member a	2.40
Trem2	triggering receptor expressed on myeloid cells 2	2.40
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	2.40
Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I	2.30
Rnu3a	U3A small nuclear RNA	2.30
Snord93	small nucleolar RNA, C/D box 93	2.30
Ms4a6d	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6D	2.20
Clec5a	C-type lectin domain family 5, member a	2.20
Ch25h	cholesterol 25-hydroxylase	2.20
Ms4a14	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 14	2.20
Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	2.10
Mmp8	matrix metalloproteinase 8	2.10
Itgam	integrin alpha M	2.10
Itgam	integrin alpha M	2.10
Snora64	small nucleolar RNA, H/ACA box 64	2.10
Tnip3	TNFAIP3 interacting protein 3	2.10
Cd68	CD68 antigen	2.10
C1qa	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	2.10
C1qc	complement component 1, q subcomponent, C chain	2.00
Ccr1	chemokine (C-C motif) receptor 1	2.00
Fcgr4	Fc receptor, IgG, low affinity IV	2.00

n-R5s136	nuclear encoded rRNA 5S 136	2.00
Mmp13	matrix metalloproteinase 13	2.00
Pla2g7	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	2.00
Cxcl13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	2.00
Ctsk	cathepsin K	2.00
Wfdc17	WAP four-disulfide core domain 17	2.00
Cemip	cell migration inducing protein, hyaluronan binding	2.00
Marco	macrophage receptor with collagenous structure	2.00
Tgfb1	transforming growth factor, beta induced	2.00
Sfn9	schlafen 9	1.90
Hamp	hepcidin antimicrobial peptide	-3.9
Car3	carbonic anhydrase 3	-2.6
Chad	chondroadherin	-2.4
Igk	immunoglobulin kappa chain complex	-2
Cyp1a1	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	-1.7
Myoz2	myozenin 2	-1.7
Sln	sarcolipin	-1.7
Actc1	actin, alpha, cardiac muscle 1	-1.7
Muc5b	mucin 5, subtype B, tracheobronchial	-1.6
Igfbp3	insulin-like growth factor binding protein 3	-1.6
Glp1r	glucagon-like peptide 1 receptor	-1.6
Hhip	Hedgehog-interacting protein	-1.6

Ednrb	endothelin receptor type B	-1.6
Aox3	aldehyde oxidase 3	-1.6
Myh6	myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha	-1.6
Nr1d1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	-1.5
Fendrr	Foxf1 adjacent non-coding developmental regulatory RNA	-1.5
Bpifb1	BPI fold containing family B, member 1	-1.5
Abi3bp	ABI gene family, member 3 (NESH) binding protein	-1.5
Lncppara	long noncoding RNA near Ppara	-1.5
Mirlet7c-2	microRNA let7c-2	-1.5
Fmo1	flavin containing monooxygenase 1	-1.5
Tff2	trefoil factor 2 (spasmolytic protein 1)	-1.4
Clec12b	C-type lectin domain family 12, member B	-1.4
Ecm2	extracellular matrix protein 2, female organ and adipocyte specific	-1.4
Lypd2	Ly6/Plaur domain containing 2	-1.4
Myl7	myosin, light polypeptide 7, regulatory	-1.4
Tnnt2	troponin T2, cardiac	-1.4
Rmdn2	regulator of microtubule dynamics 2	-1.4
Fibin	fin bud initiation factor homolog (zebrafish)	-1.3
Slc7a10	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, γ^+ system), member 10	-1.3
Ccdc129	coiled-coil domain containing 129	-1.3
Hspa1a	heat shock protein 1A	-1.3
Ighv1-84	immunoglobulin heavy variable 1-84	-1.3
Klf12	Kruppel-like factor 12	-1.3

Adra1a	adrenergic receptor, alpha 1a	-1.3
Slc5a12	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 12	-1.3
Adcy8	adenylate cyclase 8	-1.3
Pdzd2	PDZ domain containing 2	-1.3
Slc4a5	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 5	-1.3
Mir297a-2	microRNA 297a-2	-1.3
Acss1	acyl-CoA synthetase short-chain family member 1	-1.3
Pln	phospholamban	-1.2
Colgalt2	collagen beta(1-O)galactosyltransferase 2	-1.2
Ltbp4	latent transforming growth factor beta binding protein 4	-1.2
Ltbp4	latent transforming growth factor beta binding protein 4	-1.2
Gnao1	guanine nucleotide binding protein, alpha O	-1.2
Mir181b-1	microRNA 181b-1	-1.2
Tbx3os1	T-box 3, opposite strand 1	-1.2
Mir200b	microRNA 200b	-1.2

TABLA 3: Top 50 de genes sobreexpresados y disminuidos en el pulmón de ratones viejos deficientes de *Zmpste24* comparados con su joven.

SYMBOL	GENENAME	logFC
Jchain	immunoglobulin joining chain	5.60
Asb2	ankyrin repeat and SOCS box-containing 2	4.90
Igk	immunoglobulin kappa chain complex	4.40
Fancd2os	Fancd2 opposite strand	4.00

Tnpo3	transportin 3	3.60
Cxcl13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	2.50
Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	2.40
Serpina3f	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3F	1.90
Serpina3g	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G	1.90
Igtp	interferon gamma induced GTPase	1.70
Trav12-2	T cell receptor alpha variable 12-2	1.60
Trav14-1	T cell receptor alpha variable 14-1	1.60
H2-M2	histocompatibility 2, M region locus 2	1.60
Iigp1	interferon inducible GTPase 1	1.50
Spp1	secreted phosphoprotein 1	1.40
Cd274	CD274 antigen	1.30
Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	1.30
Gbp2	guanylate binding protein 2	1.30
Sp140	Sp140 nuclear body protein	1.20
Gbp5	guanylate binding protein 5	1.20
Il7r	interleukin 7 receptor	1.10
Irgm2	immunity-related GTPase family M member 2	1.10
BC051142	cDNA sequence BC051142	1.10
Nlrc5	NLR family, CARD domain containing 5	1.10
Gvin1	GTPase, very large interferon inducible 1	1.10
Gvin1	GTPase, very large interferon inducible 1	1.10
Gm4070	predicted gene 4070	1.10
Cxcr6	chemokine (C-X-C motif) receptor 6	1.10

Gvin1	GTPase, very large interferon inducible 1	1.10
Stat4	signal transducer and activator of transcription 4	1.10
Xdh	xanthine dehydrogenase	1.00
Gbp6	guanylate binding protein 6	1.00
Ikzf3	IKAROS family zinc finger 3	1.00
Tnpo3	transportin 3	1.00
H2-Q4	histocompatibility 2, Q region locus 4	1.00
Zc3h6	zinc finger CCCH type containing 6	1.00
Il2rb	interleukin 2 receptor, beta chain	1.00
Krt4	keratin 4	-4.9
Krt13	keratin 13	-3.4
Sprr3	small proline-rich protein 3	-3.1
Myh1	myosin, heavy polypeptide 1, skeletal muscle, adult	-3
Krtdap	keratinocyte differentiation associated protein	-3
Cnfn	cornifelin	-2.9
Acta1	actin, alpha 1, skeletal muscle	-2.9
Serpib3a	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3A	-2.7
Mir664	microRNA 664	-2.3
Snora36b	small nucleolar RNA, H/ACA box 36B	-2.3
Sprr1a	small proline-rich protein 1A	-2.3
Aspn	asporin	-2.3
Gypa	glycophorin A	-2.2
Lor	loricrin	-2.2

H19	H19, imprinted maternally expressed transcript	-2.2
Mir675	microRNA 675	-2.2
Rptn	repetin	-2
Asprv1	aspartic peptidase, retroviral-like 1	-1.9
Nrep	neuronal regeneration related protein	-1.9
Car3	carbonic anhydrase 3	-1.9
Ndnf	neuron-derived neurotrophic factor	-1.8
Defb4	defensin beta 4	-1.8
Col3a1	collagen, type III, alpha 1	-1.8
AF357425	snoRNA AF357425	-1.7
Ckm	creatine kinase, muscle	-1.7
Rgs5	regulator of G-protein signaling 5	-1.7
Mest	mesoderm specific transcript	-1.7
Eln	elastin	-1.7
AF357426	snoRNA AF357426	-1.6
Scarna10	small Cajal body-specific RNA 10	-1.6
Rian	RNA imprinted and accumulated in nucleus	-1.6
Lum	lumican	-1.6
Mylpf	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle	-1.6
Myot	myotilin	-1.5
Myh8	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal	-1.5
Ppic	peptidylprolyl isomerase C	-1.5
Rian	RNA imprinted and accumulated in nucleus	-1.5
Kdelr3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3	-1.5

Pygm	muscle glycogen phosphorylase	-1.5
Pygm	muscle glycogen phosphorylase	-1.5
Apobec2	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 2	-1.5
Neb	nebulin	-1.5
Myoz1	myozenin 1	-1.5
Phex	phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked	-1.5
Serpinh1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade H, member 1	-1.4
Adamts9	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 9	-1.4
Mfap4	microfibrillar-associated protein 4	-1.4
Krt5	keratin 5	-1.4
Alox12b	arachidonate 12-lipoxygenase, 12R type	-1.4
AF357355	snoRNA AF357355	-1.4

TABLA 4: Top 100 de genes sobreexpresados y disminuidos en el pulmón de ratones viejos deficientes de *Zmpste24* 21 días posteriores al daño con bleomicina, comparados contra su respectivo WT.

SYMBOL	GENENAME	logFC
Hamp	hepcidin antimicrobial peptide	3.87
Tat	tyrosine aminotransferase	2.67
Omd	osteomodulin	2.44
Peg3	paternally expressed 3	2.43
Nr4a1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	2.26

Galnt15	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 15	2.25
Sult1d1	sulfotransferase family 1D, member 1	2.24
Doc2b	double C2, beta	2.16
Bex4	brain expressed X-linked 4	2.12
Egr1	early growth response 1	2.06
Tbx3os1	T-box 3, opposite strand 1	1.96
Tas2r135	taste receptor, type 2, member 135	1.94
Fibin	fin bud initiation factor homolog (zebrafish)	1.91
Gria1	glutamate receptor, ionotropic, AMPA1 (alpha 1)	1.89
Car3	carbonic anhydrase 3	1.89
Bpifa1	BPI fold containing family A, member 1	1.88
Akr1c14	aldo-keto reductase family 1, member C14	1.86
Snord70	small nucleolar RNA, C/D box 70	1.83
Tecrl	trans-2,3-enoyl-CoA reductase-like	1.83
Fgfbp1	fibroblast growth factor binding protein 1	1.82
Olf920	olfactory receptor 920	1.82
Stfa1	stefin A1	1.80
Rhoj	ras homolog family member J	1.76
Dcn	decorin	1.73
Cyp2d22	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 22	1.71
Sesn1	sestrin 1	1.66
Myliip	myosin regulatory light chain interacting protein	1.66
Igfbp3	insulin-like growth factor binding protein 3	1.62

Ms4a4d	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4D	1.61
Coro6	coronin 6	1.60
Ednrb	endothelin receptor type B	1.60
Igfbp6	insulin-like growth factor binding protein 6	1.55
Fmo1	flavin containing monooxygenase 1	1.55
Stfa2l1	stefin A2 like 1	1.53
Cyp2e1	cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	1.53
Peg3os	Peg3 opposite strand	1.53
Slc10a6	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 6	1.51
Mir145a	microRNA 145a	1.51
Ifi208	interferon activated gene 208	1.50
Il1b	interleukin 1 beta	1.47
Tas2r143	taste receptor, type 2, member 143	1.46
Aldh6a1	aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1	1.46
Glb1l2	galactosidase, beta 1-like 2	1.46
Apod	apolipoprotein D	1.45
Sh3d21	SH3 domain containing 21	1.44
Rasgef1b	RasGEF domain family, member 1B	1.44
Rasgef1b	RasGEF domain family, member 1B	1.44
Tnik	TRAF2 and NCK interacting kinase	1.43
Bex4	brain expressed X-linked 4	1.41
Cyp3a13	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13	1.40
Nox4	NADPH oxidase 4	1.40
Bcas3os1	breast carcinoma amplified sequence 3, opposite strand 1	1.40

Gabre	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit epsilon	1.38
Prkg2	protein kinase, cGMP-dependent, type II	1.37
Serpina7	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 7	1.36
Map3k6	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	1.35
Ndrp2	N-myc downstream regulated gene 2	1.33
Abca8a	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8a	1.32
Myl7	myosin, light polypeptide 7, regulatory	1.31
Frem1	Fras1 related extracellular matrix protein 1	1.30
Hif3a	hypoxia inducible factor 3, alpha subunit	1.29
Fkbp5	FK506 binding protein 5	1.27
Klf15	Kruppel-like factor 15	1.27
Pfkfb1	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1	1.27
Rorc	RAR-related orphan receptor gamma	1.26
Mettl7a3	methyltransferase like 7A3	1.25
Fmo2	flavin containing monooxygenase 2	1.25
Mir126a	microRNA 126a	1.24
Arrdc3	arrestin domain containing 3	1.24
Tgfbr3	transforming growth factor, beta receptor III	1.23
Snhg3	small nucleolar RNA host gene 3	1.22
Mir701	microRNA 701	1.22
Gulp1	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1	1.21
Olf1392	olfactory receptor 1392	1.21
Mir3061	microRNA 3061	1.21

Slc38a4	solute carrier family 38, member 4	1.21
Srp54c	signal recognition particle 54C	1.20
Cyt11	cytokine-like 1	1.20
Lmcd1	LIM and cysteine-rich domains 1	1.20
Tnnt2	troponin T2, cardiac	1.20
Spry4	sprouty homolog 4 (Drosophila)	1.19
Cyp1a1	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	1.19
Snord82	small nucleolar RNA, C/D box 82	1.19
Tipin	timeless interacting protein	1.19
Sumo3	small ubiquitin-like modifier 3	1.18
Prdm5	PR domain containing 5	1.16
Atp6v0a4	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit A4	1.16
Neat1	nuclear paraspeckle assembly transcript 1 (non-protein coding)	1.16
Mir27a	microRNA 27a	1.16
Upk1a	uroplakin 1A	1.15
Snhg3	small nucleolar RNA host gene 3	1.15
Arxes2	adipocyte-related X-chromosome expressed sequence 2	1.15
Fgf7	fibroblast growth factor 7	1.15
Kyat3	kynurenine aminotransferase 3	1.14
Cxcl14	chemokine (C-X-C motif) ligand 14	1.14
Rad18	RAD18 E3 ubiquitin protein ligase	1.14
Cd46	CD46 antigen, complement regulatory protein	1.13
Tas2r126	taste receptor, type 2, member 126	1.13
Slc43a1	solute carrier family 43, member 1	1.13

Myrip	myosin VIIA and Rab interacting protein	1.13
Btg2	B cell translocation gene 2, anti-proliferative	1.13
Cfd	complement factor D (adipsin)	1.12
Tmod1	tropomodulin 1	1.11
Ppp2r3a	protein phosphatase 2, regulatory subunit B'', alpha	1.11
Gria3	glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3)	1.11
Amy1	amylase 1, salivary	1.11
Lamc3	laminin gamma 3	1.10
Sik1	salt inducible kinase 1	1.10
Mir103-2	microRNA 103-2	1.09
Pde9a	phosphodiesterase 9A	1.09
C1qtnf7	C1q and tumor necrosis factor related protein 7	1.08
Npr3	natriuretic peptide receptor 3	1.08
Ppp1r2	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2	1.07
Acss3	acyl-CoA synthetase short-chain family member 3	1.07
Mchr1	melanin-concentrating hormone receptor 1	1.07
Cnih2	cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 2	1.06
Pln	phospholamban	1.06
Nqo1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	1.06
Upk1b	uroplakin 1B	1.06
Dusp1	dual specificity phosphatase 1	1.06
Hsd11b1	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	1.06
Srp54a	signal recognition particle 54A	1.06
Srp54b	signal recognition particle 54B	1.06

Srp54c	signal recognition particle 54C	1.06
Abcg2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	1.05
Mir3066	microRNA 3066	1.05
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	1.05
Srp54a	signal recognition particle 54A	1.04
Srp54b	signal recognition particle 54B	1.04
Srp54c	signal recognition particle 54C	1.04
Fap	fibroblast activation protein	1.04
Akap7	A kinase (PRKA) anchor protein 7	1.04
Eppin	epididymal peptidase inhibitor	1.03
Glb1l3	galactosidase, beta 1 like 3	1.03
Agtr1a	angiotensin II receptor, type 1a	1.03
Ttc6	tetratricopeptide repeat domain 6	1.03
Il1r2	interleukin 1 receptor, type II	1.03
Inca1	inhibitor of CDK, cyclin A1 interacting protein 1	1.03
Lrtm2	leucine-rich repeats and transmembrane domains 2	1.02
Arrdc2	arrestin domain containing 2	1.02
Akap5	A kinase (PRKA) anchor protein 5	1.02
Aff3	AF4/FMR2 family, member 3	1.02
Ccdc152	coiled-coil domain containing 152	1.01
Nr4a2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	1.01
Slf1	SMC5-SMC6 complex localization factor 1	1.01
Dbt	dihydrolipoamide branched chain transacylase E2	1.01
Cnep1r1	CTD nuclear envelope phosphatase 1 regulatory subunit 1	1.00

Gdpd2	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 2	1.00
Usp54	ubiquitin specific peptidase 54	1.00
Aplnr	apelin receptor	1.00
Saa3	serum amyloid A 3	-4.35
Tnpo3	transportin 3	-4.01
Rnase2a	ribonuclease, RNase A family, 2A (liver, eosinophil-derived neurotoxin)	-3.84
Mmp12	matrix metalloproteinase 12	-3.72
Itgax	integrin alpha X	-2.95
Mid1	midline 1	-2.87
Ly6i	lymphocyte antigen 6 complex, locus I	-2.72
Awat1	acyl-CoA wax alcohol acyltransferase 1	-2.71
Zmpste24	zinc metalloproteinase, STE24	-2.65
Fancd2os	Fancd2 opposite strand	-2.62
Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	-2.62
Fancd2os	Fancd2 opposite strand	-2.58
Itih4	inter alpha-trypsin inhibitor, heavy chain 4	-2.48
Slc26a4	solute carrier family 26, member 4	-2.42
Ms4a7	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7	-2.42
H2-M2	histocompatibility 2, M region locus 2	-2.39
Olr1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	-2.30
H2-Ab1	histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	-2.29
Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9	-2.29

Olf111	olfactory receptor 111	-2.28
Lgals1	lectin, galactose binding, soluble 1	-2.27
Oas2	2'-5' oligoadenylate synthetase 2	-2.25
Clec4n	C-type lectin domain family 4, member n	-2.23
Il1a	interleukin 1 alpha	-2.21
Serpina3f	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3F	-2.18
Serpina3g	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G	-2.18
Marco	macrophage receptor with collagenous structure	-2.16
Gpnmb	glycoprotein (transmembrane) nmb	-2.16
Slamf7	SLAM family member 7	-2.16
Ctsk	cathepsin K	-2.15
Mir147	microRNA 147	-2.09
Top2a	topoisomerase (DNA) II alpha	-2.04
Fgg	fibrinogen gamma chain	-2.02
Mmp19	matrix metalloproteinase 19	-2.01
Ccl6	chemokine (C-C motif) ligand 6	-1.97
Arg1	arginase, liver	-1.97
Orm2	orosomucoid 2	-1.95
Erdr1	erythroid differentiation regulator 1	-1.95
Mki67	antigen identified by monoclonal antibody Ki 67	-1.95
Bcl2a1a	B cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a	-1.95
Bcl2a1b	B cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1b	-1.95
Bcl2a1d	B cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1d	-1.95
Ch25h	cholesterol 25-hydroxylase	-1.92

Ccl22	chemokine (C-C motif) ligand 22	-1.92
Pigr	polymeric immunoglobulin receptor	-1.91
Bcl2a1a	B cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a	-1.90
Bcl2a1b	B cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1b	-1.90
Cd72	CD72 antigen	-1.89
Hexa	hexosaminidase A	-1.89
Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5	-1.88
Ect2	ect2 oncogene	-1.86
Ccl17	chemokine (C-C motif) ligand 17	-1.85
Hist1h2ab	histone cluster 1, H2ab	-1.85
Scn3b	sodium channel, voltage-gated, type III, beta	-1.82
Slc6a20a	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 20A	-1.82
Pisd-ps3	phosphatidylserine decarboxylase, pseudogene 3	-1.82
Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	-1.79
Cfb	complement factor B	-1.79
H2-Eb1	histocompatibility 2, class II antigen E beta	-1.79
Cd74	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)	-1.79
Mir5107	microRNA 5107	-1.79
Nlrp1c-ps	NLR family, pyrin domain containing 1C, pseudogene	-1.79
Cybb	cytochrome b-245, beta polypeptide	-1.79
Il2rg	interleukin 2 receptor, gamma chain	-1.77
Orm1	orosomuroid 1	-1.77
Ccl12	chemokine (C-C motif) ligand 12	-1.77

Erdr1	erythroid differentiation regulator 1	-1.76
Ccl21a	chemokine (C-C motif) ligand 21A (serine)	-1.75
Ccl21b	chemokine (C-C motif) ligand 21B (leucine)	-1.75
Ccl21c	chemokine (C-C motif) ligand 21C (leucine)	-1.75
Atp6v0d2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit D2	-1.74
Spp1	secreted phosphoprotein 1	-1.74
Csf2rb2	colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity (granulocyte-macrophage)	-1.73
Rnase2b	ribonuclease, RNase A family, 2B (liver, eosinophil-derived neurotoxin)	-1.72
Thy1	thymus cell antigen 1, theta	-1.72
Timp1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	-1.71
Itgb2	integrin beta 2	-1.70
Il33	interleukin 33	-1.70
Lrp2	low density lipoprotein receptor-related protein 2	-1.68
Ccl21a	chemokine (C-C motif) ligand 21A (serine)	-1.68
Il1rn	interleukin 1 receptor antagonist	-1.68
Ctsd	cathepsin D	-1.68
Mcoln3	mucolipin 3	-1.66
Mmp13	matrix metalloproteinase 13	-1.66
Cxcr1	chemokine (C-X-C motif) receptor 1	-1.66
H2-DMb2	histocompatibility 2, class II, locus Mb2	-1.65
Ulbp1	UL16 binding protein 1	-1.65
Tmem252	transmembrane protein 252	-1.65
Adgre1	adhesion G protein-coupled receptor E1	-1.65

Cd200r1	CD200 receptor 1	-1.64
Col3a1	collagen, type III, alpha 1	-1.64
Tfec	transcription factor EC	-1.64
Lrp12	low density lipoprotein-related protein 12	-1.63
Cdk19	cyclin-dependent kinase 19	-1.63
F7	coagulation factor VII	-1.63
Trav14d-3-dv8	T cell receptor alpha variable 14D-3-DV8	-1.63
Trav6d-6	T cell receptor alpha variable 6D-6	-1.63
Trav7-4	T cell receptor alpha variable 7-4	-1.63
Trav9d-3	T cell receptor alpha variable 9D-3	-1.63
Trav9d-4	T cell receptor alpha variable 9D-4	-1.63
Saa4	serum amyloid A 4	-1.63
Serpinb1a	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a	-1.62
P2ry6	pyrimidinerbic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	-1.60
Trem2	triggering receptor expressed on myeloid cells 2	-1.59
Ctss	cathepsin S	-1.59
Hc	hemolytic complement	-1.58
Cd68	CD68 antigen	-1.58
Mir28c	microRNA 28c	-1.57
Fn1	fibronectin 1	-1.57
Slc7a11	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 11	-1.56
Mrc1	mannose receptor, C type 1	-1.54

Col1a1	collagen, type I, alpha 1	-1.54
Ly75	lymphocyte antigen 75	-1.53
Steap4	STEAP family member 4	-1.53
Kcnn3	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3	-1.53
Anpep	alanyl (membrane) aminopeptidase	-1.52
Rasgrp3	RAS, guanyl releasing protein 3	-1.52
Adgre4	adhesion G protein-coupled receptor E4	-1.51
Ms4a14	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 14	-1.50
Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	-1.50
Klk13	kallikrein related-peptidase 13	-1.49
Slc5a1	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1	-1.49
Ndc80	NDC80 kinetochore complex component	-1.49
Psap	prosaposin	-1.48
Acp5	acid phosphatase 5, tartrate resistant	-1.48
C3ar1	complement component 3a receptor 1	-1.48
Tmem173	transmembrane protein 173	-1.48
Cd200r4	CD200 receptor 4	-1.47
Hist1h2af	histone cluster 1, H2af	-1.47
Cyth4	cytohesin 4	-1.47
Ms4a6d	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6D	-1.47
Ifi203	interferon activated gene 203	-1.47
Gbp8	guanylate-binding protein 8	-1.46
Myo1g	myosin IG	-1.46

Tff2	trefoil factor 2 (spasmolytic protein 1)	-1.45
Prc1	protein regulator of cytokinesis 1	-1.45
Vnn1	vanin 1	-1.45
Lgi2	leucine-rich repeat LGI family, member 2	-1.45
Vwf	Von Willebrand factor	-1.45
Igf1	insulin-like growth factor 1	-1.45
H2-Aa	histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	-1.45
Tmem106a	transmembrane protein 106A	-1.44
Tm4sf19	transmembrane 4 L six family member 19	-1.44
Cd3e	CD3 antigen, epsilon polypeptide	-1.44
Col6a3	collagen, type VI, alpha 3	-1.43
C4b	complement component 4B (Chido blood group)	-1.43
Pld3	phospholipase D family, member 3	-1.42
Clec7a	C-type lectin domain family 7, member a	-1.42
Chil1	chitinase-like 1	-1.41

TABLA 5: miRNAs diferencialmente expresados en el pulmón de ratones viejos deficientes de *Zmpste24* 21 días posteriores al daño con bleomicina, comparados contra su respectivo WT.

SYMBOL	GENENAME	logFC
Mir145a	microRNA 145a	1.5
Mir126a	microRNA 126a	1.24
Mir701	microRNA 701	1.21
Mir3061	microRNA 3061	1.2

Mir27a	microRNA 27a	1.15
Mir103-2	microRNA 103-2	1.09
Mir3066	microRNA 3066	1.04
Mir5119	microRNA 5119	0.98
Mir452	microRNA 452	0.96
Mir10a	microRNA 10a	0.95
Mir491	microRNA 491	0.88
Mir23a	microRNA 23a	0.87
Mir30c-2	microRNA 30c-2	0.87
Mir29a	microRNA29a	0.82
Mir703	microRNA 703	0.82
Mir1946b	microRNA 1946b	0.79
Mir1192	microRNA 1192	0.74
Mir24-2	microRNA 24-2	0.65
Mir101a	microRNA 101a	0.64
Mir694	microRNA 694	0.63
Mir677	microRNA 677	0.59
Mir677	microRNA 677	0.59
Mir1938	microRNA 1938	0.58
Mir147	microRNA 147	-2.09
Mir5107	microRNA 5107	-1.78
Mir28c	microRNA 28c	-1.57
Mir511	microRNA 511	-1.07

Mir704	microRNA 704	-0.95
Mir1907	microRNA 1907	-0.74
Mir331	microRNA 331	-0.7
Mir678	microRNA 678	-0.67
Mir342	microRNA 342	-0.64
Mir702	microRNA 702	-0.62
Mir8104	microRNA 8104	-0.62
Mir344d-1	microRNA 344d-1	-0.6
Mir5134	microRNA 5134	-0.56
Mir3076	microRNA 3076	-0.55
Mir1912	microRNA 1912	-0.53
Mir5103	microRNA 5103	-0.53
Mir31	microRNA 31	-0.52
Mir5046	microRNA 5046	-0.52
Mir692-2	microRNA 692-2	-0.51
Mir692-3	microRNA 692-3	-0.51

Tabla 6: Genes diferencialmente expresados que tienen en común los pulmones de ratones con envejecimiento normal y acelerado.

SYMBOL	GENENAME
Rgs5	regulator of G-protein signaling 5
Mir664	microRNA 664

Snora36b	small nucleolar RNA, H/ACA box 36B
Nrcam	neuronal cell adhesion molecule
Fgfr4	fibroblast growth factor receptor 4
Il7r	interleukin 7 receptor
A530032D15Rik	RIKEN cDNA A530032D15Rik gene
C130026I21Rik	RIKEN cDNA C130026I21 gene
Gm35498	predicted gene, 35498
LOC100041057	sp110 nuclear body protein-like
LOC101055672	nuclear body protein SP140-like
Sp140	Sp140 nuclear body protein
Car3	carbonic anhydrase 3
Sprr1a	small proline-rich protein 1A
Cxcl13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13
Prdm8	PR domain containing 8
Spp1	secreted phosphoprotein 1
Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Igk	immunoglobulin kappa chain complex
Slc7a10	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 10

Accelerated aging induced by deficiency of *Zmpste24* protects old mice to develop bleomycin-induced pulmonary fibrosis

Jazmín Calyeca¹, Yalbi I. Balderas-Martínez², Raúl Olmos³, Rogelio Jasso³, Vilma Maldonado⁴, Quetzali Rivera¹, Moisés Selman³, Annie Pardo¹

¹Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

²Cátedra Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)-INER, Mexico City, Mexico

³Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico

⁴Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico

Correspondence to: Annie Pardo; **email:** apardos@unam.mx

Keywords: pulmonary fibrosis, aging, microRNAs

Received: August 19, 2018

Accepted: November 18, 2018

Published: December 10, 2018

Copyright: Calyeca et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis is a devastating aging-associated disease of unknown etiology. Despite that aging is a major risk factor, the mechanisms linking aging with this disease are uncertain, and experimental models to explore them in lung fibrosis are scanty. We examined the fibrotic response to bleomycin-induced lung injury in *Zmpste24*-deficient mice, which exhibit nuclear lamina defects developing accelerated aging. We found that young WT and *Zmpste24*(-/-) mice developed a similar fibrotic response to bleomycin. Unexpectedly, while old WT mice developed severe lung fibrosis, accelerated aged *Zmpste24*(-/-) mice were protected showing scant lung damage. To investigate possible mechanisms associated with this resistance to fibrosis, we compared the transcriptome signature of the lungs and found that *Zmpste24*(-/-) mice showed downregulation of several core and associated matrisome genes compared with WT mice. Interestingly, some microRNAs that target extracellular matrix molecules such as miR23a, miR27a, miR29a, miR29b-1, miR145a, and miR491 were dysregulated resulting in downregulation of profibrotic pathways such as TGF- β /SMAD3/NF- κ B and Wnt3a/ β -catenin signaling axis. These results indicate that the absence of *Zmpste24* in aging mice results in impaired lung fibrotic response after injury, which is likely associated to the dysregulation of fibrosis-related miRNAs.

INTRODUCTION

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and lethal lung disease of unknown etiology and limited therapeutic options [1-3]. Although the pathogenic mechanisms are uncertain, most evidence indicates that IPF results from the hyperactivation of the respiratory epithelium, which secretes a variety of mediators that induce the migration, proliferation, and activation of fibroblasts with the subsequent destruction of the lung parenchyma [2-4, 5]. The median age at diagnosis is ~65 years, and the incidence increases markedly with age, supporting the notion that aging is a driving force for the development of the disease [1-3].

Aging is characterized by exhaustion of stem cell reservoirs, alterations in proteostasis, increased accumulation of damaged DNA, telomere shortening and mitochondrial dysfunction [6]. Excessive dysfunction of most of these aging-associated mechanisms has been identified in IPF [6, 7].

However, most biomedical research regarding the pathogenesis of IPF has been performed in mice 6-8 weeks old and studies on naturally aged, wild-type mice are scanty [8]. The main problem lies in the significant practical difficulties associated with the generation of aged mice, including time and cost. The few studies assessing experimental models in older mice have

revealed that aging increases the fibrotic lung response to bleomycin-instillation or herpes virus damage [9, 10]. However, in another study, it was found that the severity of fibrosis was not different between young and old mice although aged mice demonstrated an impaired capacity to resolve fibrosis [11].

There is growing interest to identify experimental models of accelerated aging. In this context, the senescence-accelerated mouse (SAM), or the genetically modified telomerase deficient mice have been used to study the effect of aging on the development of pulmonary fibrosis [12-13].

Recently, it was shown that *Zmpste24* deficient mice displayed accelerated aging. *Zmpste24* is a zinc metalloproteinase responsible for the final cleavage step of nuclear envelope prelamin A, a critical step in its maturation process. Accumulation of immature lamin A is highly toxic to the cell and produce DNA damage, chromatin remodeling and early senescence [14].

Zmpste24-deficient mice appear healthy until ~4 weeks, and are indistinguishable from their heterozygous or wildtype littermates. After eight weeks of age, homozygous null mice progressively show a premature aging phenotype including severe growth retardation, hair loss, osteoporosis, dilated cardiomyopathy, muscular dystrophy, lipodystrophy, and their lifespan is shortened to 4-6 months [14, 15].

To clarify the role of aging in the development of lung fibrosis and unveiling whether *Zmpste24* deficient mice could be an appropriate aging-model for this purpose, we examined their fibrotic response to bleomycin-induced lung damage.

Unexpectedly, we found that old but not young *Zmpste24* deficient mice seem to be protected to the development of bleomycin-induced lung fibrosis finding that was related to an upregulation of the microRNAs miR23a, miR27a, miR29a, and miR145a. These findings suggest that accelerated aging induced by the absence of *Zmpste24*, result in attenuated fibrotic response and the overexpression of miRNAs that target extracellular matrix related mRNAs.

RESULTS

Baseline lung transcriptome in physiological and accelerated aging

In order to know if there are differences in gene expression between the physiological and accelerated aging process induced by *Zmpste24* deficiency, we per-

formed a global gene expression analysis in lungs from young (4 weeks) and old (82 weeks) WT, and young (4 weeks) and old (16 weeks) *Zmpste24* deficient mice [14]. As shown in the volcano plots, 576 genes were differentially expressed in old WT compared with their young counterpart (Figure 1A). The top 50 upregulated and downregulated genes are presented in Supplementary Table 1. The highest over-expressed gene in old WT lungs compared with young ones was the core Matrisome secreted phosphoprotein-1 (*Spp1* also known as osteopontin). *Tenascin C* and transforming growth factor beta-induced (*Tgf-β1*) genes also belonging to the core Matrisome were highly up-regulated. In addition, several matrix metalloproteinases considered as Matrisome-associated genes such as *Mmp8*, *Mmp12*, *Mmp13*, and *Imp1* were also upregulated. Some of these findings were validated by qPCR as shown in Figure 1B.

Gene ontology (GO) functional enrichment analysis and KEGG pathways were used for functional analysis of the differentially expressed genes in old and young WT mice. As shown in Figure 1C and D, several pathways were altered in old mice including inflammatory response, positive regulation of cell proliferation and migration and extracellular matrix organization.

The comparison of lungs from young and old *Zmpste24* deficient mice revealed 224 differentially expressed genes (Figure 2A). The top 50 upregulated and downregulated genes are shown in Supplementary Table 2. Several genes involved in the immune and inflammatory response, such as chemokines, chemokine receptors, and T-cell receptors were upregulated. As in WT old lungs, *Spp1* was increased. Among the downregulated genes, we found several core Matrisome genes such as elastin (*Elm*), and collagen type 3 alpha-1 (*Col3a1*). These findings were confirmed by qPCR (Figure 2B). Functional analysis by GO and KEGG revealed pathways related to extracellular matrix organization, cell senescence, immune response, as well as several negative regulation pathways such as epithelia and endothelial cell proliferation (Figure 2C and 2D).

Then, when we compared dysregulated genes in natural aging (old versus young WT) with accelerated aging (old versus young *Zmpste24*-deficient) we found 19 overlapping genes between both groups. (Supplementary Figure 1A and Supplementary Table 3). Gene Ontology analyses revealed altered pathways related to immune response, activation of signaling protein activity involved in unfolded protein response among others. (Supplementary Figure 1B and 1C).

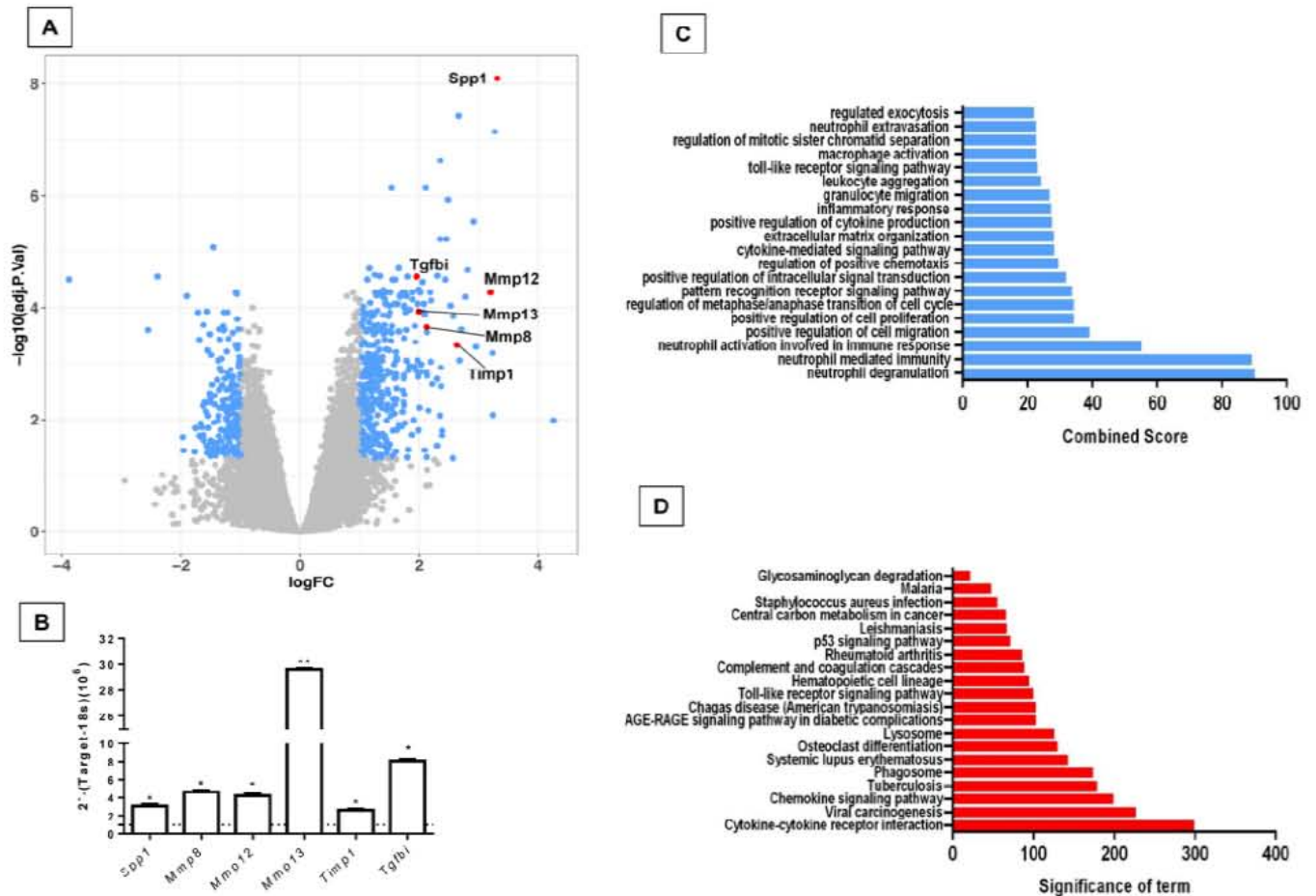


Figure 1. Differentially expressed genes and pathways in lungs from old compared to young C57/BL6 wild-type mice. (A) Volcano plot of the global gene expression profiling in lungs from old wild type versus young WT mice. Each point represents the difference in expression (log fold-change) between the two groups of mice plotted against the level of statistical significance. Right blue dots represent overexpressed genes, while the left blue dots represent downregulated genes at a significant level of * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Some Core or associated genes to the Matrisome are plotted in red. (B) The expression of these genes was evaluated by quantitative RT-PCR. Bars represent fold-change of old mice over young ones (dotted line). (C and D) Gene ontology (C) and KEGG (D) functional analysis of dysregulated genes in old WT mice compared to young littermates. The most significant 20 terms are shown in this figure. Threshold criteria considered for the analysis are log Fold change > 1 or < -1 and p -value < 0.05 . KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

Aging increases lung collagen content in WT and *Zmpste24*^{-/-} mice and localizes surrounding airways

To evaluate the effect of both physiological and accelerated aging process into lung collagen concentration, we measured hydroxyproline content in the right lungs from WT and *Zmpste24* deficient mice. It is important to emphasize that there were no differences in total weight (13.3 ± 3.5 g vs 12.5 ± 3.4 g) or lung weight (5.5 ± 1.5 mg vs 6.1 ± 1.5 mg) between young WT and young *Zmpste24* deficient mice. By contrast, a significant decrease of body and lung weight was observed in old *Zmpste24* deficient mice compared

with the WT mice: (body: 14.3 ± 2 g vs 31.5 ± 1.8 g; lung: 8.1 ± 1.6 mg vs 14.1 ± 3.6 mg, $p \leq 0.05$). For this reason, hydroxyproline was expressed as μg per mg of the dried lung.

As illustrated in Figure 3A, lungs from old *Zmpste24* deficient and WT mice showed a significant increase in hydroxyproline content when compared to their respective young littermates (old *Zmpste24* deficient mice: 6.9 ± 1.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ vs young 4.2 ± 0.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$, and old WT: 6.4 ± 0.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ vs young 4.5 ± 0.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively; $p \leq 0.05$). Interestingly, morphological analysis using Masson's trichrome staining showed that

collagen fibers accumulation occurred mainly surrounding the airways (Figure 3B).

Young WT and *Zmpste24* deficient mice develop similar fibrotic response after bleomycin injury

To explore the effect of lung damage in young WT and *Zmpste24* deficient mice, we administered them oropharyngeal bleomycin, and animals were sacrificed 21 days after injury. As illustrated in Figure 4A, both WT and *Zmpste24* deficient mice displayed similar fibrotic morphological lesions and collagen deposition that was confirmed by the fibrotic score (Figure 4B). OH-proline analysis confirmed this observation show-

ing an increase of lung collagen content after bleomycin without significant differences between WT and *Zmpste24* deficient mice ($6.1 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mg}$, and $6.3 \pm 1.3 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectively) (Figure 4C).

Aging protects *Zmpste24* deficient mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis

There is some evidence suggesting that old mice show a more severe lung remodeling after injury compared with young ones [9,10]. In this context, we evaluated the fibrotic response after 21 days of bleomycin administration in old WT mice (82 weeks) and accelerated aging *Zmpste24* deficient mice (16 weeks).

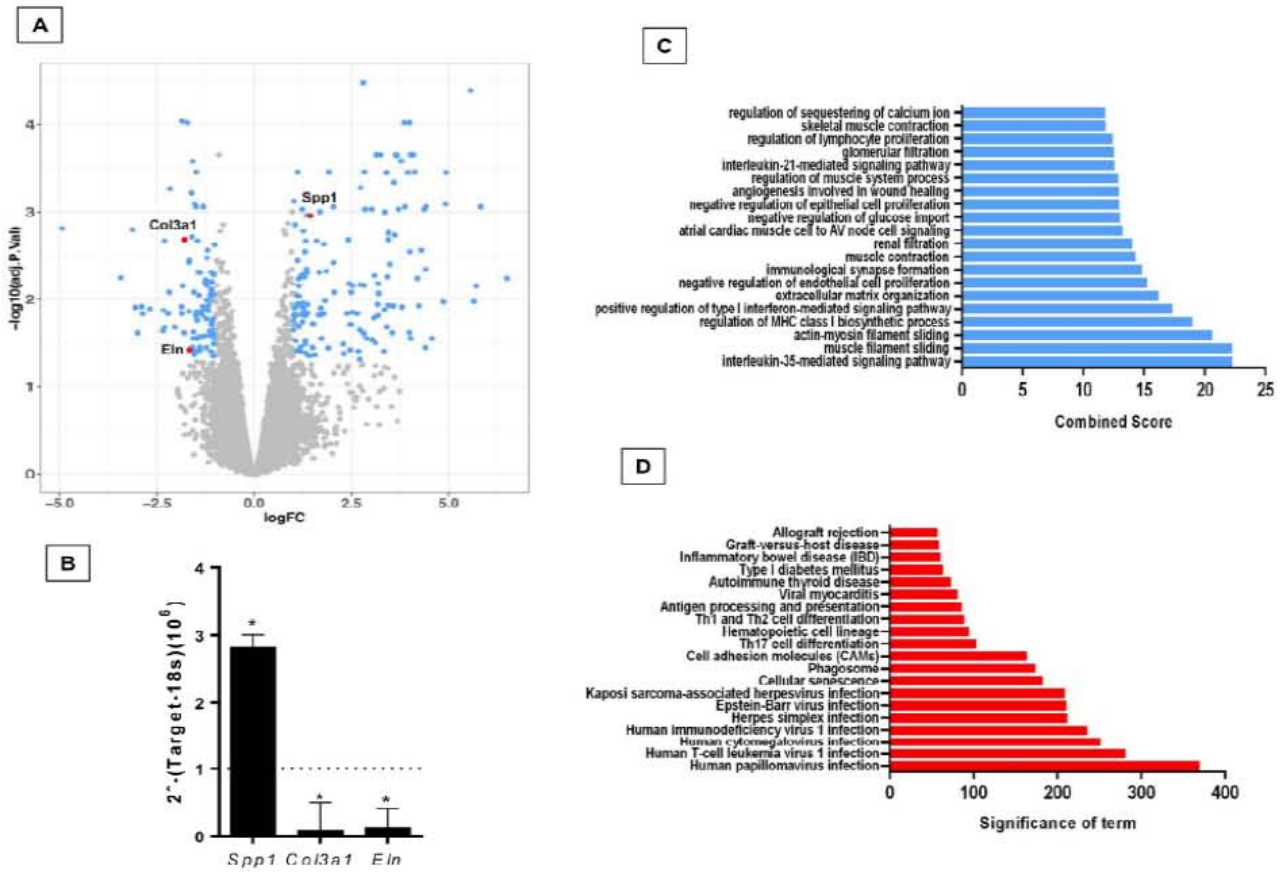


Figure 2. Differentially expressed genes and pathways in lungs from old compared to young *Zmpste24* deficient mice. (A) Volcano plot of the global gene expression profiling in lungs from old *Zmpste24* deficient mice vs young littermates. Each point represents the difference in expression (log fold-change) between the two groups of mice plotted against the level of statistical significance. Right blue dots represent overexpressed genes; left blue dots represent downregulated genes at a significant level of $p < 0.05$. Some Core Matrisome genes are plotted in red. (B) The expression of these genes was evaluated by quantitative RT-PCR. Data are shown as fold-change values as compared with young $-/-$ (dotted lines). (C and D) Gene ontology (C) and KEGG (D) functional analysis of dysregulated genes in old *Zmpste24* deficient mice compared to young littermates. The most significant 20 terms are shown in this figure. Threshold criteria considered for the analysis are log Fold change > 1 or < -1 and p -value < 0.05 .

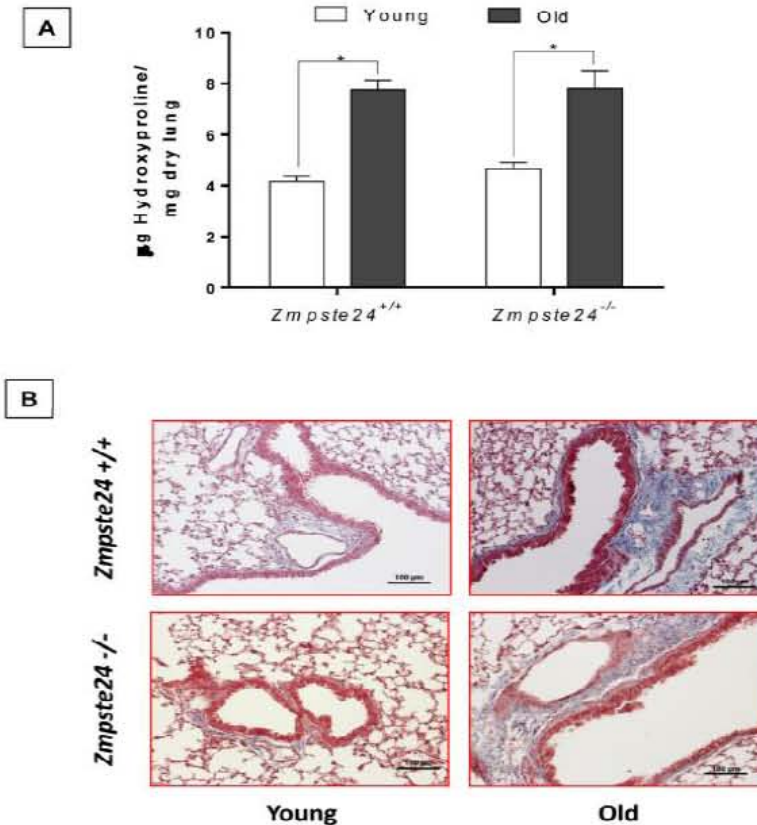


Figure 3. Aging increases lung collagen content in WT and *Zmpste24*^{-/-} mice. (A) OH-Prolline content. Data represent mean \pm SD (n=4); * $p < 0.05$. **(B)** Representative morphological images of two WT and two *Zmpste24* deficient mice stained with Masson's trichrome. Scale bar, 100 μ m.

Morphological analysis by Masson's trichrome staining of old WT mice showed severe lung damage and collagen fiber deposition while lungs from old *Zmpste24* deficient mice showed scant damage (Figure 5A). Supporting these data, the fibrotic score was significantly lower in *Zmpste24* deficient mice compared with WT mice (-/- 1.3 ± 0.6 versus WT: 2.5 ± 0.3 $p \leq 0.05$) (Figure 5B). Quantification of hydroxyproline content revealed the expected significant increase after bleomycin in old WT mice (8.8 ± 0.5 μ g/mg vs saline: 6.4 ± 0.6 μ g/mg, $p \leq 0.05$). In sharp contrast, lungs from *Zmpste24* deficient mice showed no increase in hydroxyproline content after bleomycin injury (6.5 ± 1.3 μ g/mg vs 6.9 ± 1.5 μ g/mg) (Figure 5C). Taking together, these results suggest that both aging and the absence of *Zmpste24* protect mice for developing pulmonary fibrosis.

In order to investigate possible mechanisms that may explain the resistance of the accelerated aged *Zmpste24* deficient mice to bleomycin-induced lung fibrosis, we

compared the lung transcriptome signature of the injured old *Zmpste24* deficient mice with those of old WT mice. Whole-transcript array showed 1165 differentially expressed RNAs (Figure 6). Our results revealed that several associated-Matrisome genes including *Mmp12*, *Mmp13*, *Mmp19*, and *Timp1* as well as the core Matrisome *Col1a1*, *Col3a*, *Spp1*, and *Fnl* were downregulated in the old *Zmpste24* deficient mice (Supplementary Table 4). Likewise, some genes with putative antifibrotic effects such as NADPH oxidase 4, transforming growth factor beta receptor III, and decorin were upregulated.

Using key Pathway Advisor-Clarivate we found six transcription factors upregulated including paternally expressed 3 (*Peg3*), the negative regulator of the inflammatory response nuclear receptor subfamily 4 group A member 1 (NR4A1) RAR-related orphan receptor C (RORC), Kruppel-like factor 15 (KLF15), hypoxia-inducible factor 3a, and early growth factor response 1 (*Egr1*).

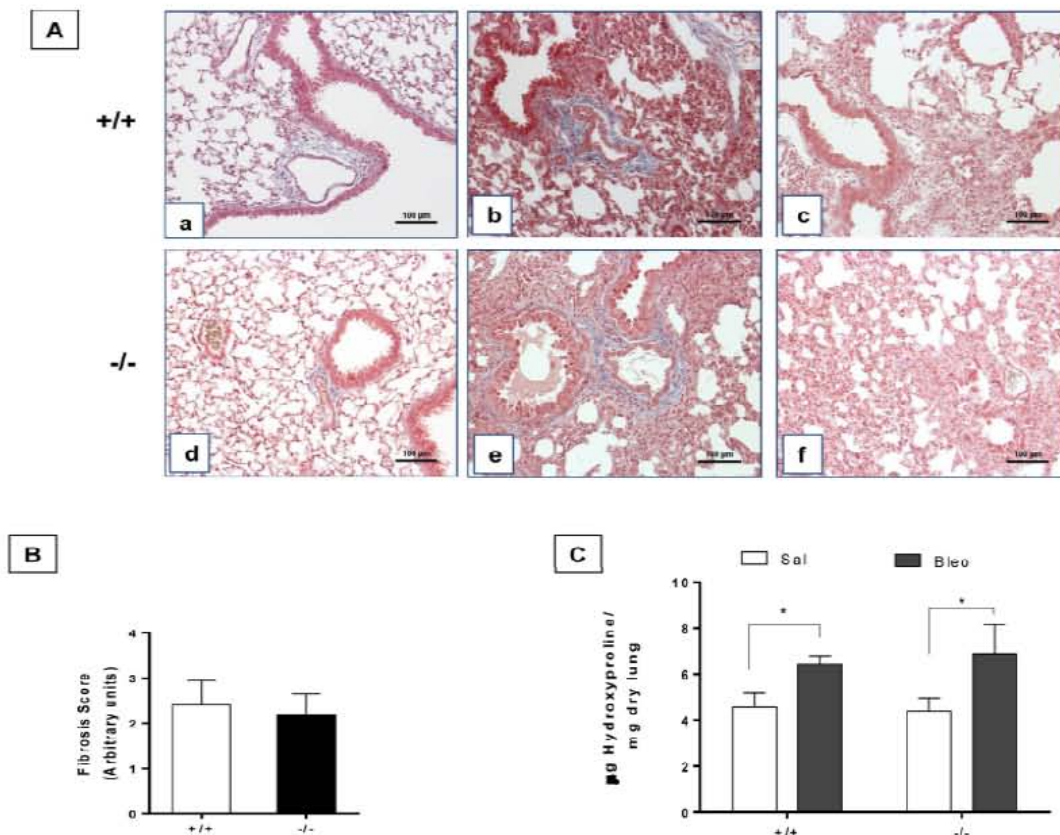


Figure 4. Young WT and *Zmpste24* deficient mice develop similar fibrotic response after bleomycin injury. (A) Representative Masson Trichrome staining of lung sections from young saline control WT (panel a), and 21 days after bleomycin (panels b, c), and *Zmpste24* deficient mice saline control (panel d) and at 21 d after bleomycin (panels e, f). Scale bar, 100 μ m. (B) Fibrosis score for grading lung histopathological changes. Graphs represent means \pm SD. (C) OH-Proline content in lungs after saline or 21 days of bleomycin injury. * $p < 0.05$; (n=6).

GO functional enrichment analysis and KEGG revealed several altered pathways primarily related to an immune/inflammatory response (Figure 6B and C).

Fibrotic injury induces the expression of antifibrotic microRNAs in lungs of aging *Zmpste24* deficient mice

In the global RNA expression, we noticed that 42 microRNAs were differentially expressed, 22 upregulated and 20 down-regulated in the lungs from bleomycin injured *Zmpste24* deficient mice compared with their WT counterpart (Figure 7A, Supplementary Table 5). Several of these microRNAs were of interest because their targets are related with the extracellular matrix such as *miR23a*, *miR27a*, *miR29a*, *miR29b-1*, *miR491*, and *miR145a*, which were validated by qPCR.

These five miRNAs were increased during the fibrotic response in old *Zmpste24* deficient mice (Figure 7B). The three members of the miR29 family (*miR29a*, *miR29b-1*, and *miR29c*) have been shown to target mRNAs of extracellular matrix proteins [16,17]. We found a downregulation of several miR29 targets in lungs from old *Zmpste24* deficient mice such as *Colla1*, *Col3a1*, and *Tgfb-1*, which were corroborated by qPCR (Figure 7C). As mentioned, *miR27a* was upregulated in the lungs of old *Zmpste24* deficient mice after bleomycin injury. To investigate the role of this microRNA, we searched for targets in *silico* databases [18]. Matching with our results, we found two genes, *Spp1*, and *Ppar- γ* . That was downregulated in the lungs of old *Zmpste24* deficient mice compared with their WT counterpart after bleomycin injury. These results were validated by qPCR (Figure 7D).

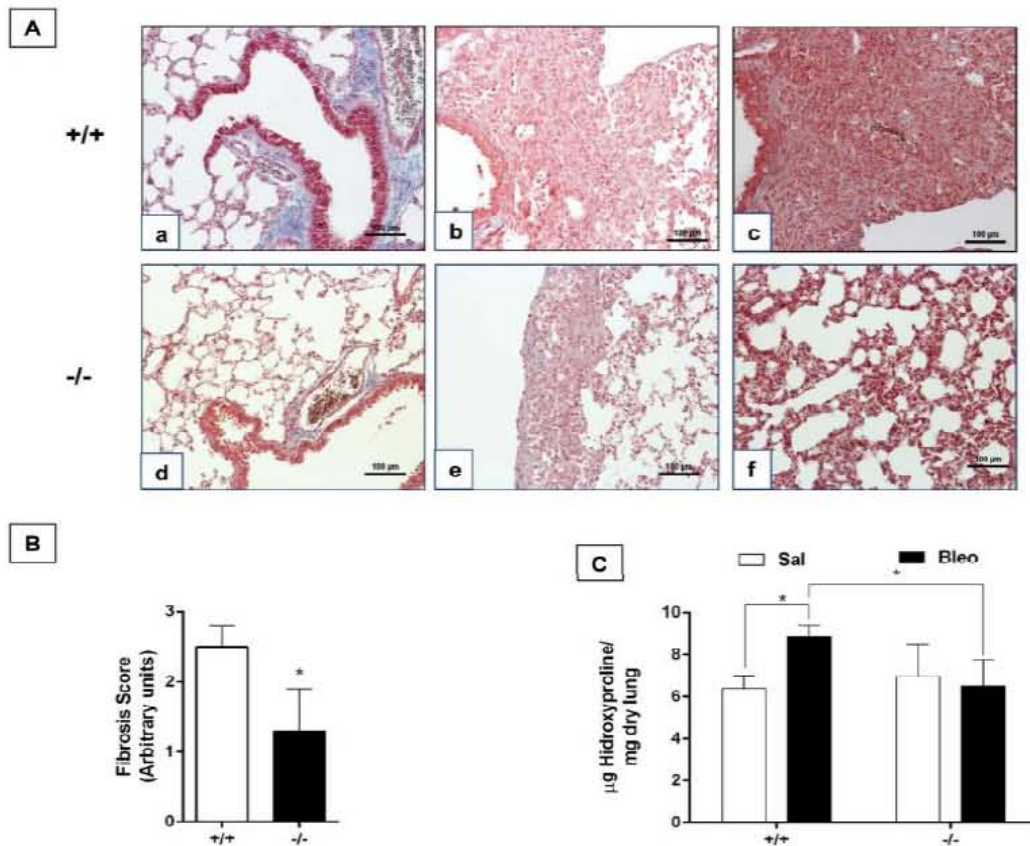


Figure 5. Aging protects *Zmpste24* deficient mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis. (A) Representative Masson Trichrome staining of lung sections from old saline control WT (panel a), and 21 days after bleomycin (panels b, c), and *Zmpste24* deficient mice saline control (panel d) and at 21 d after bleomycin (panels e, f). Scale bar, 100 µm. (B) Fibrosis score for grading lung histopathological changes. Graphs represent means ± SD. * $p < 0.05$. (C) OH-Proline content in lungs after saline or 21 days of bleomycin injury. * $p < 0.05$; Old WT (n=3); *Zmpste24* deficient mice (n=6).

miR145a that was also overexpressed in the lungs of *Zmpste24* deficient mice targets among others, *Mmp12*, *Mmp13* and *Timp1* genes. As shown in Figure 7E, these genes had a lower expression in old bleomycin injured *Zmpste24* deficient mice as validated by qPCR.

DISCUSSION

Aging is not only a major risk factor for the development of IPF but also worsens the fibrotic response and outcome in human and experimental fibrotic lung diseases [9, 10, 19]. Moreover, it has been shown that old mice display impaired resolution after lung injury [11]. Thus, aged mice may reflect more appropriately the physiopathological behavior of aging-associated human pulmonary fibrosis. However, there

are considerable practical difficulties related to the generation of aged mice and most of the research in this field has been performed in mice 6-8 weeks old.

In this context, senescence-prone mice that exhibit accelerated aging, and genetically modified mice that result in age-related lung fibrosis have been explored as models that may resemble what occurs in IPF and other human fibrotic lung disorders [2, 13, 20].

In this study, we used the *Zmpste24* deficient mice that display several features of premature aging [14]. We selected the time point of biological age in the rapid aging model to compare with old WT mice, using the strong evidence that *Zmpste24* deficient mice had a remarkably aging phenotype since they are 12 weeks

old, including short lifespan (20 weeks old) [14, 21-23]. For this reason, we selected as young, mice of 4 weeks age, and old, those of 13 weeks age to start observations [14]. Of note, no lung morphological differences were found between WT and *Zmpste24* deficient mice by conventional light microscopy (not shown). Additionally, we analyzed whether aging affected the lung levels of *Zmpste24*. We found that the enzyme increase in old mice, and is mainly located in bronchioalveolar epithelial cells (Supplementary Figure 2).

We first compared the transcriptome signature of young and old WT and young and old *Zmpste24* deficient mice, and a number of differences showed-up. Interestingly for our study, in the WT mice, aging was associated with the upregulation of several extracellular matrix proteins (core matrisome) and of matrix metalloproteinases (matrisome-associated genes) [24].

The opposite, with the exception of *Spp1*, was observed in the *Zmpste24* deficient mice. Interestingly, although fibrillar collagen genes were not upregulated, when we examined the lung hydroxyproline content we found a marked but similar increase of collagen with age suggesting that it represents an accumulation of the protein with aging. The fibrils were localized mainly adjacent to the airways.

Afterward, we evaluated the effect of age on the fibrotic response to bleomycin comparing the extent of the lesions and collagen deposition in young and old WT versus young and old *Zmpste24* deficient mice. The mouse model of bleomycin-induced lung injury is the most widely used for the study of lung fibrosis [25].

Strikingly, we found that while young WT and young *Zmpste24* deficient mice develop a similar architectural

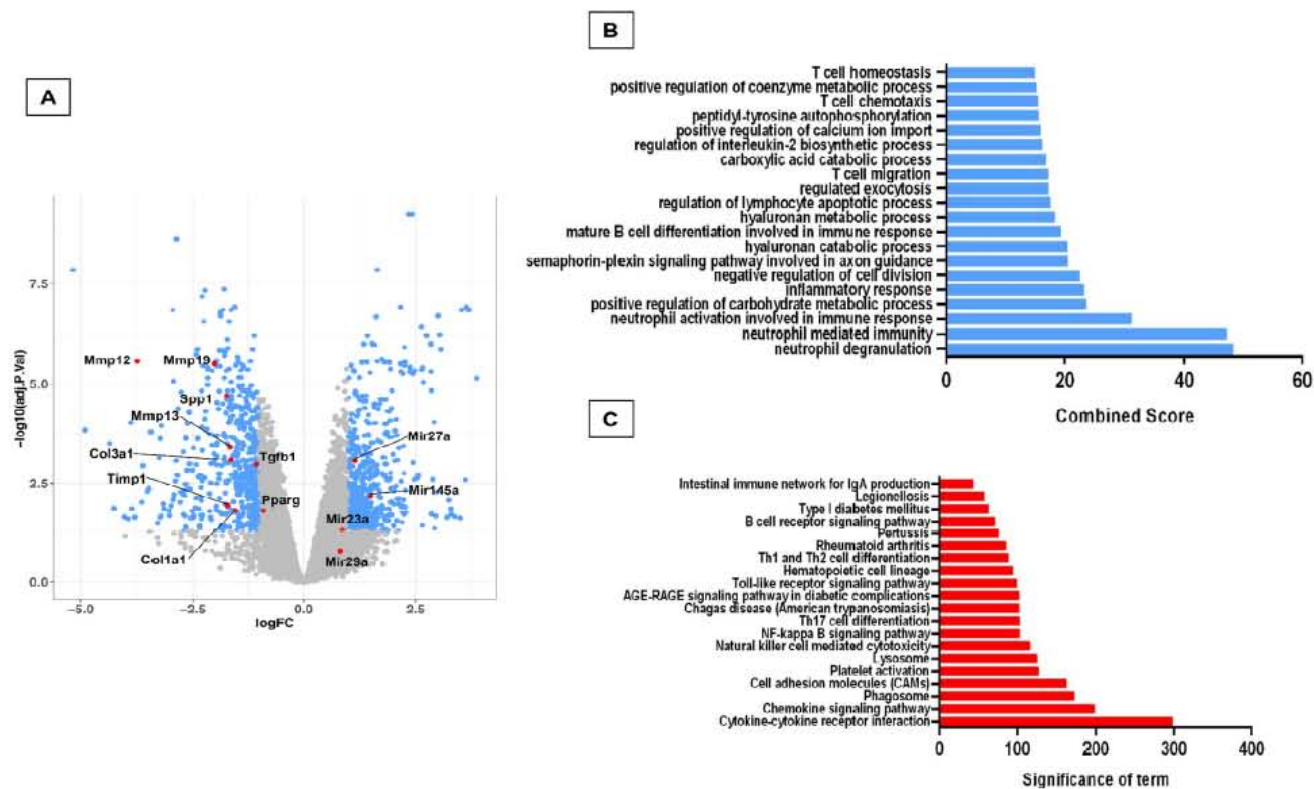


Figure 6. Microarray analysis of bleomycin-injured lungs of old *Zmpste24* deficient mice (n=3) compared with old wildtype littermates (n=3). Lungs were obtained 21 days after bleomycin injury. **(A)** Volcano plot of the global gene expression profiling in lungs from old injured *Zmpste24* deficient mice vs old WT mice. Each point represents the difference in expression (log fold change) between the two groups of mice plotted against the level of statistical significance. Right blue dots represent overexpressed genes; left blue dots represent relatively downregulated genes at a significant level of $p < 0.05$. **(B)** and **(C)** Gene ontology **(B)** and KEGG **(C)** functional analysis. The most significant 20 terms are shown. Threshold criteria considered for the analysis are log fold-change > 1 or < -1 and p-value < 0.05 for genes, and > 0.5 or < -0.5 for miRNAs.

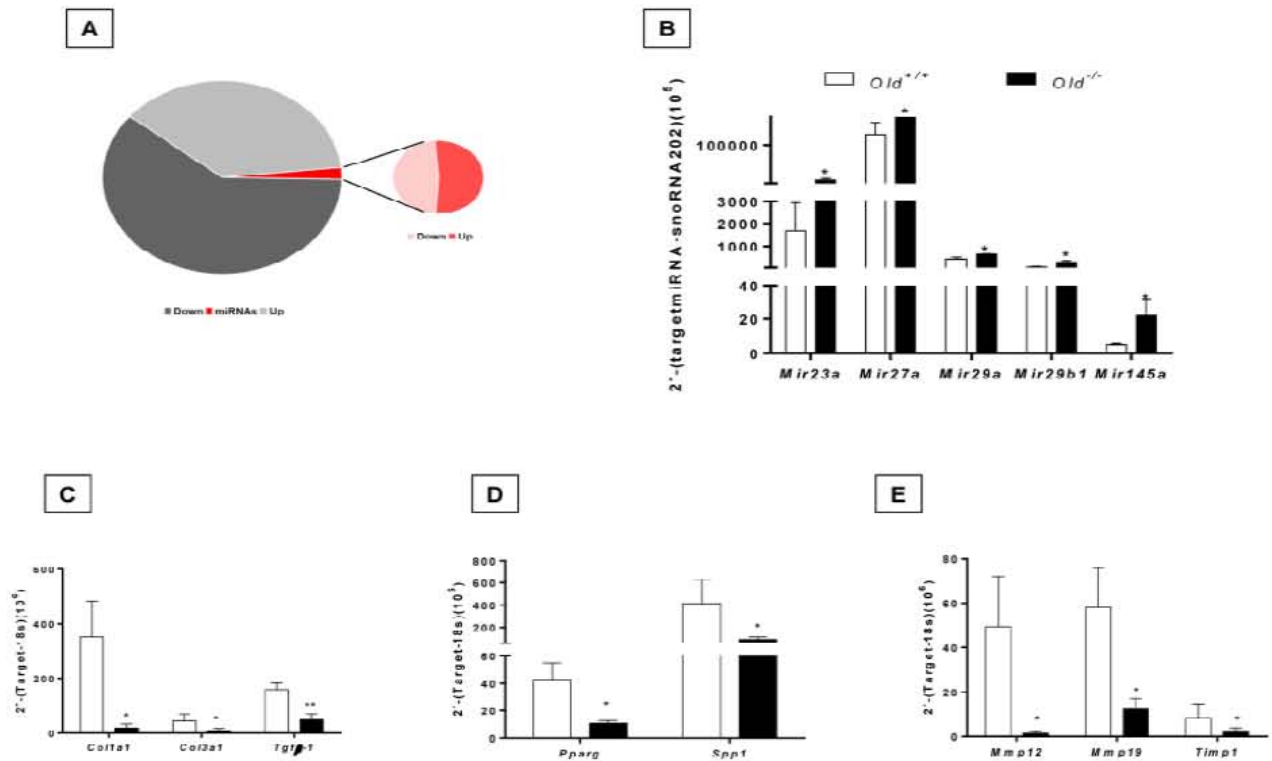


Figure 7. Dysregulated miRNA expression and gene targets of bleomycin-treated lungs of old *Zmpste24* deficient mice (n=3) compared to old WT (n=3) analyzed by quantitative RT-PCR. (A) Pie graph showing significantly different mRNA (up= 627, down= 538) and miRNAs (up= 22, down= 20) in lungs of *Zmpste24* deficient mice compared with their WT counterparts after bleomycin damage. **(B)** Expression levels of selected miRNAs. Gene expression of **(C)** mir29 targets, **(D)** mir27a targets, **(E)** mir145a targets. White bars represent mean expression in WT lungs, and black bars represent mean expression in *Zmpste24* deficient mice \pm S.E.M. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

lung remodeling and increased collagen accumulation, the fibrotic lesions were remarkably attenuated in accelerated aged old *Zmpste24* deficient mice compared with physiologically aged WT.

To better understand the mechanisms by which old *Zmpste24* deficient mice are protected from bleomycin-induced lung fibrosis, we examined the transcriptome expression profiling of the aged mice. Our results demonstrated that several Core matrisome (extracellular matrix) genes and MMPs (Matrisome-associated genes) are downregulated in *Zmpste24* deficient mice.

Interestingly, one of them was osteopontin a strong profibrotic mediator [26]. Osteopontin increases fibroblast migration and proliferation, and induces the up-regulation of type I collagen, and the down-regulation of MMP-1 expression. Moreover, osteopontin-deficient mice show a marked reduced collagen accumulation in

response to bleomycin challenge compared with WT mice [27].

Interestingly, several transcription factors were over-expressed including paternally expressed 3 (*Peg3*) a mediator of p53 in response to DNA damage [28], the negative regulator of the inflammatory response nuclear receptor subfamily 4 group A member 1 (*NR4A1*), which regulates cytokine signaling and attenuates inflammation in lung epithelial cells [29], and RAR-related orphan receptor C (*RORC*), which regulates T-cell polarity and cytokine production [30]. Also, the transcription factor Kruppel-like factor 15 (*KLF15*) involved in defense response and hypoxia inducible factor 3a (*Hif3a*) were also overexpressed [31]. Likewise, the mechanosensitive gene of early growth factor response 1 (*Egr1*) was also upregulated. This transcription factor was found overexpressed in mice protected from lung hyperventilation injury [32], and has

an important role in the inflammatory response [33]. Accordingly, functional analysis revealed altered immune and inflammatory response.

Since considerable evidence indicates that miRNAs play critical roles in the pathogenesis of lung fibrosis either enhancing or attenuating fibrogenic pathways, we also examined the miRNA expression profile, and we identified a panel of 12 miRNAs that were differentially expressed. Among them, miR23a, miR27a, miR29a, miR29b-1, and miR145a, that target different components of extracellular matrix and can be considered anti-fibrotic, were increased in old *Zmpste24* deficient mice compared with old WT after bleomycin-injury.

One of them, miR-29b, inhibits TGF- β 1, CTGF, and Smad3 signaling, acting as a counter-regulator of the strong profibrotic TGF- β /Smad3/CTGF axis [34].

Moreover, evaluation of the expression of miR-29a/b in lungs collected at different time points after bleomycin treatment revealed a gradual decrease during the development of fibrosis with a subsequent increase that correlates with the remission of the fibrotic lesions [16].

miR27-a, another upregulated miRNA in bleomycin-injured *Zmpste24* deficient mice, functions via negative-feedback mechanisms decreasing lung myofibroblast differentiation, and therapeutically mitigates bleomycin-induced lung fibrosis in mice [35]. Furthermore, *in silico* analysis predicts that one of its targets is osteopontin.

miRNA-491 has been evaluated mostly in cancer, but it has been shown that target mRNAs involved in strong profibrotic pathways including TGF- β /SMAD3/NF- κ B and Wnt3a/ β -catenin signaling pathways [36, 37].

Certainly, several other mechanisms may contribute to the decreased fibrotic response of the *Zmpste24*-deficient mice to lung injury. For example, autophagy that results in the accumulation of damaged macromolecules, decreases during aging and is even exaggeratedly reduced in lung fibrosis. In sharp contrast, *Zmpste24*-deficient mice exhibit a pronounced activation of autophagic proteolysis caused by reduced activity of mTOR [38].

In conclusion, our results indicate that the absence of *Zmpste24* in aging mice results in impaired lung fibrotic response after injury which is likely associated to the dysregulation of fibrosis-related miRNAs.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Young (4 weeks) and old (79 weeks) C57BL/6 wild type mice (WT) and young (4 weeks) and old (13 weeks) *Zmpste24* deficient mice were housed in specific pathogen-free conditions and used for different experiments. Mice genotypes were determined by PCR analysis from mouse tail DNA as previous described [14]. The Ethics Committee of the National Institute of Respiratory Diseases of Mexico (INER) approved all experiments.

Bleomycin-induced lung fibrosis

Pulmonary fibrosis was induced by oropharyngeal administration of a single dose of 0.1U Bleomycin/g mice weight (BLEOLEM, Lemery) in a volume of 50 μ l saline solution. Control groups received only the vehicle. All mice were sacrificed at 21 days after bleomycin or saline administration (*Zmpste24*-deficient mice: 16 months and WT: 82 months). Lungs were perfused with sterile saline from right to left ventricle of the heart. Lungs were removed for fixation overnight in paraformaldehyde (right lung) or snap frozen in liquid nitrogen (left lung) followed by storage at -80°C.

Hydroxyproline assay

Left lungs were dried at 110°C during 48 h and then hydrolyzed in 6 N HCl for 24 h. Samples of 5 μ l were assayed as previously described [39, 40]. Each sample was tested in duplicate and results were expressed as μ g of hydroxyproline/mg of the dry left lung.

Morphometric analysis

Right lungs were fixed by inflation using 4% paraformaldehyde at a continuous pressure of 25 cm H₂O, and embedded in paraffin. Lung sections were either stained with hematoxylin-eosin or Masson trichrome and scored blindly for severity and extent of lung lesions. The severity of lung fibrosis was determined using a semiquantitative histopathological scoring method [40].

RNA extraction and preparation

RNA was extracted using TRIzol reagent (Life Technologies, Grand Island, New York, NY) following the manufacturers' instructions, and purity and efficiency were verified by spectrophotometry (NanoDrop; Wilmington, DE) and bioanalysis (Agilent; Palo Alto, CA).

Quantitative real-time PCR

One μg of RNA was treated with 1 unit of DNase and reverse transcribed into cDNA (RT2 First strand kit, Qiagen) according to the manufacturer's instructions. qPCR amplification was performed with specific FAM or VIC dye-labeled TaqMan probes for *Coll1a1* (Mm00801666_g1), *Col3a1* (Mm00802300_m1), *Mmp8* (Mm00439509_m1), *Mmp12* (Mm00500554_m1), *Mmp13* (Mm00439491_m1), *Mmp19* (Mm00491296_m1), *Ppar γ* (Mm00440940_m1), *Spp1* (Mm00436767_m1), *Egr1* (Mm00656724_m1), *Eln* (Mm00514670_m1), *Tgfb1* (Mm01178820_m1), *Tgfb1i* (Mm01337605_m1), *Timp1* (Mm00441818_m1) and normalized to *18S rRNA* expression (PE Applied Biosystems). Time PCR amplification was performed using BIORAD CFX-96 Real-Time PCR system (Bio-Rad) [41].

Microarray analysis

The biotin-labeled cRNA was purified, fragmented, and hybridized to GeneChip™ Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix®). For each group, 100 ng of RNA from three different biological samples were used. The results were analyzed by R software (<http://www.r-project.org/>) [42] and Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) [43]. To identify significant differences between gene expression in each condition, all data were analyzed by Limma linear model based on Bayes empirical method [44]. Representative data were considered significantly with higher p -values (adjusted p -value < 0.05).

The microarray data were submitted to the Gene Expression Omnibus <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> (access number GSE123293).

Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway analyses

For functional analysis, we used Gene Ontology enrichment tool at the Enrichr website. GO enrichment analysis is a computational method for inferring knowledge about an input gene set by comparing it to annotated gene sets representing prior biological knowledge. The data was graphed as Combined Score, a combination of the p -value and z -score calculated by multiplying the two scores as follows: $c = \ln(p) * z$. Where c is the combined score, p is the p -value computed using Fisher's exact test, and z is the z -score computed to assess the deviation from the expected rank. The Combined Score provides a compromise between both methods and in several benchmarks and it has been shown that reports the best rankings when compared with other scoring schemes. KEGG database was used for pathway analysis of differential expression

genes using gProfile software. For all comparison we considered differentially expressed genes with an adjusted p -value < 0.05 [45-47].

microRNA expression

Total RNA was reverse transcribed using TaqMan miRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions, and amplification was performed using BIORAD CFX-96 Real-Time PCR system (Bio-Rad). MicroRNA expression was evaluated using following TaqMan probes mmu-miR23a-5p (002439), mmu-miR27a-3p (000408), mmu-miR29a-3p (002112), mmu-miR29b-3p (000413), mmu-miR145a-3p (002514). Expression of snoRNA202 (001232/AF357327) was used as an internal control. All experiments were performed with Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems).

Statistical analysis

Statistical differences were determined by two-way ANOVA followed by Tuckey test for quantitative PCR and hydroxyproline measurement. For two groups, differences were analyzed by Student's t -test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Fibrosis score was evaluated by the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by nonparametric Mann-Whitney U-test. Results are expressed as mean \pm SD, or S.E.M., p -value < 0.05 was considered statistically significant. For gene tables, we only show identified genes in the Affymetrix annotation database. All graphs were made using Graphpad Prism Software Version 4.0 (Graphpad Software Inc., San Diego CA).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Carlos López-Otin (Universidad de Oviedo, Spain) who kindly donated the *Zmpste24* deficient mice. We thank Remedios Ramírez for her technical support.

This paper constitutes a partial fulfillment of Jazmin Calycca to obtain the PhD "Doctor en Ciencias del Posgrado en Ciencias Biológicas", Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

FUNDING

This research was supported by CONACYT 281074 and Jazmin Calycca's PhD scholarship supported by CONACYT 262585.

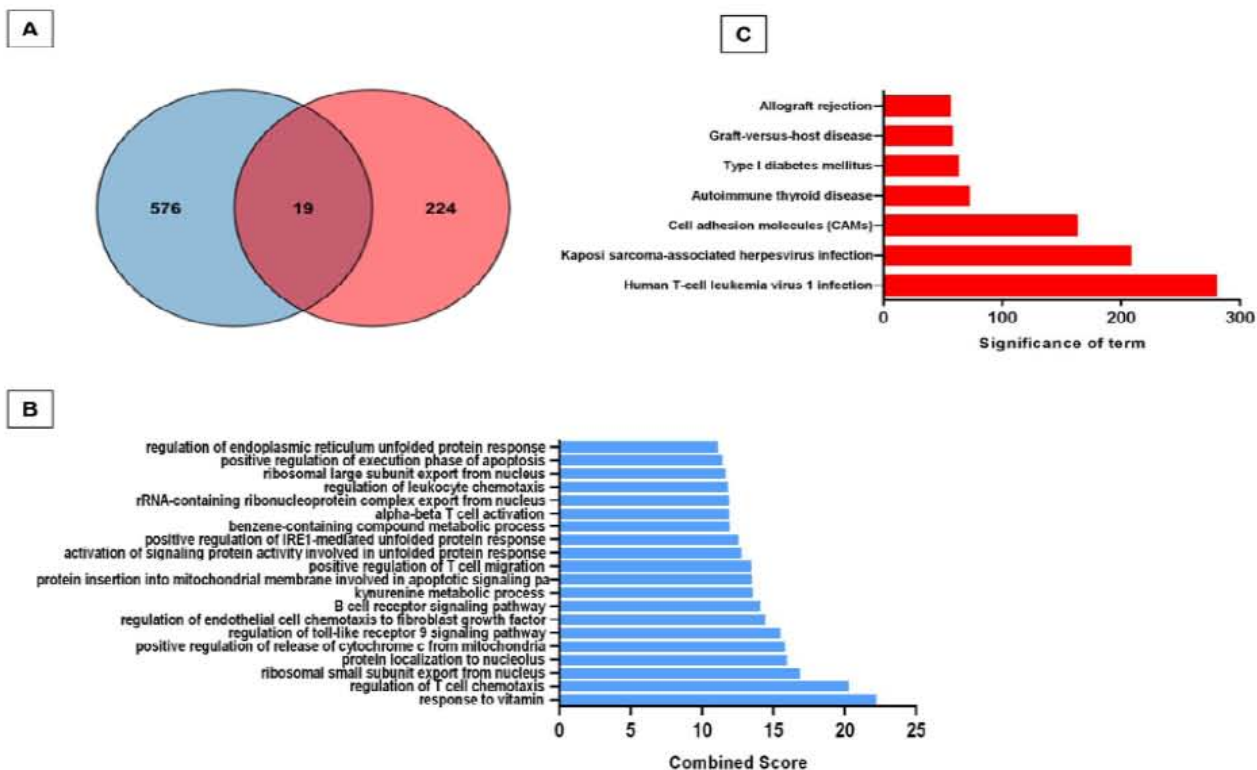
REFERENCES

1. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE Jr, Lynch DA, Nicholson AG, Ryerson CJ, Ryu JH, Selman M, Wells AU, Behr J, Bouros D, Brown KK, et al, and ATS/ERS Committee on Idiopathic Interstitial Pneumonias. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013; 188:733–48. <https://doi.org/10.1164/rccm.201308.1483ST>
2. King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2011; 378:1949–61. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60052-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60052-4)
3. Raghu G, Richeldi L. Current approaches to the management of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 2017; 129:24–30. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.05.017>
4. Selman M, King TE Jr, Pardo A, and American Thoracic Society, and European Respiratory Society, and American College of Chest Physicians. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med*. 2001; 134:136–51. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-2-200101160-00015>
5. Xu Y, Mizuno T, Sridharan A, Du Y, Guo M, Tang J, Wikenheiser-Brokamp KA, Perl AT, Funari VA, Gokey JJ, Stripp BR, Whitsett JA. Single-cell RNA sequencing identifies diverse roles of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight*. 2016; 1:e90558. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90558>
6. López Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013; 153:1194–217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
7. Selman M, López Otín C, Pardo A. Age driven developmental drift in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2016; 48:538–52. <https://doi.org/10.1183/13993003.00398-2016>
8. Jenkins RG, Moore BB, Chambers RC, Eickelberg O, Königshoff M, Kulb M, Laurent GJ, Nanthakumar CB, Olman MA, Pardo A, Selman M, Sheppard D, Sime PJ, et al, and ATS Assembly on Respiratory Cell and Molecular Biology. An Official American Thoracic Society Workshop Report: Use of Animal Models for the Preclinical Assessment of Potential Therapies for Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017; 56:667–79. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0096SI>
9. Sueblinvong V, Neveu WA, Neujahr DC, Mills ST, Rojas M, Roman J, Guidot DM. Aging promotes pro-fibrotic matrix production and increases fibrocyte recruitment during acute lung injury. *Adv Biosci Biotechnol*. 2014; 5:19–30. <https://doi.org/10.4236/abb.2014.51004>
10. Torres-González E, Bueno M, Tanaka A, Krug LT, Cheng DS, Polosukhin VV, Sorescu D, Lawson WE, Blackwell TS, Rojas M, Mora AL. Role of endoplasmic reticulum stress in age-related susceptibility to lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012; 46:748–56. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0224OC>
11. Hecker L, Logsdon NJ, Kurundkar D, Kurundkar A, Bernard K, Hock T, Meldrum E, Sanders YY, Thannickal VJ. Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance. *Sci Transl Med*. 2014; 6:231ra47. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008182>
12. Xu J, Gonzalez ET, Iyer SS, Mac V, Mora AL, Sutliff RL, Reed A, Brigham KL, Kelly P, Rojas M. Use of senescence-accelerated mouse model in bleomycin-induced lung injury suggests that bone marrow-derived cells can alter the outcome of lung injury in aged mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2009; 64:731–39. <https://doi.org/10.1093/gerona/glp040>
13. Naikawadi RP, Disayabutr S, Mallavia B, Donne ML, Green G, Ia II, Rock IR, Looney MR, Wolters PJ. Telomere dysfunction in alveolar epithelial cells causes lung remodeling and fibrosis. *JCI Insight*. 2016; 1:e86704. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.86704>
14. Pendás AM, Zhou Z, Cadiñanos I, Freije IM, Wang J, Hultenby K, Astudillo A, Wernerson A, Rodríguez F, Tryggvason K, López-Otín C. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet*. 2002; 31:94–99. <https://doi.org/10.1038/ng871>
15. Liu J, Yin X, Liu B, Zheng H, Zhou G, Gong L, Li M, Li X, Wang Y, Hu J, Krishnan V, Zhou Z, Wang Z. HP1α mediates defective heterochromatin repair and accelerates senescence in Zmpste24-deficient cells. *Cell Cycle*. 2014; 13:1237–47. <https://doi.org/10.4161/cc.28105>
16. Cushing L, Kuang PP, Qian J, Shiao F, Wu J, Little F, Thannickal VJ, Cardoso WV, Liu L. miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011; 45:287–94. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0323OC>
17. Xiao J, Meng XM, Huang XR, Chung AC, Feng YL, Hui DS, Yu CM, Sung JJ, Lan HY. miR-29 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Mol Ther*. 2012; 20:1251–60. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.36>

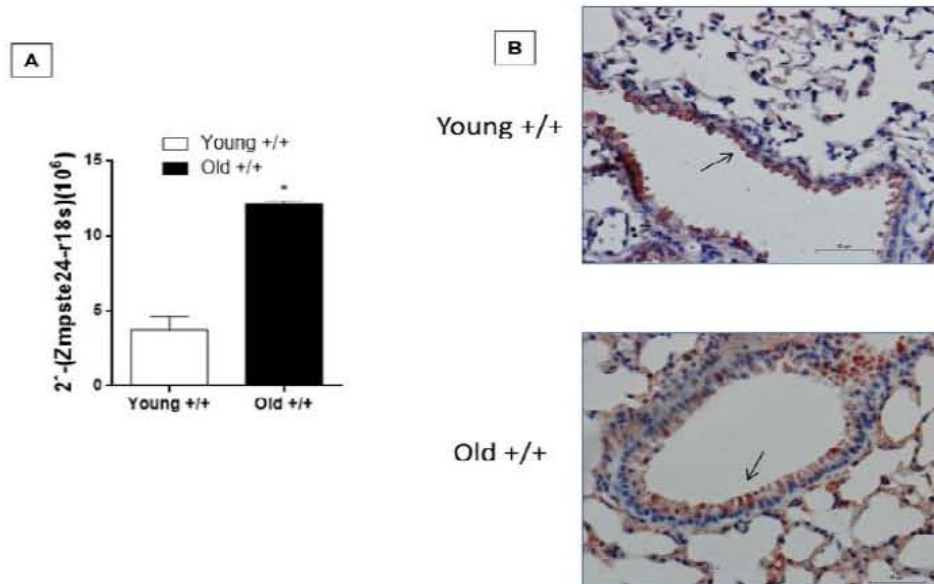
18. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43:D146–52. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1104>
19. Guler SA, Ellison K, Algamdi M, Collard HR, Ryerson CJ. Heterogeneity in Unclassifiable Interstitial Lung Disease. A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Am Thorac Soc.* 2018; 15:854–63. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201801-067OC>
20. Moore B, Lawson WE, Oury TD, Sisson TH, Raghavendran K, Hogaboam CM. Animal models of fibrotic lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013; 49:167–79. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0094TR>
21. Ugalde AP, Ramsay AJ, de la Rosa J, Varela I, Mariño G, Cadiñanos J, Lu J, Freije JM, López Otín C. Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53. *EMBO J.* 2011; 30:2219–32. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.124>
22. Osorio FG, Obaya AJ, López Otín C, Freije JM. Accelerated ageing: from mechanism to therapy through animal models. *Transgenic Res.* 2009; 18:7–15. <https://doi.org/10.1007/s11248-008-9226-z>
23. Varela I, Cadiñanos J, Pendás AM, Gutiérrez-Fernández A, Folgueras AR, Sánchez LM, Zhou Z, Rodríguez FJ, Stewart CL, Vega JA, Tryggvason K, Freije JM, López-Otín C. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature.* 2005; 437:564–68. <https://doi.org/10.1038/nature04019>
24. Hynes RO, Naba A. Overview of the Matrisome An Inventory of Extracellular Matrix. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4:1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903>
25. 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; 11:670–84. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1034409>
26. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becerril C, Yousem S, Herrera I, Ruiz V, Selman M, Kaminski N. Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med.* 2005; 2:e751. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020251>
27. Berman JS, Serlin D, Li X, Whitley G, Hayes J, Rishikof DC, Ricupero DA, Liaw L, Goetschkes M, O'Regan AW. Altered bleomycin-induced lung fibrosis in osteopontin-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 286:L1311–18. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00394.2003>
28. Johnson MD, Wu X, Athimitti N, Morrison RS. Peg3/Pw1 is a mediator between p53 and Bax in DNA damage-induced neuronal death. *J Biol Chem.* 2002; 277:23000–07. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201907200>
29. Kurakula K, Vos M, Logiantara A, Roelofs JJ, Nieuwenhuis MA, Koppelman GH, Postma DS, van Rijt LS, de Vries CJ. Nuclear Receptor Nur77 Attenuates Airway Inflammation in Mice by Suppressing NF-κB Activity in Lung Epithelial Cells. *J Immunol.* 2015; 195:1388–98. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401714>
30. Zhu F, Wang X, Zheng B, Wang Q, Hao I, Chen S, Zhao Q, Zhao L, Wu Z, Yin Z. miR-20b suppresses Th17 differentiation and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by targeting RORγt and STAT3. *J Immunol.* 2014; 192:5599–609. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303488>
31. Lu Y, Halder S, Croce K, Wang Y, Sakuma M, Morooka T, Wang B, Jeyaraj D, Gray SJ, Simon DI, Jain MK. Kruppel-like factor 15 regulates smooth muscle response to vascular injury—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30:1550–52. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207050>
32. López-Alonso I, Blázquez-Prieto J, Amado-Rodríguez L, González López A, Astudillo A, Sánchez M, Huidobro C, López-Martínez C, Dos Santos CC, Albaiceta GM. Preventing loss of mechanosensation by the nuclear membranes of alveolar cells reduces lung injury in mice during mechanical ventilation. *Sci Transl Med.* 2018; 10:eaam7598. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam7598>
33. Carter JH, Lefebvre JM, Wiest DL, Tourtellotte WG. Redundant role for early growth response transcriptional regulators in thymocyte differentiation and survival. *J Immunol.* 2007; 178:6796–805. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.11.6796>
34. Guo J, Lin Q, Shao Y, Rong L, Zhang D. miR-29b promotes skin wound healing and reduces excessive scar formation by inhibition of the TGF-β1/Smad/CTGF signaling pathway. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017; 95:437–42. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0248>
35. Cui H, Banerjee S, Xie N, Ge J, Liu RM, Matalon S, Thannickal VJ, Liu G. MicroRNA-21a-3p Is a Negative Regulator of Lung Fibrosis by Targeting Myofibroblast Differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016; 54:843–52. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0205OC>
36. Jiang F, Wang X, Liu Q, Shen J, Li Z, Li Y, Zhang L. Inhibition of TGF-β/SMAD3/NF-κB signaling by

- microRNA-491 is involved in arsenic trioxide-induced anti-angiogenesis in hepatocellular carcinoma cells. *Toxicol Lett.* 2014; 231:55–61. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.08.024>
37. Sun R, Liu Z, Tong D, Yang Y, Guo B, Wang X, Zhao L, Huang C. miR 491 5p, mediated by Foxi1, functions as a tumor suppressor by targeting Wnt3a/ β -catenin signaling in the development of gastric cancer. *Cell Death Dis.* 2017; 8:e2714. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.134>
 38. Mariño G, Ugalde AP, Salvador-Montoliu N, Varela I, Quirós PM, Cadiñanos J, van der Pluijm I, Freije JM, López Otín C. Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction. *Hum Mol Genet.* 2008; 17:2196–211. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn120>
 39. Woessner JF Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys.* 1961; 93:440–47. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90291-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90291-0)
 40. Pardo A, Ruiz V, Arreola JL, Ramírez R, Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Barrios R, Kala SV, Lieberman MW, Selman M. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167:925–32. <https://doi.org/10.1164/rccm.200209-1007OC>
 41. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods.* 2001; 25:402–08. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 42. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017. <https://www.R-project.org/>
 43. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, Bravo HC, Davis S, Gatto L, Girke T, Gottardo R, Hahne F, Hansen KI, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods.* 2015; 12:115–21. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3252>
 44. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43:e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
 45. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, Clark NR, Ma'ayan A. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics.* 2013; 14:128. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-128>
 46. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, Koplev S, Jenkins SL, Jagodnik KM, Lachmann A, McDermott MG, Monteiro CD, Gundersen GW, Ma'ayan A. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44:W90–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw377>
 47. Reimand J, Arak T, Adler P, Kolberg L, Reisberg S, Peterson H, Vilo J. g:Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Res.* 2016; 44:W83–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw199>

SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure 1. Bioinformatic analysis of changes associated to accelerated lung aging compared to normal lung aging. (A) Venn diagram of dysregulated genes in natural aging (old WT vs young WT) in blue circle, and dysregulated genes in accelerated aging (old *Zmpste24*^{-/-} vs young *Zmpste24*^{-/-}) in red circle. Light purple circle shows overlapping genes between both groups. (B and C) Gene ontology (B) and KEGG (C) functional analysis. Threshold criteria considered for the analysis are log fold-change > 1 or < -1 and p-value < 0.05 for genes, and >0.5 or <-0.5 for miRNAs.



Supplementary Figure 2. Lung expression and localization of *Zmpste24* in old and young WT mice. (A) qPCR of *Zmpste24* in lungs of old and young WT mice under basal conditions. Results are shown as mean \pm SD. Statistical significance was determined by Student's t-test (* $p < 0.05$). (B) Representative photomicrographs of immunohistochemical staining performed with specific primary antibody against *Zmpste24* in lungs from old and young WT mice under basal conditions. Positive signal is observed in bronchoalveolar epithelial cells (black arrows). All sections were counterstained with hematoxylin. Scale bar: 50µm.

SUPPLEMENTARY TABLES

Please browse Full Text version to see the data of Supplementary Tables related to this manuscript:

Supplementary Table 1. Top 50 upregulated and down regulated genes in old versus young WT mice.

Supplementary Table 2. Top 50 upregulated and down regulated genes in old versus young *Zmpste24* deficient mice.

Supplementary Table 3. Intercepted differentially expressed in lungs from old *Zmpste24* deficient mice compared with old WT littermates previously compared to their corresponding young counterpart.

Supplementary Table 4. Upregulated and downregulated genes in lungs from old bleomycin injured *Zmpste24* deficient mice compared with old WT littermates.

Supplementary Table 5. MicroRNAs differentially expressed in lungs from old bleomycin injured *Zmpste24* deficient mice compared with old WT littermates.