

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA (ETSIAMN)
Curso 2018/2019



Estudio del papel de la IL-11 en fibrosis pulmonar asociada a hipertensión pulmonar

Universidad de Valencia, departamento de farmacología.

AUTOR:

Carmen Pastor Catalá

DIRECTOR: Julio Cortijo Gimeno

TUTORA: Patricia Almudéver Folch

COTUTOR: Inés Roger Laparra

Valencia, Julio 2019

RESUMEN

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad intersticial de curso crónico y progresivo que se caracteriza por la activación de fibroblastos invasivos que se depositan y remodelan la matriz extracelular (ME) destruyendo el tejido. Una proporción de pacientes con FPI desarrolla hipertensión pulmonar (HP). La HP es una enfermedad que se caracteriza por presentar vasoconstricción y remodelado de las arterias pulmonares, aumentando la resistencia vascular pulmonar y la presión arterial. El desarrollo de ésta empeora sustancialmente la evolución de pacientes con FPI. A pesar de las numerosas investigaciones en la patogénesis de la FPI, las terapias disponibles son muy escasas. Actualmente los únicos fármacos antifibróticos aprobados para el tratamiento de la FPI son Nintedanib y Pirfenidona, sin embargo tienen toxicidades elevadas y no mejoran la supervivencia de los pacientes con dicha patología. Por ello es necesario la investigación de nuevas dianas terapéuticas con el fin de mejorar la supervivencia de los pacientes.

El objetivo general de dicho trabajo es el estudio del papel de IL-11 en pacientes con FPI asociada a HP. Para ello, se estudió la expresión y la distribución de IL-11 y su receptor, IL-11R α , en pacientes con FPI con o sin HP. Por otro lado, se hipotizó si la estimulación de células musculares de arteria pulmonar (PASMCs) y células microvasculares endoteliales de arteria pulmonar (HMVECs) con IL-11 inducía un fenotipo fibrótico con la transformación de dichas células a miofibroblastos invasivos.

Palabras clave: fibrosis pulmonar idiopática (FPI); Hipertensión pulmonar (HP); IL-11, miofibroblasto; farmacología.

ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic and progressive interstitial disease characterized by the activation of invasive fibroblasts that deposit and remodel the extracellular matrix (ME) by destroying the tissue. A proportion of patients with IPF develop pulmonary hypertension (PH).

The PH is a disease characterized by vasoconstriction and remodeling of pulmonary arteries, increasing pulmonary vascular resistance and blood pressure. The development of this worsens substantially the outcome of patients with IPF. Despite numerous investigations in the pathogenesis of IPF the available therapies are limited. Currently the only antifibrotic drugs approved for the treatment of FPI are Nintedanib and Pirfenidona, however they have high toxicities and do not improve the survival of patients with such pathology. Research on new therapeutic targets is therefore necessary in order to improve patient survival.

The overall aim of this project is the study of the role of IL-11 in patients with IPF associated with HP. For this purpose, the expression and distribution of IL-11 and its receptor, IL-11R α , were studied in patients with IPF with or without HP. On the other hand, it was hypothesized whether the stimulation of pulmonary artery muscle cells (PASMCs) and endothelial pulmonary artery microvascular cells (HMVECs) with IL-11 induced a fibrotic phenotype by transforming these cells to invasive myofibroblasts.

Key words: idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) ; Pulmonary Hypertension (PH); IL-11; myofibroblast; pharmacology

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA (FPI) | 1 |
| 1.1.1 Definición | 1 |
| 1.1.2 Características clínicas..... | 1 |
| 1.1.3 Epidemiología | 1 |
| 1.1.4 Fisiopatología | 2 |
| 1.2 HIPERTENSIÓN PULMONAR | 3 |
| 1.2.1 Definición | 3 |
| 1.2.2 Fisiopatología | 4 |
| 1.3 TRATAMIENTO ACTUAL FPI y FPI CON HP ASOCIADA | 4 |
| 1.4 PAPEL DE LA IL-11 EN FPI CON HP ASOCIADA | 5 |
| 1.4.1 Características generales: función, estructura y localización | 5 |
| 1.4.2 La IL-11 en fibrosis pulmonar..... | 6 |
| 2. OBJETIVOS | 7 |
| 3. MATERIALES | 8 |
| 3.1 REACTIVOS | 8 |
| 3.2 PACIENTES | 11 |
| 4. MÉTODOS | 12 |
| 4.1 TEJIDO PULMONAR | 12 |
| 4.1.1 Aislamiento de tejido pulmonar | 12 |
| 4.1.2 Obtención de suero | 12 |
| 4.1.3 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)..... | 12 |
| 4.1.4 Inmunohistoquímica..... | 12 |
| 4.2 CULTIVO CELULAR | 13 |
| 4.2.1 Aislamiento de PSMCs | 13 |
| 4.2.2 Cultivo celular primario | 13 |
| 4.2.3 Estimulación <i>in vitro</i> | 13 |
| 4.2.4 Ensayo de proliferación celular | 14 |
| 4.2.5 Ensayo de senescencia celular..... | 14 |
| 4.2.6 Western blot..... | 14 |
| 4.2.7 Transcripción Inversa (RT) y PCR en tiempo real..... | 16 |
| 5. RESULTADOS | 18 |
| 5.1 EXPRESIÓN PROTEICA Y DISTRIBUCIÓN DE LA IL-11 Y IL-11Rα EN TEJIDO PULMONAR Y SUERO DE PACIENTES CON FPI Y FPI CON HP ASOCIADA | 18 |
| 5.2 ESTUDIO DEL PAPEL DE LA IL-11 EN FPI CON HP ASOCIADA | 20 |
| 5.2.1 Expresión de marcadores profibróticos..... | 20 |
| 5.2.2 Influencia de IL-11 en la proliferación y senescencia | 22 |
| 5.2.3 Rutas de señalización activadas tras la estimulación con la IL-11. | 24 |
| 7. CONCLUSIONES | 29 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 30 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Orígenes de los miofibroblastos en la fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

Figura 2. Vías de señalización de la Interleucina-11 (IL-11).

Figura 3. Funcionamiento de las sondas TaqMan.

Figura 4. Expresión proteica de la IL-11, IL-11R α y CD31.

Figura 5. Expresión proteica de la IL-11 e IL-11R α .

Figura 6. Análisis inmunohistoquímico de la IL-11, IL-11R α , α -SMA y CD31.

Figura 7. IL-11 incrementa la expresión a nivel de ARNm de marcadores característicos de FPI, medidos en PSMCs.

Figura 8. IL-11 incrementa la expresión a nivel de ARNm de marcadores característicos de FPI, medidos en HMVECs-L.

Figura 9. Expresión proteica de marcadores profibróticos en PSMCs y HMVECs-L.

Figura 10. IL-11 induce proliferación celular en PSMCs y HMVECs-L.

Figura 11. IL-11 promueve senescencia celular en PSMCs y HMVECs-L.

Figura 12. Incremento en la expresión génica y proteica de p21 tras la estimulación con IL-11.

Figura 13. IL-11 promueve la activación de las principales vías de señalización implicadas en FPI en PSMCs.

Figura 14. IL-11 promueve la activación de las principales vías de señalización implicadas en FPI en HMVECs-L.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en inmunohistoquímica.

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en Western Blot.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.

ARN: ácido ribonucleico.

ATS: Sociedad Torácica Americana.

BrdU: bromodesoxiuridina.

BSA: seroalbúmina bovina.

PASMC: célula muscular lisa de arteria pulmonar.

CVRS: calidad de vida relacionada con la salud.

DAB: 3'-diaminobenzidina.

DLCO: capacidad de difusión pulmonar.

ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

EPI: enfermedad pulmonar intersticial.

EPID: enfermedad pulmonar intersticial difusa.

ERK ½: kinasa extracelular regulada por señal.

ERS: Sociedad Respiratoria Europea.

ET-1: endotelina 1.

FCDP: factor de crecimiento derivado de plaquetas.

FCEV: factor de crecimiento endotelial vascular.

FCF: factor de crecimiento de fibroblastos.

FDA: asociación de alimentos y fármacos.

FPI: Fibrosis Pulmonar Idiopática.

GP130: receptor de glucoproteína130

HMVEC-L: célula endotelial microvascular de arteria pulmonar.

HP: hipertensión pulmonar.

IL-11: Interleucina 11.

IL-6: Interleucina 6.

JAK: Janus quinasa.

ME: matriz extracelular.

p-JAK2: JAK2 fosforilada.

p-STAT3: STAT3 fosforilada.

PBS: tampón fosfato salino.

PBS: tampón salino fosfatado.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PVDF: polifluoruro de vinilideno.

SFB: suero fetal bovino.

STAT: transductor de señal y activador de la transcripción.

TCAR: tomografía computarizada de alta resolución.

TEM: transición epitelio – mesenquimal.

TEndM: transición endotelio – mesenquimal.

UIP: neumonía intersticial usual.

V: voltios.

α -SMA: α actina de músculo liso.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA (FPI)

1.1.1 Definición

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) se define como una enfermedad pulmonar intersticial fibrosante crónica de etiología desconocida que se presenta en individuos de edad avanzada y se caracteriza (1) por una remodelación difusa y progresiva del parénquima pulmonar con deposición de matriz extracelular (ME) y cicatrización irreversible (2).

La FPI pertenece a un grupo de enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID), que presentan alteraciones heterogéneas en el tracto respiratorio inferior, con afectaciones al tejido intersticial y al espacio alveolar (3). En la actualidad están descritas más de 200 entidades, aunque sólo es posible identificar el agente causal en aproximadamente un tercio de los casos. Según el consenso de la Sociedad Torácica Americana (ATS) y la Sociedad Europea Respiratoria (ERS), se distinguen tres grupos de EPID: de causa conocida o asociadas a otras enfermedades, neumonías intersticiales idiopáticas, y el tercer grupo formado por un conjunto de entidades que, a pesar de ser idiopáticas, presentan una clínica e histología bien definidas (4). Dentro de las EPIS, la FPI representa entre el 20 y el 30% y se subclasifica en el grupo de neumonías intersticiales idiopáticas (5).

1.1.2 Características clínicas

La historia natural de la FPI es muy variable y el curso de la enfermedad en un paciente individual es difícil de predecir. Entre los diferentes síntomas de la FPI se incluyen la disnea crónica y la tos seca, que tienen un impacto significativo en la calidad de vida relacionada con la salud (CVRS) de los pacientes, crépitos en la inspiración final y disminución del intercambio gaseoso (6,7).

El diagnóstico de FPI comienza a partir de una sospecha clínica de EPI, sin embargo, la falta de síntomas específicos y la coexistencia de otros trastornos retrasan el mismo. Para establecer un diagnóstico y descartar otras EPI o condiciones superpuestas, se necesitan características clínicas, radiográficas, serologías y, potencialmente, histopatología pulmonar (8). La exploración pulmonar respiratoria representa un elemento fundamental en el momento del diagnóstico, valoración de la evolución y del pronóstico de la enfermedad, así pues, a todo paciente con sospecha de EPID, se le debe realizar una espirometría, volúmenes, difusión de CO (DLCO) y valoración del intercambio gaseoso. El nivel de DLCO, en el momento del diagnóstico, es el parámetro más sensible en la detección precoz de la afectación intersticial y resulta muy útil en la monitorización de la enfermedad. La DLCO está normalmente disminuida y si es inferior al 40% respecto al valor de referencia indica enfermedad avanzada (4).

1.1.3 Epidemiología

La FPI es la más común de las neumonías intersticiales idiopáticas y en general, una de las formas más comunes de enfermedad pulmonar intersticial, con una prevalencia estimada de 50 por 100,000 (1). Sin embargo, las estimaciones precisas de la incidencia y la prevalencia de la FPI en las poblaciones son difíciles de establecer, y las estadísticas pueden variar considerablemente entre poblaciones, grupos étnicos y de un país a otro, resultando poco concluyentes (2). Así mismo, la interpretación de estos datos es difícil debido a que no hay un consenso en cuanto a la definición y clasificación de la enfermedad (8).

No obstante, numerosos estudios sugieren que la incidencia y la prevalencia de la FPI está aumentando y que está altamente asociada con la edad avanzada (la edad media en el momento del diagnóstico es de aproximadamente 65 años), siendo más prevalente en hombres que en mujeres (2). Está prácticamente ausente en pacientes menores de 50 años, pero está presente en aproximadamente el 0,2% de los mayores de 75 años (1).

Con relación a lo comentado anteriormente, las tasas de mortalidad también son muy variables, encontrándose rangos desde 3 hasta 9 pacientes por cada 100.000. Además, en todos los países en

estudio se confirma una clara asociación de mayores tasas de mortalidad en el sexo masculino así como con la edad y su aumento con el tiempo. Las investigaciones más recientes y el examen de los datos de ensayos clínicos sugieren que la supervivencia media está en el rango de 3-5 años desde el momento del diagnóstico (2).

1.1.4 Fisiopatología

Los pulmones son dos órganos situados en el tórax y a través de ellos se suministra oxígeno a los tejidos y se elimina el dióxido de carbono. El aire llega a los pulmones a través de la tráquea que se divide en dos bronquios principales, los cuales dan lugar a unos pequeños sacos llamados alvéolos. Las paredes de los alvéolos contienen multitud de pequeños vasos sanguíneos donde se produce el intercambio de gases durante la respiración. Estas paredes alveolares están formadas por endotelio capilar, membrana basal y epitelio alveolar. Este último forma una capa continua con dos tipos celulares, los neumocitos tipo I o neumocitos membranosos y los neumocitos tipo II o neumocitos granulares (9). Los neumocitos tipo II tienen funciones secretoras críticas (surfactante), metabólicas e inmunológicas y son células progenitoras para los neumocitos tipo I, que son las principales causas del recambio epitelial alveolar (8).

La mayoría de las EPID tienen una patogenia similar. Las teorías aceptadas en el pasado sostenían que, como consecuencia de la acción de un agente causal (conocido o no), se producen lesiones a nivel del epitelio alveolar, activando las células inflamatorias y células parenquimatosas que secretan mediadores celulares que actúan de forma autocrina y/o paracrina entre sí, dando lugar a una inflamación alveolar crónica (alveolitis) y a la aparición de fibrosis pulmonar (4). Sin embargo, actualmente la FPI se considera una enfermedad en la cual, un epitelio pulmonar disfuncional y envejecido, expuesto a microlesiones recurrentes, induce a un mecanismo de regeneración tisular defectuoso y a una intercomunicación epitelio-mesenquimal aberrante, creando un desequilibrio entre mediadores profibróticos y antifibróticos y manteniendo un ambiente que induce la actividad excesiva de fibroblastos y miofibroblastos, considerando que la inflamación constituye un fenómeno secundario (10).

Los miofibroblastos son una población de células mesenquimales que tienen características tanto de los fibroblastos como de las células del músculo liso. Estos producen proteínas de la matriz extracelular (ME), como colágenos fibrilares (tipos I y III), y tienen propiedades contráctiles dada su expresión de α -actina del músculo liso (α -SMA). En relación a su origen, los fibroblastos residentes y las células mesenquimales derivadas de las células epiteliales durante la EMT son fuentes importantes de miofibroblastos (11). Así mismo, también pueden diferenciarse a partir de fibrocitos (12), células epiteliales (transición epitelio – mesenquimal (TEM)) (13), células endoteliales (transición endotelio-mesenquimal (EndMT)) (14) células mesoteliales pleurales (CMPs) y pericitos (figura 1). Por ello, una de las principales características de la FPI es una deposición excesiva de proteínas de matriz extracelular seguida de la pérdida progresiva de la arquitectura alveolar normal.

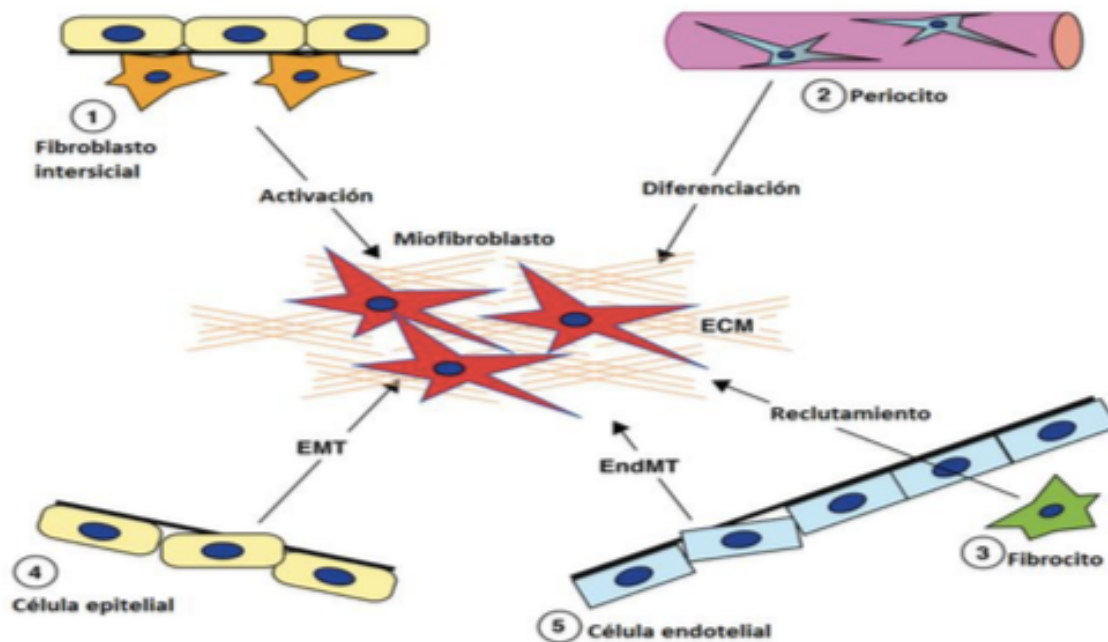


Figura 1. Orígenes de los miofibroblastos en la fibrosis pulmonar idiopática (FPI). El miofibroblasto en la FPI puede derivarse de fibroblastos residentes en el pulmón (fibroblasto-transición mesenquimatoso (TFM)), células epiteliales (TEM), células endoteliales vasculares (TEndM), fibrocitos de médula ósea, células mesoteliales y pericitos.

En condiciones normales, un daño en el epitelio induce la pérdida de células epiteliales alveolares de tipo I, y en respuesta a esto, las epiteliales alveolares de tipo II sufren una proliferación y diferenciación con la finalidad de restaurar la integridad alveolar en un proceso que involucra varios mecanismos como la cascada de coagulación, formación de nuevos vasos, activación y migración de fibroblastos y síntesis de matriz extracelular. Muchas quimiocinas, como el factor de crecimiento transformante (TGF- β 1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), factor de crecimiento vascular endotelial (FCVE) y factor de crecimiento de fibroblastos (FCF), todas ellas sobreexpresadas en el pulmón de pacientes FPI, lideran el proceso. Sin embargo, en pacientes con FPI, la exposición repetitiva del epitelio alveolar a microlesiones da lugar a una incapacidad para restablecer la normalidad del epitelio dañado (15).

1.2 HIPERTENSIÓN PULMONAR

1.2.1 Definición

El comportamiento clínico de la FPI muestra una heterogeneidad sustancial, incluida una variante acelerada y la presencia de exacerbaciones agudas. Además, dado que la FPI afecta en gran medida a personas mayores de 60 años, los pacientes tienen un mayor riesgo de presentar algunas comorbilidades, que a su vez tienen un impacto clínico notable en la enfermedad y aumentan la tasa de mortalidad. Entre las diferentes comorbilidades asociadas a la FPI cabe destacar la hipertensión pulmonar (HP), enfisema pulmonar, diabetes, cáncer de pulmón, enfermedades cardiovasculares, apnea del sueño obstructiva y enfermedad por reflujo gastroesofágico (16).

La hipertensión pulmonar (HP) se define como un aumento en la presión media de la arteria pulmonar (mPAP) > 25 mmHg en reposo, determinado por la cateterización cardíaca derecha (RHC) (17). Afecta a alrededor del 1% de la población mundial y en los mayores de 65 años, la prevalencia de HP se estima en alrededor del 10%. Sin embargo, las diversas formas de hipertensión pulmonar difieren considerablemente en incidencia y prevalencia (18).

La HP asociada a la FPI está incluida en el grupo de HP de clase 3 (asociadas a hipoxia), dentro de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (19). Supone una complicación grave de la FPI y contribuye significativamente a la morbilidad y la mortalidad. En cuanto a la prevalencia de la HP, en el momento del diagnóstico depende de la gravedad de la FPI y de la presencia de otras comorbilidades. Esta es difícil de estimar porque la mayoría de los estudios miden la presión sistólica de la arteria pulmonar con ecocardiograma transtorácico cuya precisión diagnóstica es cuestionable. Además, los síntomas de HP se superponen con la FPI, lo que dificulta aún más el diagnóstico (16).

Hasta la fecha, no hay disponible un tratamiento antihipertensivo específico para la hipertensión pulmonar asociada a la FPI, así pues, la investigación farmacológica en este campo podría ser de interés potencial para aminorar su progresión.

1.2.2 Fisiopatología

La fisiopatología de la hipertensión pulmonar difiere en presencia o ausencia de una enfermedad pulmonar. En presencia de FPI refleja un proceso multifactorial y complejo que implica muchas vías diferentes y mediadores.

En la circulación pulmonar normal, los vasos desprovistos de vasoconstricción activa juegan un papel fundamental en la regulación de la resistencia vascular pulmonar y la distribución del flujo sanguíneo pulmonar. A medida que aumenta el flujo sanguíneo pulmonar disminuye la resistencia vascular pulmonar. Sin embargo, la HP se caracteriza por presentar vasoconstricción pulmonar hipóxica y la destrucción del lecho capilar pulmonar, aumentando así la resistencia vascular pulmonar y la presión arterial.

La vasoconstricción pulmonar hipóxica también desempeña un papel importante en la regulación de la resistencia vascular pulmonar y el flujo sanguíneo pulmonar. Tiene múltiples mecanismos como resultado de los efectos directos de la hipoxia en las células del músculo liso vascular pulmonar, la liberación alterada de vasodilatadores derivados del endotelio, como el óxido nítrico y la prostaglandina, y el aumento de la expresión del péptido vasoconstrictor, endotelina. La endotelina-1 (ET-1), es un potente agente vasoconstrictor y mediador de la proliferación vascular. En pacientes con FPI se encuentra altamente expresada en el epitelio de las vías respiratorias (neumocitos tipo II) y en las células endoteliales.

Por otro lado, el remodelado vascular pulmonar engrosa la pared arterial y aumenta la resistencia al reducir el diámetro luminal. Esto reduce la capacidad del vaso para distenderse pasivamente y también potencia el aumento adicional en la resistencia vascular pulmonar producida por la vasoconstricción activa. Entre los diferentes factores que contribuyen a la remodelación vascular pulmonar en la fibrosis pulmonar se incluyen el factor de crecimiento transformante alfa (FCT- α), 5-lipoxigenasa, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (FCDP), factor de crecimiento de fibroblastos (FCF) (16,20).

1.3 TRATAMIENTO ACTUAL FPI y FPI CON HP ASOCIADA

En el año 2000, la Sociedad Torácica Americana (ATS), la Sociedad Europea Respiratoria (ERS), la Sociedad Respiratoria Japonesa (JRS) y la Asociación Torácica de América Latina (ALAT) proporcionó las pautas iniciales con criterios de diagnóstico específicos y una serie de directrices para el tratamiento de la FPI. Estas se actualizaron en el año 2011 y más recientemente en 2015.

La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA de los EE. UU.) aprobó recientemente la pirfenidona y el nintedanib para su uso en la FPI, lo que los convierte en los únicos medicamentos aprobados específicamente para el tratamiento de la misma (21). Aunque la pirfenidona y el nintedanib han demostrado ser eficaces para reducir las tasas de progresión de la enfermedad en comparación con el placebo, la enfermedad no se detiene ni se revierte y los pacientes continúan experimentando una disminución de la función pulmonar durante el tratamiento. Los diferentes mecanismos de acción putativos de pirfenidona y nintedanib proporcionan una justificación fisiológica para combinar estos dos agentes en un intento de reducir aún más el deterioro de la función pulmonar

en pacientes con FPI (22). Por un lado, la pirfenidona es un compuesto con efectos antiinflamatorios y acción antifibrótica, por su capacidad para inhibir la proliferación de fibroblastos, la biosíntesis de colágeno y la producción de TGF- β , aunque se desconoce su mecanismo de acción exacto. Generalmente se tolera bien, pero una minoría de pacientes interrumpe el tratamiento con pirfenidona debido a eventos adversos dermatológicos y gastrointestinales (23). Por otro lado, nintedanib es un inhibidor de la tirosina quinasa que bloquea la señalización intracelular de los receptores de FICP, los receptores de FCF y el receptor de FCEV (24). Los efectos adversos incluyen diarrea, pérdida de peso, toxicidad hepática y posibles riesgos de sangrado (16).

Las elevadas toxicidades de dichos fármacos junto a la morbilidad y la mortalidad significativas de la FPI, han impulsado un esfuerzo dedicado a encontrar una terapia eficaz, actualmente inexistente, para combatir dicha enfermedad. Para ello, es necesario la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

1.4 PAPEL DE LA IL-11 EN FPI CON HP ASOCIADA

1.4.1 Características generales: función, estructura y localización

La interleucina 11 (IL-11), miembro de la familia IL-6, es un factor de crecimiento pleiotrópico derivado de células estromales que ejerce múltiples efectos en los sistemas hematopoyéticos y no hematopoyéticos, y actúa sobre muchos tipos de células y tejidos diferentes. En el sistema hematopoyético, IL-11 promueve el crecimiento y la maduración de las células progenitoras de megacariocitos en presencia de IL-3 (25,26). Por otro lado, participa en numerosas actividades biológicas como la osteoclastogénesis, la neurogénesis y la fertilidad femenina, y también presenta propiedades antiinflamatorias.

La señalización de IL-11 depende de la formación de un complejo tripartito de ligando-receptor que consiste en la IL-11, la subunidad alfa del receptor de IL-11 (IL-11R α), tanto transmembrana como soluble, el cual es responsable de la especificidad de la interacción, y la subunidad β del receptor glucoproteína130 (gp130), responsable de la transducción de señales (figura 2). Se cree que IL-11 interactúa primero con IL-11R α con una afinidad baja ($K_d = 10$ nM) y que el complejo IL-11-IL-11R α interactúa posteriormente con gp130 para formar una afinidad alta ($K_d = 300-800$ pM) y el complejo de transducción de señales (27). Tras la formación del complejo de señalización, dos moléculas de gp130 se aproximan, lo que resulta en una auto-fosforilación de Jaks, que están asociadas de forma constitutiva con la porción intracelular de gp130, pero solo se activan tras la unión del ligando (28,29). Después de la activación, las quinasas fosforilan distintos residuos de tirosina dentro de la región intracelular de gp130, lo que permite la unión de factores de transcripción y la activación de cascadas de señalización intracelular.

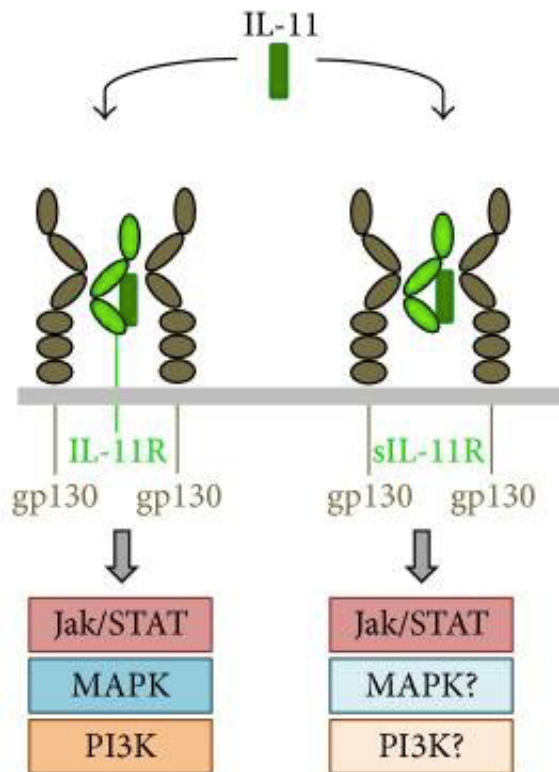


Figura 2. Vías de señalización de la Interleucina-11 (IL-11). La IL-11 (verde oscuro) puede unirse a las formas solubles y unidas a la membrana del IL-11R (verde claro) dando lugar a la homodimerización de gp130 y desencadenan por consiguiente, la cascada de señalización (30).

1.4.2 La IL-11 en fibrosis pulmonar

En estudios genómicos recientes, se descubrió que la IL-11 estaba sobreexpresada en el tejido pulmonar de pacientes con FPI (31). Por otro lado, diferentes autores revelan que IL-11 promueve la transición de fibroblastos a miofibroblastos y aumenta su motilidad, contracción, invasión y producción de matriz en fibrosis cardíaca. Además, describen que la IL-11 media la acción profibrótica del TGF β 1 así como de otros factores profibróticos como endotelina 1 (ET-1) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), ya que la IL-11 promueve la activación de los fibroblastos a través de las vías de señalización de ERK, entre otras. Las rutas ERK también son empleadas por otros factores profibróticos y, por lo tanto pueden ser coimplificadas por la IL-11 (32). Así pues, dado que las enfermedades fibróticas tienen características comunes parciales, reconocidas en estudios anteriores, se sugiere que la IL-11 mediante su unión al receptor puede contribuir a la fisiopatología de la fibrosis pulmonar y por tanto ser una posible diana terapéutica. Sin embargo, el mecanismo específico de la IL-11 y sus receptores en la fibrosis pulmonar aún no está claro, y será una de las direcciones de investigación importantes.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es el estudio del papel de la IL-11 en fibrosis pulmonar con hipertensión pulmonar asociada. Para ello se realizarán los siguientes objetivos específicos:

- Estudio de la expresión y distribución de IL-11 en arteria y parénquima pulmonar y en suero de sujetos sanos y pacientes con FPI con o sin hipertensión pulmonar asociada.
- Estudio del papel de IL-11 en células musculares de arteria pulmonar (PASMCs) y en células microvasculares endoteliales de pulmón (HMVECs-L), en la patogénesis de la FPI y FPI con HP asociada.
- Estudio de la eficacia de nintedanib y pirfenidona *in vitro* tras la estimulación con IL-11.

3. MATERIALES

3.1 REACTIVOS

| Reactivo | Casa comercial | Referencia |
|---|--------------------------|------------|
| 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) | Invitrogen | D1306 |
| Ácido cítrico anhidro | Panreac | 141808 |
| Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) | Sigma - Aldrich | ED2SC |
| Ácido etilenglicol-bis (β-aminoetil) -N, N, N', N'-tetraacético | Sigma - Aldrich | E3889 |
| Agua dietil pirocarbonato (DEPC) | Applied Biosystems | AM9906 |
| Bambanker | GC Lymphotec Inc | B4BB02 |
| Cloruro de sodio (NaCl) | Panreac | 141659 |
| Cócktel inhibidor de proteasa (Pr/I) | Sigma - Aldrich | P8340 |
| Dodecil sulfato de sodio (SDS) | Sigma - Aldrich | L3771 |
| DPBS | Biowest | L0615 |
| Etanol | Panreac | 361086 |
| Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) | Thermo Fisher Scientific | 36978 |
| Gel de poliacrilamida | Bio-Rad | 456-1094 |

| | | |
|--|--------------------------|--------------|
| Glicerol | Sigma - Aldrich | G5516 |
| Glicina | Sigma - Aldrich | G8898 |
| Hematoxilina | Sigma - Aldrich | GHS322 |
| HEPES | Sigma - Aldrich | H4034 |
| Human Interleukin 11 ELISA kit | Thermo Scientific | EHIL11 |
| Human Interleukin 11 Receptor Alpha (IL-11Ra) ELISA kit | MyBioSource | MBS047882 |
| IL-11 humana recombinante | Sigma - Aldrich | SRP3072 |
| Isopropanol (IPA) | Sigma - Aldrich | I-9516 |
| Kit de aislamiento de ARN total MagMAX™ -96 | Thermo Fisher Scientific | AM1830 |
| Kit de ensayo de proteínas de ácido bicinónico (BCA) | Thermo Fisher Scientific | 23225 |
| Kit de proliferación celular, ELISA BrdU | Roche | 11647229001 |
| Kit de tinción histoquímica de células senescentes | Sigma - Aldrich | CS0030 |
| Kit ECL plus | Amershan GE healthcare | RPN2232 |
| Kit TaqMan reverse transcription reagents | Applied Biosystem | N8080234 |
| Luminata™ Crescendo Western HRP substrate | Millipore | WBLUR0100 |
| Master Polymer Plus Detection System (Peroxidase) | Master diagnóstica | MAD-000237QK |

| | | |
|---|--------------------------|-----------|
| Medio basal de células endoteliales 2 (EBM-2) | Lonza | H3CC-3156 |
| Medio de crecimiento de células musculares lisas | PromoCell | C-22062 |
| Membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) | Bio-Rad | 1704157 |
| Nintedanib | Selleckchem | S1120 |
| Nonidet P40 | Fluka | 74385 |
| Parafina | Sigma - Aldrich | P3683 |
| Pirfenidona | Sigma - Aldrich | P2116 |
| Seroalbúmina bovina (BSA) | Sigma - Aldrich | A7906 |
| Spectra™ Multicolor Broad Range protein | Thermo Scientific | 26634 |
| β-mercaptoetanol | Sigma - Aldrich | M6250 |
| Suero Fetal Bovino (SFB) | Thermo Fisher Scientific | SH3007103 |
| Tampón 10X TGS | Bio-Rad | 161-0772 |
| Tampón fosfato salino (PBS) | Sigma-Aldrich | P4417 |
| Tampón Laemmli 2x (LB) | Bio-Rad | BR1610737 |
| Taqman® Gene Expression Master Mix | Applied Biosystems | 4369016 |
| Triple | Gibco | 12563029 |

| | | |
|---------------------|---------------|--------|
| Tritón X-100 | Panreac | 142314 |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich | P1379 |
| Xileno | Merck | 481769 |

3.2 PACIENTES

El tejido pulmonar humano se obtuvo de los Servicios de Cirugía Torácica y Patología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) (Valencia, España) y Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia (Valencia, España). Dicho tejido procede de 3 tipos de pacientes: **A)** pacientes con FPI (n=26). **B)** Pacientes con FPI y HP asociada (n=22). **C)** Pacientes sin FPI y sin HP con función pulmonar normal (n=32), empleados como controles.

Por otro lado, la sangre fue proporcionada por los Servicios de Neumología del CHGUV. Estas muestras corresponden a 3 tipos de pacientes: **A)** pacientes con FPI (n=8). **B)** Pacientes con FPI y HP asociada (n=10). **C)** Pacientes con función pulmonar normal (controles, n=12).

El diagnóstico de FPI y HP se realizó de acuerdo a las guías clínicas de la ERS/ATS, basado en tres criterios diagnósticos principales (33):

- Exclusión de otras causas conocidas de EPI.
- La presencia de un patrón UIP en HRCT en pacientes no sometidos a biopsia pulmonar quirúrgica.
- Combinaciones específicas del patrón UIP de biopsia pulmonar quirúrgica y TCAR en pacientes sometidos a biopsia pulmonar quirúrgica.

Antes de comenzar el estudio, se obtuvo la aprobación por el Comité Ético de Investigaciones Clínicas (CEIC) del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) además del consentimiento informado de cada uno de los participantes o representantes legales.

4. MÉTODOS

4.1 TEJIDO PULMONAR

4.1.1 Aislamiento de tejido pulmonar

A partir de una pieza pulmonar se aisló arteria y parénquima para realizar estudios de expresión proteica. Además, una pequeña parte de esta pieza se empleó en estudios de histología. Para ello, estas muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% durante al menos 48 h. A continuación, se deshidrataron en un gradiente de alcoholes y se transfirieron a xileno, miscible tanto en etanol al 100% como en parafina. Por último, las muestras se insertaron en bloques de parafina empleando el embebedor de parafina My3 EC150-1 (Leica Geosystems) y se cortaron en secciones de 5 μm de espesor utilizando un microtomo HM 340 E (Leica Geosystems). Por otro lado, la arteria y el parénquima aislados se homogenizaron en presencia del tampón de lisis con el sistema Tissuelyser II (Qiagen).

4.1.2 Obtención de suero

Para la obtención del suero, las muestras de sangre se dejaron a temperatura ambiente después de su extracción durante 30-40 minutos para que la coagulación sanguínea se llevase a cabo. A continuación, las muestras se introdujeron 1h en hielo y se centrifugaron a 3600 rpm durante 10 minutos a 4 ° C. Finalmente, se recogió el sobrenadante, correspondiente al suero purificado, y se transfirió a otro tubo eppendorf. Las muestras se mantuvieron a 4 ° C para realizar los análisis de expresión proteica correspondientes.

4.1.3 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Esta técnica se empleó para determinar las diferencias de expresión de IL-11 e IL-11 α a partir del suero, arteria y parénquima pulmonar de los distintos grupos experimentales. Se analizó la presencia de IL-11 mediante el Kit ELISA para IL-11 e IL-11 α . Estos kits utilizan la técnica de ELISA tipo sándwich, en la cual el anticuerpo específico contra la proteína de interés ya se encuentra anclado en la placa. De este modo, dichas placas se incubaron con concentraciones seriadas del reactivo proporcionado por el kit para establecer la recta patrón y por otro lado, con las muestras correspondientes. A continuación, se incubó con el anticuerpo de detección proporcionado por el kit, el cual tiene asociado una enzima modificadora del sustrato (HRP). Posteriormente, el sustrato (TMB) es modificado por esta enzima para provocar una señal cromogénica proporcional a la concentración de anticuerpo unido en el paso inicial. La absorbancia se midió a 450 nm empleando un espectrofotómetro Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer). Los resultados fueron extrapolados de la curva estándar.

4.1.4 Inmunohistoquímica

Para el análisis inmunohistoquímico de tejido pulmonar, las secciones recogidas en portas con carga positiva permanente se desparafinaron y se hidrataron en un gradiente de alcoholes (tabla x). A continuación, para la recuperación antigénica los portas se introdujeron en una cubeta con una solución de citrato 10 mM sumergida en agua hirviendo durante 10 minutos. Después de esto, para evitar la actividad endógena de la peroxidasa las muestras se incubaron 10 minutos en oscuridad con el reactivo de bloqueo de la peroxidasa proporcionado por el kit master polymer Plus Detection System. Las membranas celulares se permeabilizaron con Tritón al 0,1% y los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con 5% suero fetal bovino (SFB) en PBS. Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 4 ° C con el anticuerpo primario (tabla 1) durante toda la noche. Los anticuerpos empleados fueron CD31, IL-11, IL-11 α y α -SMA. Tras diversos lavados con PBS, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario del kit durante 30 minutos en oscuridad y se procedió al revelado. Para ello, sobre los portas se adicionó el sustrato 3'-diaminobenzidina (DAB) durante unos segundos para revelar la coloración. Finalmente, los cortes se tiñeron con hematoxilina durante 5-10 segundos para diferenciar los núcleos celulares y se deshidrataron para montar sobre DPX. Los cortes fueron analizados mediante un microscopio de luz Nikon Eclipse TE200.

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en inmunohistoquímica

| Anticuerpo | Casa comercial | Referencia |
|----------------|--------------------------|------------|
| CD31 | Sigma | SAB5600061 |
| IL-11 | Thermo Fisher Scientific | MA1-72508 |
| IL-11 α | Thermo Fisher Scientific | PA5-36544 |
| α -SMA | Cell Signaling | 19245S |

4.2 CULTIVO CELULAR

4.2.1 Aislamiento de PSMCs

Las células musculares de arteria pulmonar (PSMCs) fueron obtenidas a partir de arterias pulmonares de sujetos control. A partir de un lóbulo pulmonar se aisló la arteria intacta la cual se sumergió en un baño de colagenasa filtrada a 37°C en agitación durante 30 minutos. A continuación, se retiró la arteria y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante, y el pellet correspondiente a las células fue resuspendido en el medio de crecimiento de células musculares lisas.

4.2.2 Cultivo celular primario

A partir de las PSMCs aisladas y de células endoteliales microvasculares de arteria pulmonar (HMVECs-L) de origen comercial se realizaron los distintos cultivos celulares en monocapa. Estas se sembraron en frascos de 75 cm² con medio de crecimiento de células musculares lisas y con medio basal de células endoteliales 2 (BME-2) respectivamente. En este último caso, los frascos fueron previamente colagenizados con colágeno al 0,01%. Las células fueron mantenidas en un incubador con una atmósfera controlada de 5% de CO₂ y a 37°C. El medio fue cambiado periódicamente para favorecer la proliferación celular. Una vez alcanzada una confluencia igual o superior al 80% se realizaron subcultivos mediante tripsinización estándar.

Las células de los pases 3 a 10 se utilizaron en los experimentos descritos en el presente estudio.

4.2.3 Estimulación *in vitro*

Para el estudio *in vitro*, las PSMCs y HMVECs-L fueron estimuladas con IL-11 recombinante a la concentración y tiempo óptimos para cada experimento. Además, 30 minutos antes del estímulo se adicionaron pirfenidona y nintedanib, únicos fármacos aprobados para tratar la FPI. Ninguno de los dos fármacos afectó a la viabilidad celular, evaluada con azul de tripano. Así pues, se dispuso de 4 condiciones diferentes en cada uno de los experimentos: control, IL-11, IL-11+ Nint e IL-11+Pirf.

4.2.4 Ensayo de proliferación celular

La proliferación celular fue evaluada mediante un inmunoensayo colorimétrico que cuantifica la proliferación midiendo la incorporación de BrdU durante la síntesis de ADN a medida que las células se replican. De este modo, la presencia de células no proliferativas y residuos de células muertas no afectan a los resultados.

En primer lugar, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos donde se incubaron con nintedanib y pirfenidona 30 minutos. Posteriormente se estimuló con 5ng/ml de IL-11 recombinante. 24h después, tal como se indica en el protocolo correspondiente al kit de proliferación celular ELISA BrdU, se adicionó la solución de marcaje BrdU a las células y se volvió a incubar durante 24h. A continuación, se retiró el medio y se añadió la solución FixDenat del kit durante 30 minutos con el objetivo de fijar las células y desnaturalizar el ADN. Finalmente, las células se incubaron con el anticuerpo anti-BrdU POD proporcionado y tras varios lavados se añadió la tetrametilbencidina (TMB) como sustrato de reacción. La absorbancia fue medida a 450 nanómetros (nm) utilizando un espectrofotómetro de microplacas Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer). Los valores de absorbancia de cada pocillo hacen referencia a los datos de proliferación celular.

4.2.5 Ensayo de senescencia celular

En este experimento, las células fueron sembradas en cámaras Millicell EZslide de 4 pocillos. Tras la adición de los fármacos y del estímulo de IL-11 recombinante durante 48h, se procedió a la identificación de células senescentes. Para ello, se empleó el Kit de tinción histoquímica de células senescentes. Este kit se basa en una tinción histoquímica para la actividad de β -galactosidasa a pH 6. En estas condiciones, la actividad de la β -galactosidasa es fácilmente detectable en las células senescentes, pero no detectable en células tumorales, inmortales o quiescentes. Así pues, atendiendo al protocolo correspondiente, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con el tampón de fijación proporcionados por el kit durante 6-7 minutos a temperatura ambiente. A continuación, tras realizar diversos lavados, se añadió la mezcla de tinción y las células se incubaron a 37°C durante toda la noche sin CO₂ en una estufa (Memmert). Finalmente, las células se observaron bajo un microscopio invertido (Leica DM6000B) para contar las células teñidas de azul y el número total de células en cada campo.

4.2.6 Western blot

Esta técnica se empleó para determinar diferencias de expresión a nivel proteico entre las distintas condiciones experimentales a partir de PSMCs y HMVECs-L. Previamente, las células sembradas en placas de 6 pocillos se rasparon y se homogenizaron en presencia de 500 μ l de solución de lisis constituida por tampón C (HEPES 0,02 M; EDTA 0,001 M; etileno glicol 0,001 M; bis (β -aminoetil éter) -N, N, N', N'-ácido tetraacético (EGTA); NaCl 0,4 M y glicerol al 21,1%) inhibidor de la proteasa completo y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Para la extracción de proteínas se realizó un procedimiento de lisis por choque térmico (nitrógeno líquido/37°C). Tras sucesivos ciclos, se llevó a cabo un tratamiento con el detergente nonidet P-40 al 10% durante 15 minutos en hielo. Finalmente, se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante.

A partir del sobrenadante se realizó la cuantificación del nivel de proteína mediante el kit de ensayo ácido bicinonínico (BCA) con seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. Este método se basa en la conversión de Cu²⁺ a Cu¹⁺ en condiciones alcalinas (reacción de Biuret). La cantidad de Cu²⁺ reducido es función de la concentración de proteínas y es determinada espectrofotométricamente por un cambio en el color de la solución a púrpura, que absorbe a 562 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución.

Para la separación de proteínas de acuerdo con su peso molecular, se empleó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS). Previamente se desnaturalizaron las proteínas con tampón Laemmli 2X que contenía β -mercaptoetanol (1: 1) durante 10 minutos en agitación a 95°C. Posteriormente, se cargó 20 μ g de proteína para cada una de las muestras junto con el marcador de peso molecular Spectra™ Multicolor Broad Range protein en un gel

de resolución de acrilamida al 4-20%. Inicialmente se aplicó un voltaje de 100V y una vez la muestra pasó el “Stacking gel” se aumentó a 240V hasta que la muestra se salió del gel. A continuación, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) mediante el sistema de transferencia semi-húmedo Trans-Blot® Turbo™ Transfer System. La membrana se bloqueó con BSA o leche al 5% en PBS 0,01% Tween20 durante 2h para evitar las uniones inespecíficas y se incubó con el anticuerpo primario (tabla 2) a 4°C durante toda la noche. Después se volvió a incubar con el anticuerpo secundario correspondiente 1h y se llevó a cabo la detección de las proteínas marcadas. Estas se detectaron a partir de la emisión de quimioluminiscencia que tiene que tiene lugar como consecuencia de la reacción del sustrato del kit ECL plus con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP).

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en Western Blot.

| Epítipo | Referencia | Dilución | Tampón |
|-------------------------------|--------------------------------|-----------------|--------------------------------------|
| AKT | Abcam (ab47432) | 1:1000 | Leche 5%/PBST |
| Colágeno I | Calbiochem (234167) | 1:1500 | Leche 5%/PBST |
| HRP - IgG (H+L) Conejo | Invitrogen (SA1-200) | 1:5000 | Leche 5%/PBST BSA 5%/PBST |
| HRP - IgG (H+L) Ratón | Invitrogen (SA1-100) | 1:5000 | Leche 5%/PBST BSA 5%/PBST |
| Jak2 | Novus biologicals (NBP1-61916) | 1:500 | Leche 5%/PBST |
| p-AKT | Cell signaling (9271) | 1:5000 | BSA 5%/PBST |
| p-ERK 1/2 | Sigma-Aldrich (M-9692) | 1:5000 | BSA 5%/PBST |
| p-JAK 2 | Cell Signaling (4406S) | 1:250 | BSA 5%/PBST |
| p-SMAD3 | Novus biologicals (NBP1-77836) | 1:1000 | BSA 5%/PBST |
| p-STAT3 | Cell Signaling (9145S) | 1:1000 | BSA 5%/PBST |

| | | | |
|---|--|--------|----------------------|
| P21 | Millipore (MAB88058) | 1:200 | Leche 5%/PBST |
| SMAD3 | Novus biologicals (NBP1-19495) | 1:1000 | Leche 5%/PBST |
| β-actina | Sigma-Aldrich (A1978) | 1:5000 | Leche 5%/PBST |
| β-catenina activada | Thermo Fisher Scientific (MA1-301) | 1:1000 | Leche 5%/PBST |
| STAT3 | Novus biologicals (NB100-91973) | 1:1000 | Leche 5%/PBST |
| VE-cadherina | Millipore (MABT134) | 1:500 | Leche 5%/PBST |
| α-SMA | Sigma-Aldrich (A5228) | 1:1000 | Leche 5%/PBST |

4.2.7 Transcripción Inversa (RT) y PCR en tiempo real

Para determinar las diferencias a nivel de expresión génica se realizó la la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Esta técnica permite la amplificación y cuantificación simultánea de producto génico. En primer lugar, se realizó la extracción de ARN con el extractor automático empleando el kit de aislamiento de ARN total MagMAX[™] -96. Atendiendo al protocolo, las PSMCs y HMVECs-L fueron raspadas y homogenizadas en presencia del tampón de lisis correspondiente al kit. A continuación, se cargó la placa de 96 pocillos con los reactivos y las muestras correspondientes y se acopló en el extractor automático (Thermo Scientific). La cuantificación y pureza del ARN extraído se evaluó mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Por otro lado, la transcripción reversa se realizó empleando el kit TaqMan reverse transcription reagents. Se obtuvo el ADN complementario (ADNc) a partir del cual se realizó la amplificación y cuantificación mediante un sistema de PCR en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems) usando Taqman[®] Gene Expression Master Mix. Para la amplificación se emplearon cebadores y sondas Taqman específicos diseñados por Applied Biosystems (figura 3).

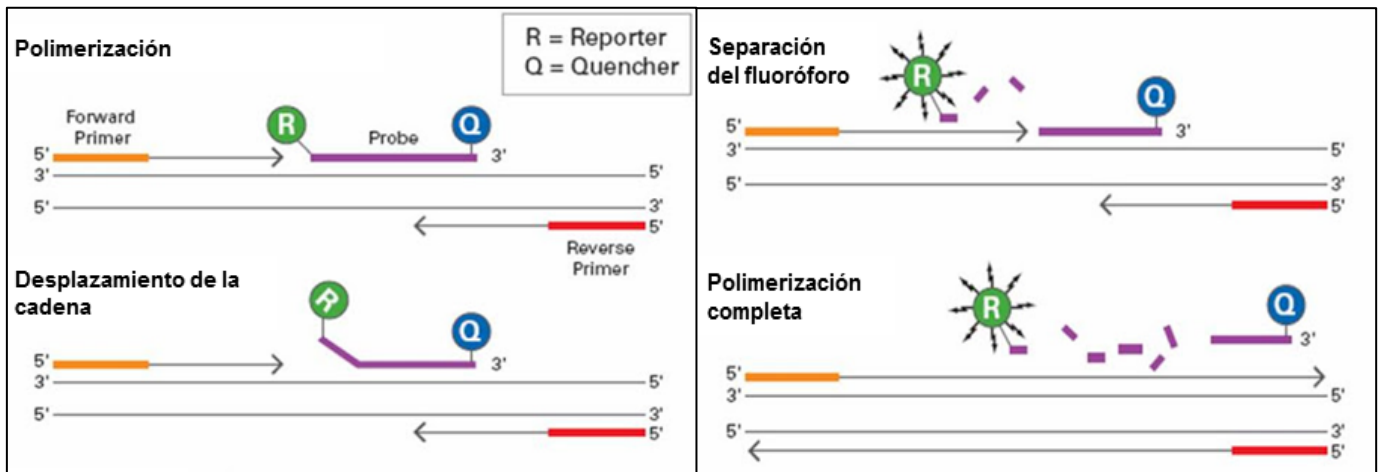


Figura 3. Funcionamiento de las sondas TaqMan.

5. RESULTADOS

5.1 EXPRESIÓN PROTEICA Y DISTRIBUCIÓN DE LA IL-11 Y IL-11R α EN TEJIDO PULMONAR Y SUERO DE PACIENTES CON FPI Y FPI CON HP ASOCIADA.

Con el objetivo de evaluar los niveles de expresión de la IL-11 en pacientes con FPI y FPI con HP asociada, se decidió estudiar la expresión y distribución tanto de IL-11 como de IL-11R α en tejido pulmonar y suero de pacientes diagnosticados con dicha patología. Para poder llevar a cabo estos estudios, fueron empleadas arteria y parénquima pulmonar, suero y tejido pulmonar.

En la figura 4, se puede observar un incremento significativo ($p < 0,05$) en los niveles de expresión proteica de IL-11 e IL-11R α con respecto al control, en pacientes con FPI e HP asociada tanto en arteria como en parénquima pulmonar, y en menor medida en pacientes con FPI. Por lo que respecta a CD31, marcador de células endoteliales, se observa un descenso en el nivel de expresión en pacientes con FPI e HP y en menor medida en pacientes con FPI, en comparación a los sujetos control. Ello puede ser resultado de la pérdida del fenotipo endotelial como consecuencia de la transición endotelio-mesenquimal (TEndM) que tiene lugar.

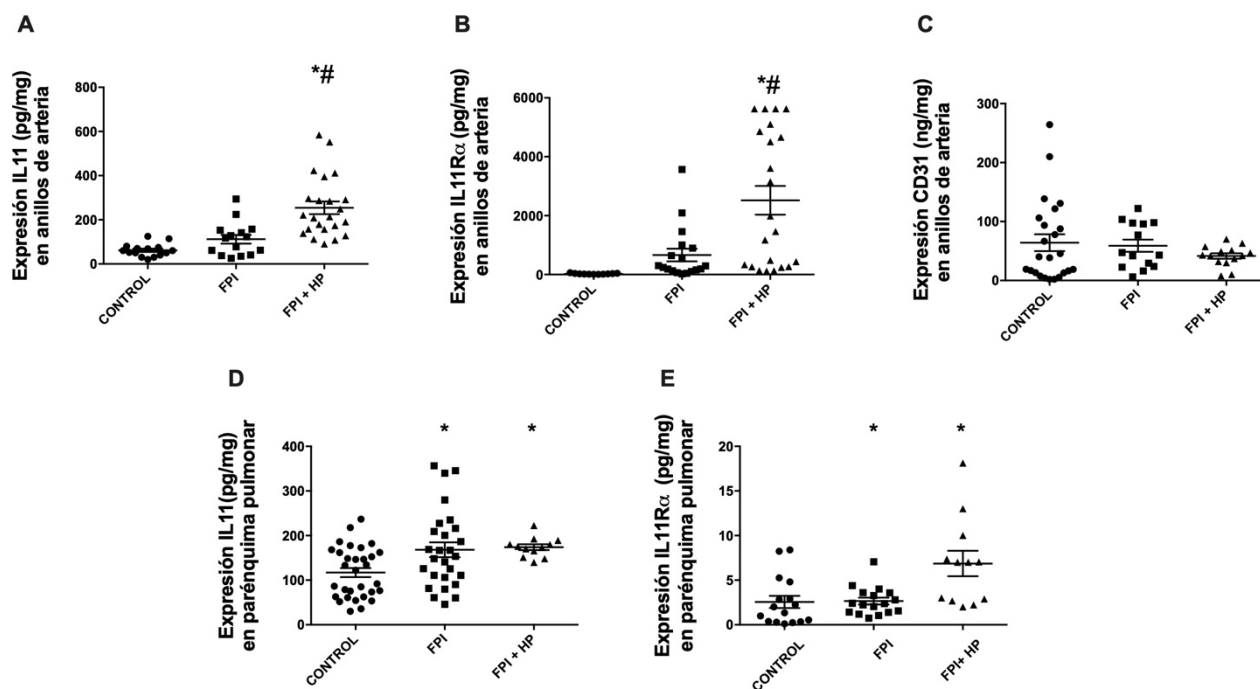


Figura 4. Expresión proteica de la IL-11, IL-11R α y CD31. Niveles de expresión proteica en arteria y parénquima pulmonar respectivamente de IL-11 (A, D), IL-11R α (B, E) y CD31 (C) determinados mediante ELISA. Los datos se muestran expresados con la media \pm SEM de $n=32$, $n=26$ y $n=22$ sujetos control, pacientes con FPI y FPI con HP asociada respectivamente. (* $p < 0,05$ respecto control, # $p < 0,05$ respecto FPI).

En la figura 5 se puede observar que en el suero de pacientes con FPI e HP asociada, de igual modo que ocurría en arteria y parénquima pulmonar, existe un aumento significativo en los niveles de expresión proteica de la IL-11 e IL-11 R α con respecto a los sujetos control. Para el caso de pacientes con FPI, los niveles de expresión de IL-11 y de su receptor también se observaron aumentados significativamente con respecto al control.

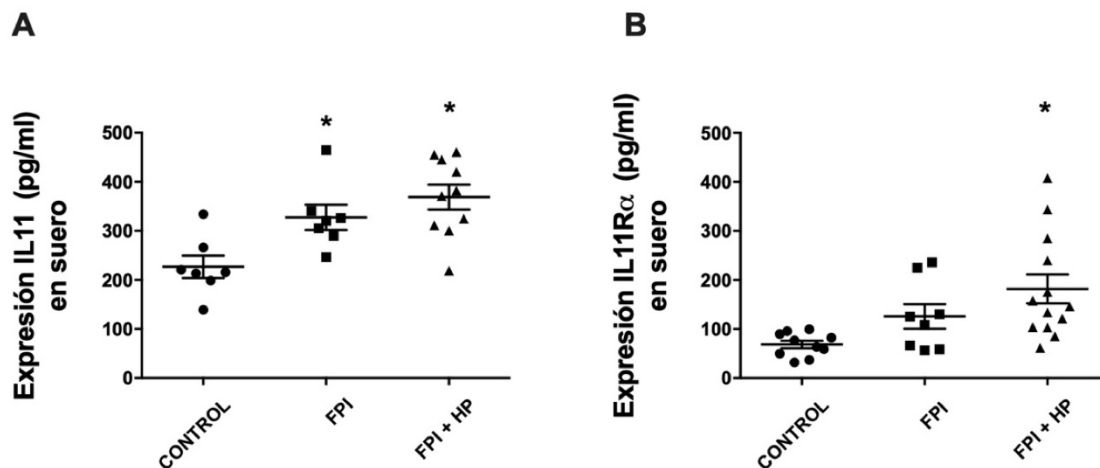


Figura 5. Expresión proteica de la IL-11 e IL-11R α . Niveles de expresión proteica en suero de IL-11 (A) e IL-11R α (B) determinados mediante ELISA. Los datos se muestran expresados con la media \pm SEM de n=8, n=10 y n=12 sujetos control, pacientes con FPI y FPI con HP asociada respectivamente. (*p<0,05 respecto control)

Finalmente, la figura 6 muestra imágenes de secciones histológicas de tejido pulmonar de sujetos control, pacientes con FPI y pacientes con FPI + HP inmunoteñidas con anticuerpos dirigidos a IL-11, IL-11R α , α -SMA y CD31. En todos los casos, se puede observar como en los grupos FPI y FPI + HP la densidad y estructura del tejido pulmonar es mucho más pronunciada que en el caso de sujetos control. En este último caso, el parénquima que se observa está perfectamente estructurado y aireado.

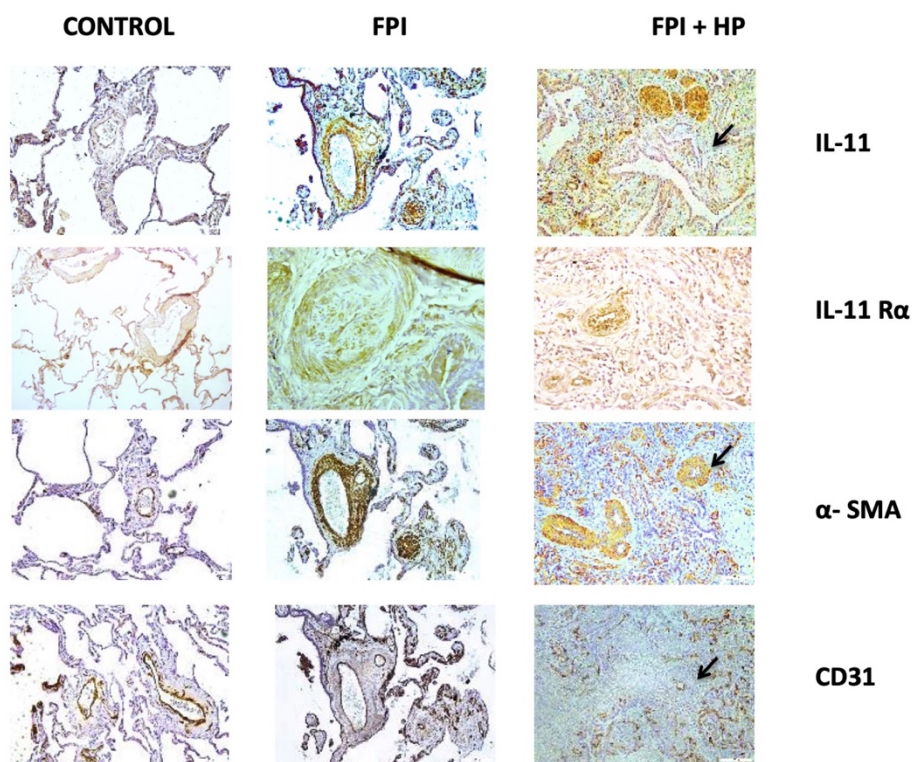


Figura 6. Análisis inmunohistoquímico de la IL-11, IL-11R α , α -SMA y CD31. Imágenes de secciones histológicas representativas de tejido pulmonar humano de sujetos control, pacientes FPI y FPI + HP. Estas secciones fueron inmunoteñidas con anticuerpos anti-IL-11, anti-IL-11R α , anti- α -SMA, marcador de músculo liso, y anti-CD31, marcador de células endoteliales. El tejido fue contrateñido con hematoxilina. La barra de escala corresponde a 50 μ m.

Por lo que respecta a la expresión y distribución de los marcadores analizados, en la figura 6 se puede observar que en el caso de pacientes patológicos de ambos grupos la expresión de la IL-11 y su receptor se vio incrementada. Por otro lado, dicha interleucina y su receptor se distribuyen principalmente en arteria pulmonar. En cuanto a α -SMA, se observa un aumento en la expresión en pacientes con FPI y FPI + HP como resultado del remodelado arterial. Por último, se vio una pérdida de expresión del marcador de células endoteliales, CD31, en pacientes con FPI + HP fundamentalmente debido a la transición endotelio-mesenquimal.

5.2 ESTUDIO DEL PAPEL DE LA IL-11 EN FPI CON HP ASOCIADA.

5.2.1 Expresión de marcadores profibróticos

La HP se caracteriza por presentar vasoconstricción pulmonar hipóxica y la destrucción del lecho capilar pulmonar, aumentando así la resistencia vascular pulmonar y la presión arterial. Por otro lado, en la FPI, la proliferación incontrolada de miofibroblastos da lugar a una acumulación de ME, teniendo lugar una producción excesiva de sustancias fibrilares tales como colágeno tipo I. Con la finalidad de comprobar que realmente tenía lugar la vasoconstricción y el remodelado arterial, se llevaron a cabo estudios de medida del nivel de expresión génica y proteica de diferentes marcadores profibróticos como Colágeno tipo I, Vimentina, FCF, FCVE, ACTA y VE-Cadherina en PASMCS y HMVECS-L estimuladas con IL-11.

En PASMCS estimuladas con IL-11 y sin tratamiento farmacológico se puede observar un incremento significativo ($p < 0,05$) con respecto al control, en los niveles de expresión de ARNm de Colágeno tipo I, componente principal de la ME, (figura 7 A), Vimentina, marcador de células mesenquimales (figura 7 B), FCVE (figura 7 C) y FCF (figura 7 D), los cuales lideran el proceso de remodelación vascular en fibrosis pulmonar (figura 7).

Cabe destacar, que el nivel de expresión de ARNm de los marcadores profibróticos se ve disminuido tras el tratamiento con pirfenidona y nintedanib, los dos únicos fármacos hasta ahora aprobados por la FDA para el tratamiento de la FPI.

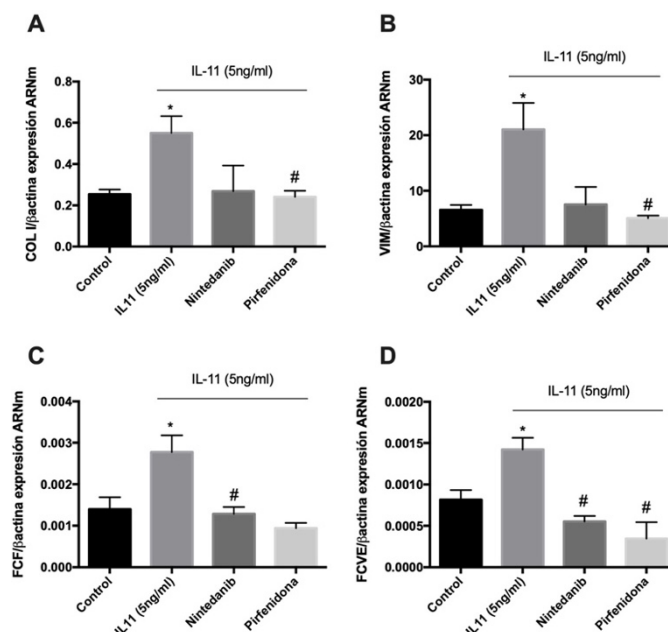


Figura 7. IL-11 incrementa la expresión a nivel de ARNm de marcadores característicos de FPI, medidos en PASMCS. El ARNm total fue aislado de PASMCS tratadas con nintedanib o pirfenidona y estimuladas con IL-11 a 5ng/ml. Los niveles de expresión de ARNm de Col I, VIM, FCVE y FCF fueron determinados mediante RT-PCR. Los datos están expresados como el ratio respecto a los niveles del ARNm de β -actina. Los datos son presentados como la media \pm SEM de $n=3$ experimentos independientes (* $p < 0,05$ respecto control; # $p < 0,05$ respecto IL-11).

Por otro lado, la figura 8 muestra los niveles de expresión de ARNm de Vimentina (figura 8 A), ACTA (figura 8 B), Col I (Figura 8 C), FCF (figura 8 D), FCVE (figura 8 E) los cuales se encontraron sobreexpresados en las células estimuladas con IL-11. Sin embargo, la expresión de VE-cadherina (figura 8 F) en HMVEC-L estimuladas con IL-11 fue menor debido a la disfunción endotelial que tiene lugar en la HP.

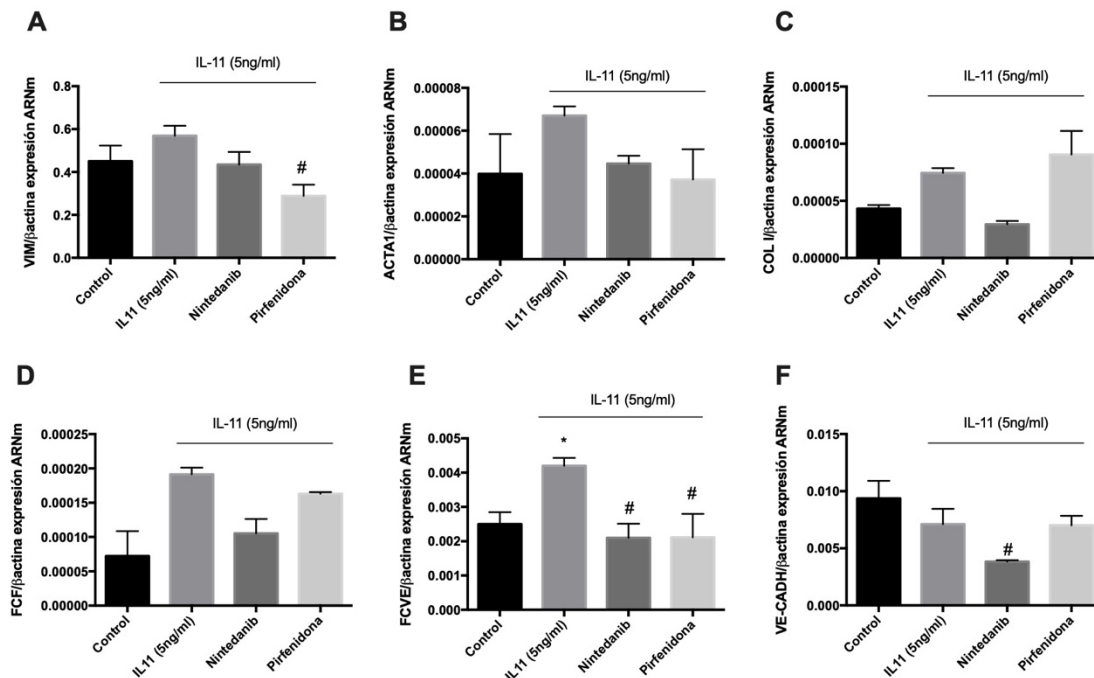


Figura 8. IL-11 incrementa la expresión a nivel de ARNm de marcadores característicos de FPI, medidos en HMVEC-L. El ARNm total fue aislado de HMVEC-L tratadas con nintedanib o pirfenidona y estimuladas con IL-11 a 5ng/ml. Los niveles de expresión de ARNm de VIM, ACTA, COL I, FCVE, FCF y VE-cadherina, fueron determinados mediante RT-PCR. Los datos están expresados como el ratio respecto a los niveles del ARNm de β -actina y se han normalizado en función del grupo control. Los datos son presentados como la media \pm SEM de n=3 experimentos diferentes (* p <0,05 respecto control; # p <0,05 respecto IL-11).

Cabe destacar que nintedanib y pirfenidona consiguen revertir esta situación de forma general. Como se observa en la figura 8 D y E, las HMVEC-L tratadas con nintedanib reducen considerablemente la expresión de FCF y FCVE. Ello es resultado del mecanismo de acción del fármaco, el cual se une competitivamente al sitio de unión a ATP de los receptores del FCF y FCVE causando el bloqueo de sus rutas de señalización.

Como resultado de la TEndM y activación de miofibroblastos, en la figura 9, se puede observar como, coincidiendo con los estudios de expresión de ARNm (figura 7 A y figura 8 C), los niveles de expresión proteica del marcador de matriz extracelular (COL I) se vieron incrementados significativamente (p <0,05) con respecto al caso control en PSMCs y HMVEC-L estimuladas con IL-11. En cuanto al marcador de miofibroblastos activados (α -SMA) también se observó un aumento significativo (p <0,05) en los niveles de expresión, respecto al caso control, en PSMC estimuladas con IL-11.

Por lo que respecta a VE-cadherina, el nivel de expresión proteico es significativamente menor (p <0,05) en HMVEC-L estimuladas con IL-11 en comparación al caso control, evidenciando de este modo, la pérdida del fenotipo endotelial. Sin embargo, se observa que las HMVEC-L previamente

tratadas con nintedanib o pirfenidona incrementan significativamente la expresión de VE-cadherina en comparación a las HMVEC-L sin tratamiento farmacológico (figura 9 B).

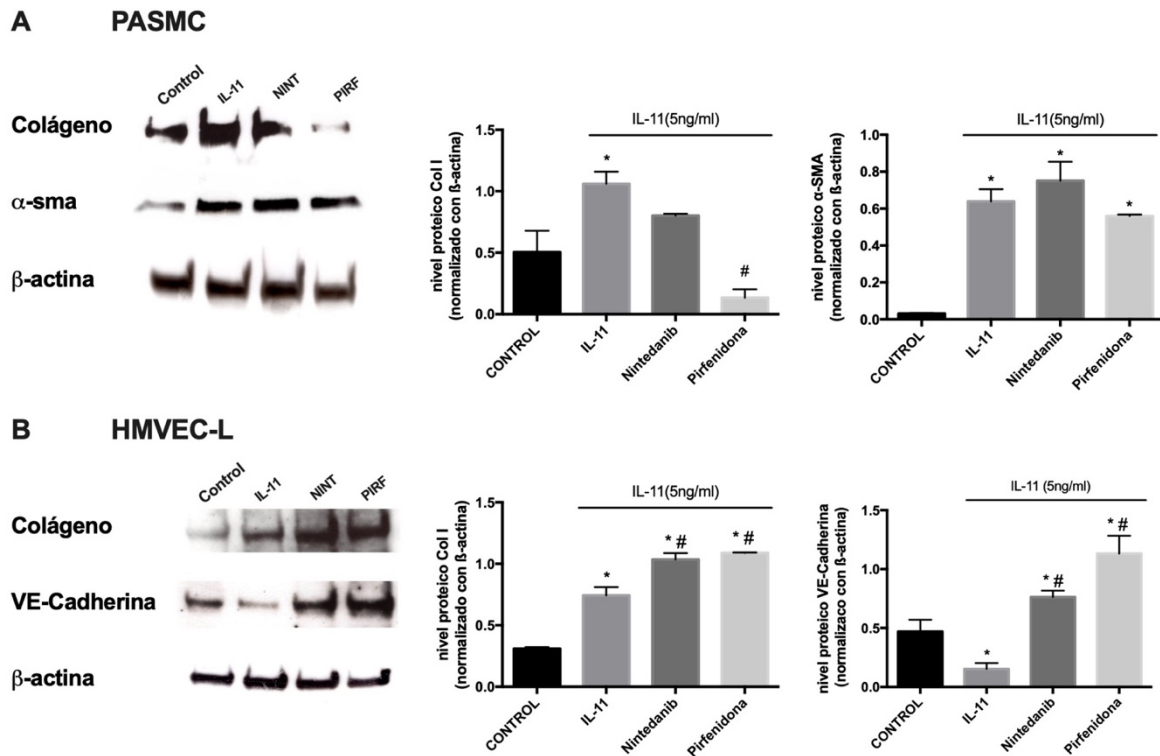


Figura 9. Expresión proteica de marcadores profibróticos en PSMCs y HMVECs-L. La proteína total fue aislada de PSMCs y HMVECs-L tratadas con nintedanib o pirfenidona y estimuladas con IL-11 a 5ng/ml. Los niveles de expresión proteica fueron determinados mediante Western Blot. (A) Niveles de expresión proteica de COL I y α -SMA en PSMCs. (B) Niveles de expresión proteica de COL I y VE-cadherina, en HMVECs-L. (* $p < 0,05$ respecto control, # $p < 0,05$ respecto FPI).

5.2.2 Influencia de IL-11 en la proliferación y senescencia

La senescencia y proliferación celular son dos procesos clave en la enfermedad de la FPI. IL-11 parece promover la senescencia celular e inducir la proliferación de PASC y HMVEC-L en función de los tiempos de estimulación. En primer lugar, la estimulación con IL-11 durante 48h aumentó la proliferación celular (figura 10) mientras que a partir de las 72h se inició un proceso senescente (figuras 11 y 12).

Con el objetivo de estudiar el posible efecto de la IL-11 sobre la proliferación celular de PSMCs y HMVECs-L, se midieron los niveles de incorporación de BrdU en células previamente estimuladas con 5ng/ml de IL-11 durante 48 horas. En la siguiente figura (figura 10) se puede observar como, respecto al control, la proliferación celular se ve incrementada significativamente ($p < 0,05$) en ambas líneas celulares tras la estimulación con IL-11.

Sin embargo, cabe destacar que el efecto farmacológico del nintedanib y la pirfenidona difiere en función de la línea celular sobre la que actúa, reduciendo significativamente la proliferación celular en las PSMCs pero no en las HMVECs-L, donde su efecto es prácticamente nulo.

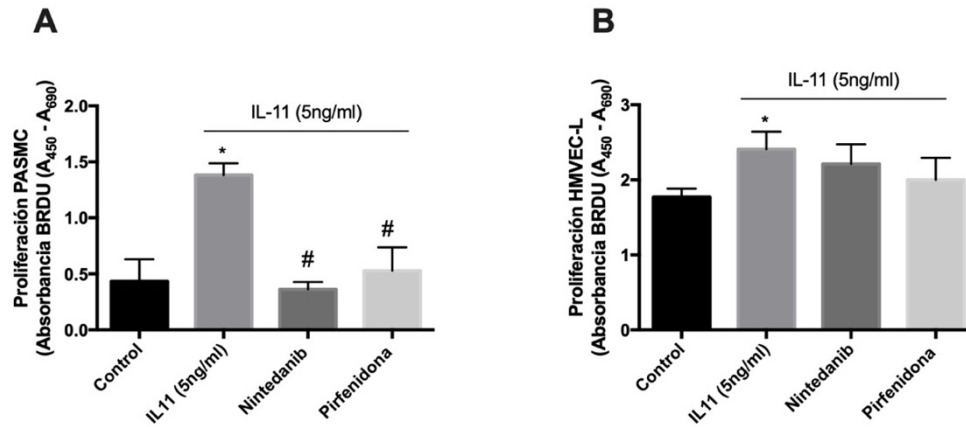


Figura 10. IL-11 induce proliferación celular en PSMCs y HMVECs-L. La proliferación celular durante 48h fue evaluada mediante el ensayo BrdU. Los valores de absorbancia hacen referencia a los datos de proliferación celular. Los resultados se expresan como media \pm SEM de n=3 experimentos independientes. (*p<0,05 respecto control; #p<0,05 respecto IL-11)

Por otro lado, el proceso senescente se evaluó mediante la cuantificación de la enzima β -galactosidasa, cuya expresión es un marcador de senescencia (figura 11), y mediante un análisis proteico y génico de p21, proteína que se encuentra transitoriamente elevada durante el proceso de senescencia (figura 12). En este punto, se observó un incremento de la actividad de la enzima β -galactosidasa en las células estimuladas con IL-11, la cual se evidencia con un marcaje azul. Dicha tinción se ve disminuida cuando las células, tanto PSMCs como HMVECs-L estimuladas, fueron previamente tratadas con pirfenidona o nintedanib (figura 11).

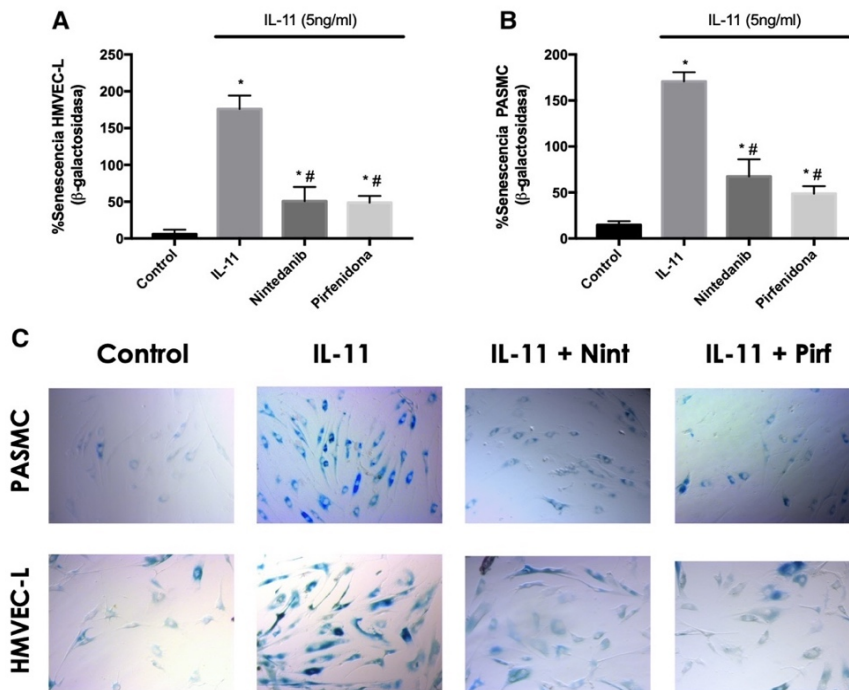


Figura 11. IL-11 promueve senescencia celular en PSMCs y HMVECs-L. El ensayo se llevó a cabo con PSMC y HMVEC-L tratadas con nintedanib o pirfenidona y estimuladas con IL-11 a 5ng/ml durante 72h. La senescencia celular se evaluó mediante una tinción histoquímica para la actividad de la β -galactosidasa. Porcentaje de células senescentes (células teñidas de azul) respecto del número total de células (A, B). Imágenes microscópicas (aumento de 40X) (C). Los resultados se expresan como media \pm SEM de n=3 experimentos independientes. (*p<0,05 respecto control; #p<0,05 respecto IL-11).

Finalmente, en la figura 12 se muestran los resultados de los análisis de expresión génica y proteica de p21, la cual inhibe la transición G1/S. En esta se puede observar un aumento significativo ($p < 0,05$) en el nivel de expresión proteica de p21 en HMVECs-L estimuladas con IL-11 (figura 11 A), así como también en el nivel de ARNm, tanto en PSMCs como en HMVECs-L estimuladas con IL-11 (figura 11 B y C), respecto al control.

Cabe destacar, que el nivel de expresión de p21, a ambos niveles, se ve reducido considerablemente en PSMCs y HMVECs-L tratadas previamente con nintedanib y pirfenidona.

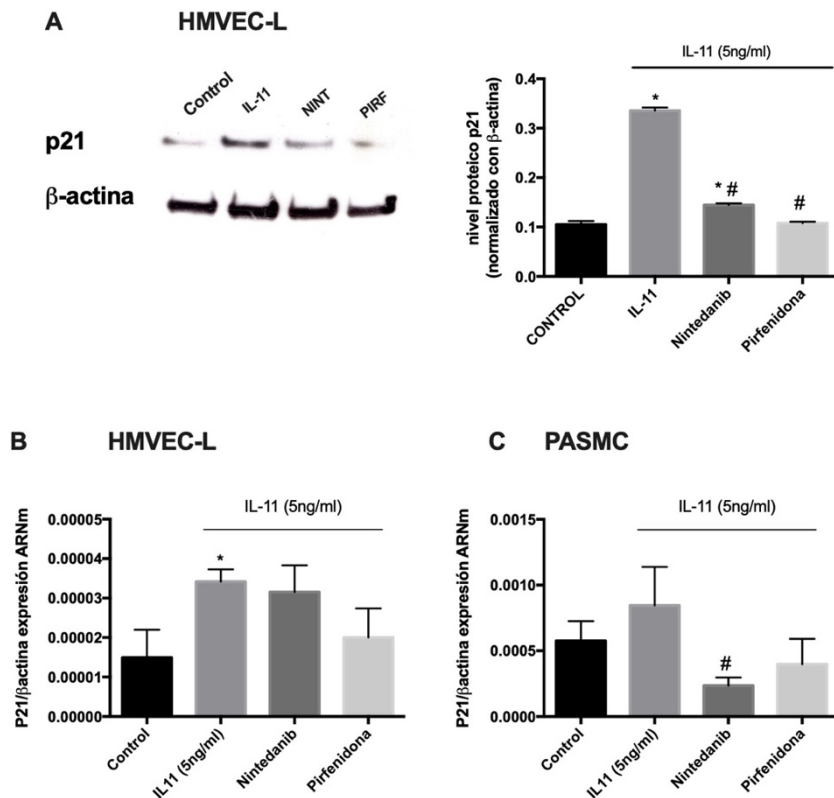


Figura 12. Incremento en la expresión génica y proteica de p21 tras la estimulación con IL-11. El ARNm total y la proteína se obtuvo de PSMCs y HMVECs-L tratadas con nintedanib o pirfenidona y estimuladas con IL-11 a 5ng/ml. Los niveles de expresión proteica se determinaron mediante un análisis de Western blot (A), mientras que los niveles de ARNm de p21 se determinaron mediante RT-PCR (B, C). Los resultados se expresan como media \pm SEM de $n=3$ experimentos independientes. (* $p < 0,05$ respecto control; # $p < 0,05$ respecto IL-11).

Por tanto, podríamos sugerir que la IL-11 se encuentra implicada en dos de los procesos celulares claves de la HP asociada a FPI, la senescencia y la proliferación celular.

5.2.3 Rutas de señalización activadas tras la estimulación con la IL-11.

En último lugar, se analizaron los niveles de expresión de proteínas importantes en las rutas de señalización características de la FPI. Para ello, se realizó un análisis mediante western blot de JAK2, AKT, STAT3, ERK $\frac{1}{2}$ y SMAD3 en sus formas fosforiladas y no fosforiladas, es decir, en sus formas activas e inactivas respectivamente.

En la figura 13 se muestran los niveles de expresión de las formas fosforiladas de AKT (figura 13 A), STAT3 (figura 13 B), ERK $\frac{1}{2}$ (figura 13 C) y SMAD 3 (figura 13 D) en PSMCs. Se observó una activación de las diferentes vías de señalización, medida a través de la sobreexpresión de las formas fosforiladas de las proteínas anteriormente mencionadas, tras la administración de 5ng/ml de la IL-11.

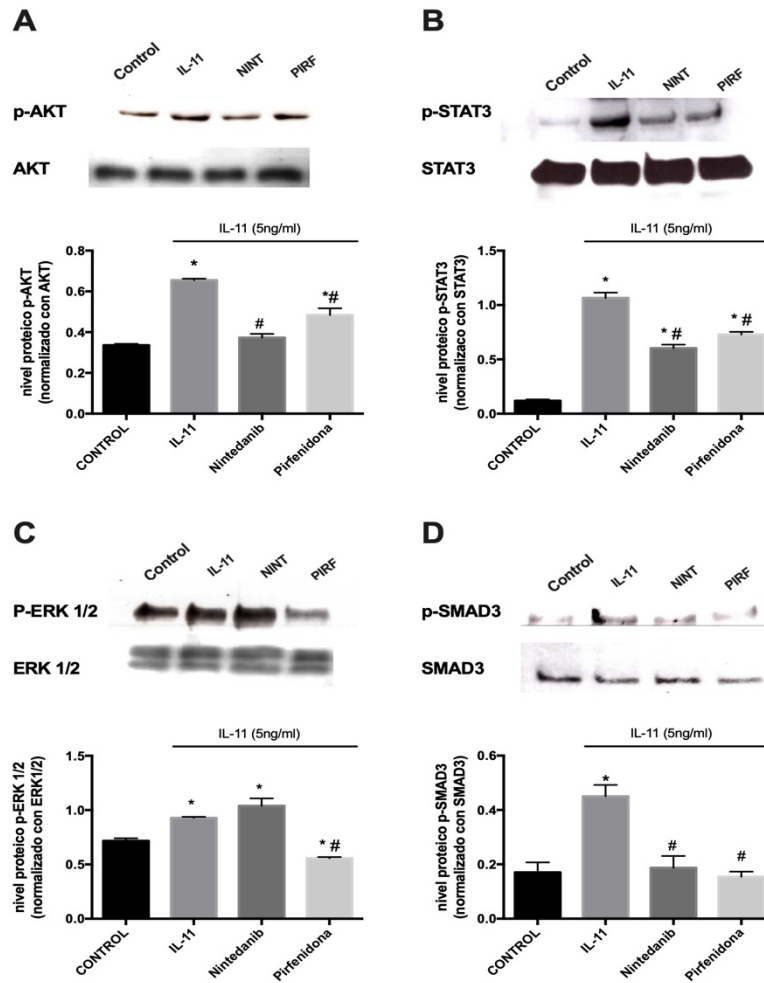


Figura 13. IL-11 promueve la activación de las principales vías de señalización implicadas en FPI en PSMCs. La proteína total se obtuvo de PSMCs tratadas con nintedanib o pirfenidona y estimuladas con IL-11 a 5ng/ml. Los niveles de expresión proteica se determinaron mediante un análisis de Western blot. Los resultados se expresan como media \pm SEM de n=3 experimentos independientes. (* $p < 0,05$ respecto control; # $p < 0,05$ respecto IL-11).

En la figura 14, los niveles de expresión proteica de p-JAK2, p-STAT3, p-ERK 1/2, p-SMAD3 y p-AKT se vieron aumentados significativamente ($p < 0,05$) en las HMVECs-L estimuladas con IL-11 frente al caso control mientras que las formas no fosforiladas mantuvieron unos niveles de expresión similares en todas las condiciones, justificando que el aumento de expresión en las formas fosforiladas se debe a la fosforilación de la proteína y no a un aumento de expresión basal de la misma.

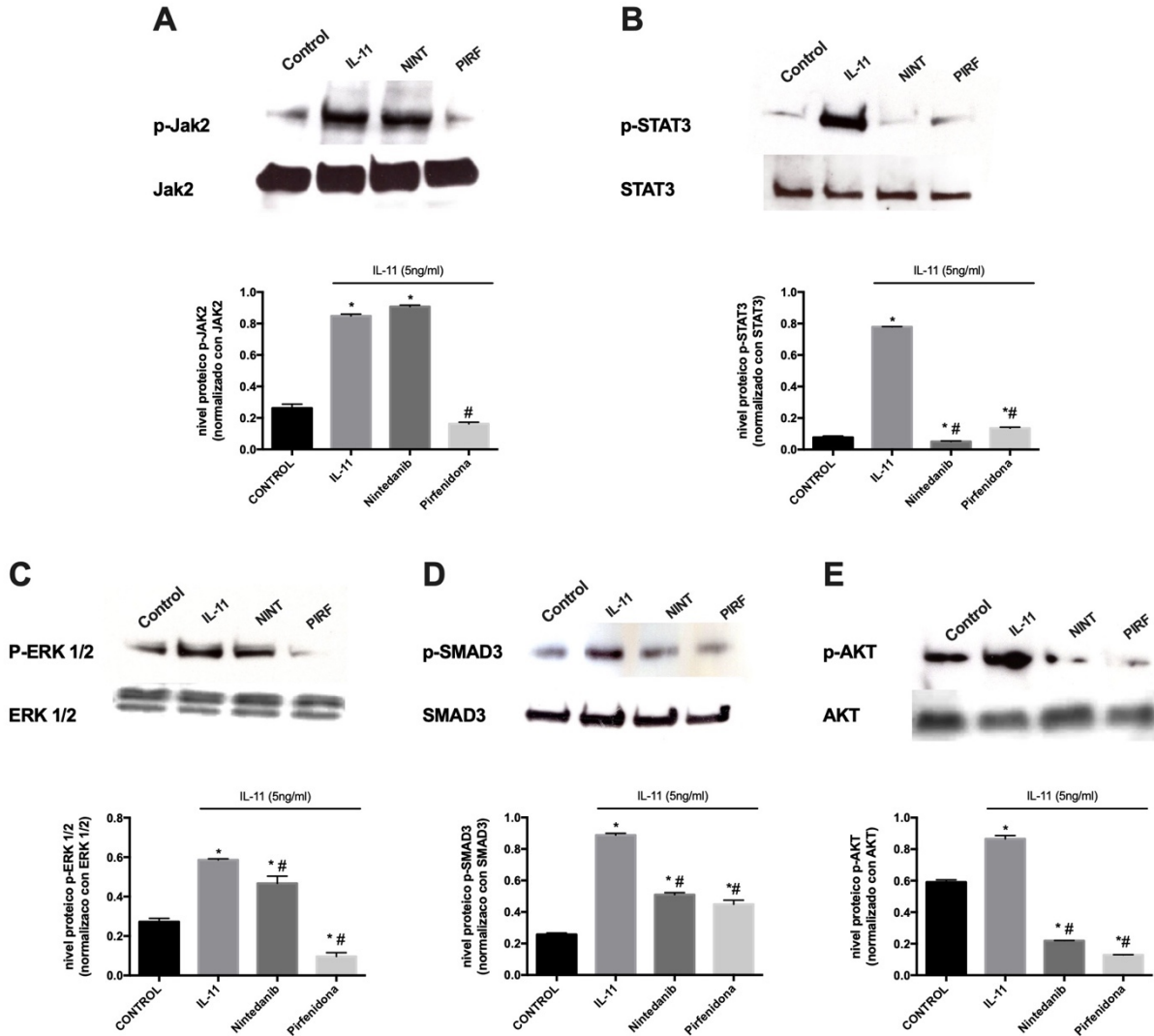


Figura 14. IL-11 promueve la activación de las principales vías de señalización implicadas en FPI en HMVECs-L. La proteína total se obtuvo de HMVECs-L tratadas con nintedanib o pirfenidona y estimuladas con IL-11 a 5ng/ml. Los niveles de expresión proteica se determinaron mediante un análisis de Western blot. Los resultados se expresan como media \pm SEM de n=3 experimentos independientes. (* $p < 0,05$ respecto control; # $p < 0,05$ respecto IL-11).

Finalmente, por lo que respecta al efecto farmacológico de nintedanib y pirfenidona, en la mayoría de los casos consiguen revertir la activación de las vías de señalización previamente mencionadas.

La activación de dichas rutas de señalización justificaría los resultados obtenidos anteriormente, ya que estos mediadores promueven la expresión de marcadores mesenquimales, el aumento de senescencia así como un aumento de la proliferación.

6. DISCUSIÓN

Durante nuestro estudio de expresión de IL-11 en tejido pulmonar y suero, se verificó que los niveles de expresión proteicos de IL-11 y su receptor son mayores en pacientes con FPI (31). Por otro lado, en nuestro trabajo se ha evidenciado que en paciente con FPI e HP asociada dicha expresión es todavía mayor que en pacientes con FPI. Sin embargo, los niveles génicos de dicha interleucina fueron indetectables, tal como reportan otros estudios (34). Esta sobreexpresión proteica promovió el estudio del papel de la IL-11 en FPI con HP asociada, donde se reveló que la IL-11 está implicada en el proceso de patogénesis de la FPI, ya que conduce a la activación de miofibroblastos y a la deposición excesiva de ME.

Existen evidencias de que la senescencia celular contribuye al envejecimiento de los pulmones, y que por tanto, la enfermedad pulmonar fibrótica está mediada, en parte, por células senescentes (35,36). En nuestro estudio, se ha observado un aumento de expresión de biomarcadores de senescencia, como p21 y actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal), tanto en PASMCS como en HMVECs-L estimuladas con IL-11 a las 72h. Por tanto, tal y como reportaron estudios previos, la senescencia celular contribuye a la enfermedad pulmonar fibrótica. Como resultado de la senescencia celular, estudios anteriores determinaron una reducción en los niveles de proliferación celular (37). Sin embargo, en contraposición a esto, en nuestro estudio se observó un aumento en los niveles de proliferación celular a las 48h. Estos resultados se ven respaldados por otros estudios que establecen la proliferación celular excesiva como un evento clave en la FPI (38). El hecho de que sucedan dos procesos opuestos se debe a que la FPI está caracterizada por un grupo heterogéneo de fibroblastos de distinto fenotipo, lo que indica la compleja interrelación de las células pulmonares en la FPI.

Los procesos celulares observados (liberación de factores mesenquimales y fibróticos, senescencia y proliferación celular), característicos de la FPI, fueron justificados gracias al estudio de las diferentes vías de señalización, mediadas por IL-11, implicadas en el desarrollo de enfermedades fibróticas (39,40).

La señalización de IL-11 depende de la formación de un complejo que consiste en la IL-11, IL-11R α y la subunidad β de gp130. Tras la formación del complejo de señalización, dos moléculas de gp130 se acercan, lo que resulta en una autofosforilación de JAKs, que están asociadas de forma constitutiva con la porción intracelular de gp130. Después de la activación, las JAK quinasas fosforilan distintos residuos de tirosina dentro de la región intracelular de gp130, proporcionando sitios de acoplamiento para STAT3, STAT1 y la tirosina fosfatasa SHP2. Además, STAT3 y STAT1, se fosforilan directamente por las JAK quinasas y el dímero gp130. Una vez fosforiladas, STAT3 y STAT1 dimerizan para translocarse al núcleo, donde activan la transcripción de varios genes que codifican para proteínas tales como factor de crecimiento transformante β 1 (TGF β 1), α -actina de músculo liso (α -SMA), Colágeno I, Vimentina... (41).

Por otro lado, la vía de señalización RAS-RAF-ERK se activa mediante la fosforilación de tirosina de gp130 y el reclutamiento posterior de SHP2, el cual promueve la fosforilación de ERK $\frac{1}{2}$. P-ERK $\frac{1}{2}$ es una proteína mediadora en cascadas de señalización inducidas por estímulos inflamatorios y promotora de la activación de fibroblastos y consecuente deposición de ME (42). Así mismo, la ruta PI3K-AKT-mTORC1 es otro evento de señalización que puede ser activado tras el reclutamiento de SHP2. Está implicada en los efectos que promueven la supervivencia celular observados en el factor de crecimiento tipo insulina 1, IL-6 e IL-11 (43). Finalmente, la sobreexpresión de IL-11 se asocia con la activación de SMAD3 pero su mecanismo de activación no está determinado actualmente, a pesar de que se conoce que está implicado en enfermedades fibróticas mediante la vía de TGF β (44).

Todos estos estudios avalan los resultados obtenidos en el presente estudio, en los cuales se observa la activación de las vías de señalización mencionadas.

Actualmente no hay disponible un tratamiento antihipertensivo específico para la hipertensión pulmonar asociada a la FP. No obstante, en artículos anteriores, fueron publicados hallazgos derivados de diferentes ensayos como TOMORROW e IMPULSIS (nintedanib) y ASCEND (pirfenidona) que han desplazado a la FPI de una enfermedad intratable a una enfermedad tratable. Ambos fármacos, nintedanib y pirfenidona, se encuentran actualmente aprobados para el tratamiento de la FPI, aunque presentan elevados efectos secundarios. Entre estos, destacan problemas gastrointestinales y fotosensibilidad para la pirfenidona (45), y diarrea, náuseas y vómitos en el caso del nintedanib (46).

Por un lado, la pirfenidona suprime las citocinas inflamatorias, como el TGF- β y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), que están relacionados con la progresión de la fibrosis y los efectos antiinflamatorios y antifibróticos posteriores, aunque su mecanismo de acción es desconocido (47). Por otro, el nintedanib es un inhibidor de la tirosina quinasa cuyo mecanismo se cree que se debe a la inhibición de mediadores profibróticos, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el factor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento transformante (TGF) - β , así como el FCVE, que reduce la actividad de los fibroblastos.

Cabe destacar, que en ambos casos el tratamiento aumenta la supervivencia hasta 2- 3 años, pero no combate la enfermedad. Por ello, es necesario la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para desarrollar un tratamiento efectivo para combatir la enfermedad.

7. CONCLUSIONES

1. La IL-11 se encuentra sobreexpresada en pacientes con FPI con HP asociada, y en menor medida en pacientes con FPI.
2. IL-11 y su receptor se distribuyen principalmente en arterias pulmonares.
3. La IL-11 conduce a cambios morfológicos caracterizados por un fenotipo miofibroblástico *in vitro*.
4. La IL-11 participa en los procesos proliferativos y senescentes *in vitro*.
5. La IL-11 activa las principales vías de señalización características de la FPI, promoviendo procesos celulares propios de la fisiopatología de la FPI e HP *in vitro*.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Wolters PJ, Collard HR, Jones KD. Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:157-79.
2. Meyer KC. Pulmonary fibrosis, part I: epidemiology, pathogenesis, and diagnosis. *Expert Rev Respir Med.* 2017;11(5):343-59.
3. Pitsiou G, Papakosta D, Bouros D. Pulmonary hypertension in idiopathic pulmonary fibrosis: a review. *Respir Int Rev Thorac Dis.* 2011;82(3):294-304.
4. Portal JAR, Baquero AD, Becerra ER. Enfermedades intersticiales difusas del pulmón. *Fibrosis pulmonar idiopática.* :12.
5. ¿Qué son las Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas? - Hospital Alemán [Internet]. [citado 20 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.hospitalaleman.org.ar/prevencion/las-enfermedades-pulmonares-intersticiales-difusas/>
6. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med.* febrero de 2000;161(2 Pt 1):646-64.
7. Kim HJ, Perlman D, Tomic R. Natural history of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* 1 de junio de 2015;109(6):661-70.
8. Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, Raghu G, Richeldi L, Selman M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primer.* 20 de octubre de 2017;3:17074.
9. Anatomía del pulmón: ¿Qué es el cáncer de pulmón? [Internet]. [citado 20 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-pulmon/que-es-cancer-pulmon>
10. Cao H, Wang C, Chen X, Hou J, Xiang Z, Shen Y, et al. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling suppresses myofibroblast differentiation of lung resident mesenchymal stem cells and pulmonary fibrosis. *Sci Rep.* 11 de septiembre de 2018;8(1):13644.
11. Kim J-H, Ham S, Lee Y, Suh GY, Lee Y-S. TTC3 contributes to TGF- β 1 -induced epithelial–mesenchymal transition and myofibroblast differentiation, potentially through SMURF2 ubiquitylation and degradation. *Cell Death Dis.* 29 de enero de 2019;10(2):92.
12. Sgalla G, Iovene B, Calvello M, Ori M, Varone F, Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management. *Respir Res* [Internet]. 2018 [citado 20 de junio de 2019];19. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5824456/>
13. Malli F, Koutsokera A, Paraskeva E, Zakyntinos E, Papagianni M, Makris D, et al. Endothelial Progenitor Cells in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: An Evolving Concept. *PLOS ONE.* ene de 2013;8(1):e53658.
14. Habel DM, Hogaboam CM. Heterogeneity of Fibroblasts and Myofibroblasts in Pulmonary Fibrosis. *Curr Pathobiol Rep.* junio de 2017;5(2):101-10.
15. 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.* 26 de diciembre de 2016;6(1).

16. Buendía-Roldán I, Mejía M, Navarro C, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis: Clinical behavior and aging associated comorbidities. *Respir Med.* 2017;129:46-52.
17. Miranda-Machado P, Baños-Alvarez I, Alvarez-Barrios A. Prevalence of pulmonary arterial hypertension in the Colombian Caribbean. *Pulm Circ.* junio de 2019;9(2):2045894019847643.
18. M. Hoepfer M, Ghofrani H-A, Grünig E, Klose H, Olschewski H, Rosenkranz S. Pulmonary Hypertension. *Dtsch Arztebl Int.* febrero de 2017;114(5):73-84.
19. Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 14 de octubre de 2004;351(16):1655-65.
20. Singh I, Ma KC, Berlin DA. Pathophysiology of Pulmonary Hypertension in Chronic Parenchymal Lung Disease. *Am J Med.* abril de 2016;129(4):366-71.
21. Sergew A, Brown KK. Advances in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2015;20(4):537-52.
22. Flaherty KR, Fell CD, Huggins JT, Nunes H, Sussman R, Valenzuela C, et al. Safety of nintedanib added to pirfenidone treatment for idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J [Internet].* 2 de agosto de 2018 [citado 20 de junio de 2019];52(2). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6092682/>
23. Costabel U, Bendstrup E, Cottin V, Dewint P, Egan JJJ, Ferguson J, et al. Pirfenidone in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Expert Panel Discussion on the Management of Drug-Related Adverse Events. *Adv Ther.* 2014;31(4):375-91.
24. Richeldi L, Cottin V, Bois RM du, Selman M, Kimura T, Bailes Z, et al. Nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: Combined evidence from the TOMORROW and INPULSIS® trials. *Respir Med.* 1 de abril de 2016;113:74-9.
25. Kimura T, Sakabe H, Minamiguchi H, Fujiki H, Abe T, Kaneko H, et al. Interleukin-11 (IL-11) enhances clonal proliferation of acute myelogenous leukemia cells with strong expression of the IL-11 receptor α chain and signal transducing gp130. :10.
26. Lokau J, Agthe M, Flynn CM, Garbers C. Proteolytic control of Interleukin-11 and Interleukin-6 biology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* noviembre de 2017;1864(11 Pt B):2105-17.
27. Harmegnies D, Wang X-M, Vandenbussche P, Leon A, Vusio P, Grötzinger J, et al. Characterization of a potent human interleukin-11 agonist. *Biochem J.* 1 de noviembre de 2003;375:23-32.
28. Matadeen R, Hon W-C, Heath JK, Jones EY, Fuller S. The dynamics of signal triggering in a gp130-receptor complex. *Struct Lond Engl* 1993. abril de 2007;15(4):441-8.
29. Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, et al. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science.* 7 de enero de 1994;263(5143):92-5.
30. Lokau J, Agthe M, Garbers C. Generation of Soluble Interleukin-11 and Interleukin-6 Receptors: A Crucial Function for Proteases during Inflammation. *Mediators Inflamm [Internet].* 2016 [citado 8 de julio de 2019];2016. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4963573/>

31. Lindahl GE, Stock CJ, Shi-Wen X, Leoni P, Sestini P, Howat SL, et al. Microarray profiling reveals suppressed interferon stimulated gene program in fibroblasts from scleroderma-associated interstitial lung disease. *Respir Res.* 2013;14(1):80.
32. Mack M. Autocrine Activation of Fibroblasts by Induction of IL-11 Expression Is a Common Pathway of Profibrotic Factors. *Transplantation.* 2018;102(5):710-1.
33. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de marzo de 2011;183(6):788-824.
34. Schafer S, Viswanathan S, Widjaja AA, Lim W-W, Moreno-Moral A, DeLaughter DM, et al. IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature.* 07 de 2017;552(7683):110-5.
35. Schafer MJ, White TA, Iijima K, Haak AJ, Ligresti G, Atkinson EJ, et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun.* 23 de 2017;8:14532.
36. Hashimoto M, Asai A, Kawagishi H, Mikawa R, Iwashita Y, Kanayama K, et al. Elimination of p19ARF-expressing cells enhances pulmonary function in mice. *JCI Insight.* 04 de 2016;1(12):e87732.
37. Álvarez D, Cárdenas N, Sellarés J, Bueno M, Corey C, Hanumanthu VS, et al. IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 1 de diciembre de 2017;313(6):L1164-73.
38. Strieter RM, Mehrad B. New Mechanisms of Pulmonary Fibrosis. *Chest.* noviembre de 2009;136(5):1364-70.
39. Zhang X-L, Xing R-G, Chen L, Liu C-R, Miao Z-G. PI3K/Akt signaling is involved in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis via regulation of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Med Rep.* diciembre de 2016;14(6):5699-706.
40. Matsui F, Meldrum KK. The role of the Janus kinase family/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in fibrotic renal disease. *J Surg Res.* noviembre de 2012;178(1):339-45.
41. Milara J, Hernandez G, Ballester B, Morell A, Roger I, Montero P, et al. The JAK2 pathway is activated in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* [Internet]. 2018 [citado 1 de julio de 2019];19. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5801676/>
42. Xu DH, Zhu Z, Wakefield MR, Xiao H, Bai Q, Fang Y. The role of IL-11 in immunity and cancer. *Cancer Lett.* 10 de abril de 2016;373(2):156-63.
43. Ernst M, Jenkins BJ. Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet.* 1 de enero de 2004;20(1):23-32.
44. Gupta J, Robbins J, Jilling T, Seth P. TGFβ-dependent induction of interleukin-11 and interleukin-8 involves SMAD and p38 MAPK pathways in breast tumor models with varied bone metastases potential. *Cancer Biol Ther.* 1 de febrero de 2011;11(3):311-6.
45. King TEJ, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, et al. A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1402582>. 2014 [citado 5 de julio de 2019]. Disponible en: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1402582?url_ver=Z39.882003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov

46. Rivera-Ortega P, Hayton C, Blaikley J, Leonard C, Chaudhuri N. Nintedanib in the management of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical trial evidence and real-world experience. *Ther Adv Respir Dis* [Internet]. 25 de septiembre de 2018 [citado 4 de julio de 2019];12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6156214/>
47. Furuya K, Sakamoto S, Shimizu H, Sekiya M, Kinoshita A, Isshiki T, et al. Pirfenidone for acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: A retrospective study. *Respir Med*. 1 de mayo de 2017;126:93-9.