



**Universitat**  
de les Illes Balears

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

# **Papel de las células madre mesenquimales pulmonares en la progresión de la fibrosis pulmonar idiopática**

**Gabriel Escarrer Garau**

**Grado de Biología**

**Facultad de Ciencias**

**Año Académico 2021-22**

# **Papel de las células madre mesenquimales pulmonares en la progresión de la fibrosis pulmonar idiopática**

**Gabriel Escarrer Garau**

**Trabajo de Fin de Grado**

**Facultad de Ciencias**

**Universidad de las Illes Balears**

**Año Académico 2021-22**

Palabras clave del trabajo:

Fibrosis pulmonar idiopática, bleomicina, células madre mesenquimales pulmonares, reparación, envejecimiento

*Nombre Tutor/Tutora del Trabajo: Josep Mercader Barceló*

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Índice

<b>Resumen / Resum / Abstract</b> .....	5
<b>Introducción</b> .....	6
<b>Hipótesis y objetivos</b> .....	9
<b>Material y métodos</b> .....	10
1. Cultivos celulares .....	10
2. Animales y procedimientos.....	10
3. Obtención de muestras .....	11
4. Procesamiento del BAL y análisis celular .....	12
5. Extracción de RNA y proteínas .....	12
6. Retro-transcripción.....	13
7. qPCR.....	14
8. Western Blot.....	14
<b>Resultados</b> .....	15
1. La bleomicina y las IPFLMSC disminuyen del peso corporal .....	15
2. La inoculación de LMSC no tiene efecto sobre el número de células del sistema inmune del BAL. ....	16
3. La expresión de marcadores proinflamatorios no está afectada por las LMSC ni la bleomicina. ....	17
4. La inoculación de LMSC no afecta la expresión de componentes de la matriz extracelular inducida por bleomicina. ....	18
5. La inoculación de IPFLMSC, en presencia de bleomicina, aumenta la concentración proteica de $\alpha$ -SMA y citoqueratina-8.....	19
<b>Discusión</b> .....	21
<b>Bibliografía</b> .....	24

# Abreviaciones

$\alpha$ -SMA

$\alpha$ - actina del músculo liso ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*)

BAL

líquido broncoalveolar (*bronchoalveolar liquid*)

EMT

transición epitelial a mesenquimal (*epithelial to mesenchymal transition*)

IL-1 $\beta$

inteleucina-1 $\beta$  (*interleukin-1 $\beta$* )

IL-6

Interleucina-6 (*interleukin-6*)

IPF

fibrosis pulmonar idiopática (*idiopathic pulmonary fibrosis*)

LMSC

células madre mesenquimales de pulmón (*lung mesenchymal stem cells*)

MCP-1

proteína quimioatrayente de monocitos-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*)

MSC

células madre mesenquimales (*mesenchymal stem cells*)

TGF- $\beta$

factor de crecimiento transformante- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* )

TNF- $\alpha$

factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (*tumoral necrosis factor- $\alpha$* )

## Resumen / Resum / Abstract

**Resumen:** La fibrosis pulmonar idiopática (IPF) es una enfermedad pulmonar intersticial caracterizada por la acumulación de componentes de la matriz extracelular que provoca una destrucción de la organización tisular. El papel de las células madres mesenquimales de pulmón (LMSC) en la IPF se desconoce. Estudios preliminares *in vitro* muestran que las LMSC de pacientes con IPF presentan un fenotipo senescente y expresan  $\alpha$ -SMA. En el presente estudio *in vivo*, se ha evaluado el papel de las LMSC, tanto de donantes sin enfermedad pulmonar intersticial (non-ILD) como de pacientes con IPF, en el desarrollo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. La Bleomicina disminuye significativamente el peso corporal, aumenta significativamente la concentración de células del sistema inmunitario en el BAL y la expresión de los marcadores fibróticos colágeno y fibronectina en los pulmones. A diferencia de las non-ILD LMSC, la inoculación de LMSC de pacientes con IPF disminuye el peso corporal y, en presencia de bleomicina, aumenta las concentraciones de las proteínas  $\alpha$ -SMA y citoqueratina-8 en los pulmones. Se concluye que las LMSC de pacientes con IPF, en presencia de un estimulante profibrótico, promueven la adquisición de características de miofibroblastos en el pulmón de ratones.

**Resum:** La fibrosis pulmonar idiopàtica (IPF) es una malaltia pulmonar intersticial que es caracteritzada per la acumulació de components de la matriu extracel·lular que provoca una destrucció de la organització tissular. El paper de les cèl·lules mare pulmonars (LMSC) en la IPF es desconegut. Estudis preliminars *in vitro* indiquen que les LMSC de pacients amb IPF presenten un fenotip senescent i expressen  $\alpha$ -SMA. En el present estudi *in vivo*, s'ha avaluat el paper de les LMSC, tant de donants sense cap malaltia pulmonar intersticial (non-ILD) com de pacients amb IPF, en el desenvolupament de la fibrosis pulmonar induïda per bleomicina. La bleomicina disminueix el pes corporal dels ratolins, augmenta la concentració de cèl·lules del sistema immunitari i la expressió dels marcadors fibròtics col·lagen i fibronectina en els pulmons. A diferència de les non-ILD LMSC, la inoculació de LMSC de pacients amb IPF disminueix el pes corporal, i, en presència de la bleomicina, augmenta la concentració de proteïnes  $\alpha$ -SMA i citoqueratina-8 en els pulmons. Se conclou de que les LMSC de pacients amb IPF, en presència de un estimulador profibròtic, promou l'adquisició de característiques de miofibroblasts en els pulmons dels ratolins.

**Abstract:** Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is an interstitial lung disease characterized by an accumulation of extracellular matrix which cause lung architecture destruction. The role of lung mesenchymal stem cell (LMSC) in IPF is still unknown. Previous *in vitro* studies show that LMSC from IPF patients present a senescent phenotype and express  $\alpha$ -SMA. In the present *in vivo* study, the role of LMSC from donor without interstitial disease (non-ILD) and IPF patients in the development of the bleomycin-induced pulmonary fibrosis has been evaluated. Bleomycin significantly decreases body weight, increases the concentration of immune cells in BAL and the expression of fibrotic markers as collagen and fibronectin in the lung. Unlike the non-ILD LMSC, the inoculation of LMSCs from IPF patients decrease body weight and increased the concentrations of  $\alpha$ -SMA and cytokeratin-8 proteins in the lungs. The conclusion is that IPF LMSC, in the presence of a profibrotic stimuli, promote the acquisition of myofibroblast characteristics in mice lungs.

## Introducción

La fibrosis pulmonar idiopática (IPF, *idiopathic pulmonary fibrosis*) es una neumonía intersticial de causa desconocida. Es una patología asociada al envejecimiento que se caracteriza por una disfunción pulmonar causada por una acumulación excesiva de matriz extracelular, que se suele diagnosticar en pacientes de entre los 55 y los 75 años. En cuanto a la epidemiología de la IPF, es la primera o la segunda, dependiendo del país, enfermedad pulmonar intersticial más común (Sauleda, *et al.* 2018). Sin embargo, la metodología utilizada para el diagnóstico de la enfermedad resulta muy poco práctica y lenta, por lo que la mayoría de pacientes cuando se les diagnostica tienen una esperanza de vida de pocos años (Du Bois,. 2010).

La IPF es una enfermedad crónica y progresiva que acaba resultando letal. Además, se caracteriza por ser heterogénea, es decir, encontramos tanto zonas del parénquima poco dañadas o sanas como zonas fibróticas en las que se producen elevadas cantidades de componentes de la matriz extracelular, produciendo así una destrucción de la arquitectura pulmonar. Estas zonas fibróticas, a diferencia de otras enfermedades intersticiales, se desarrollan a causa de una activación de fibroblastos desencadenada por las células epiteliales pulmonares. Esta activación surge de la siguiente forma: las células epiteliales pulmonares envejecidas presentan un fenotipo senescente (Álvarez, *et al.* 2017), por lo que son muy

sensibles a sufrir microlesiones por agentes como el tabaco, virus... Estas microlesiones provocan la muerte celular del epitelio, lo cual estimula la proliferación y migración de diferentes tipos celulares para intentar reparar la microlesión. Debido que esta reparación no se consigue, las células epiteliales reclutan fibroblastos, los cuales secretan TGF- $\beta$ , un factor de crecimiento que estimula a las células epiteliales a transformarse en células mesenquimales (“*Epithelial to Mesenchymal Transition*” (EMT)) y a los fibroblastos a diferenciarse en miofibroblastos, los cuales son fibroblastos que expresan  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA). Todos estos tipos celulares acaban derivando en focos de fibroblastos, los cuales secretan grandes cantidades de componentes de la matriz extracelular (Fig. 1). Por lo cual, no es de extrañar que la sintomatología de estos pacientes sea tos y disnea de esfuerzo crónica y progresiva (King Jr, *et al.* 2011).

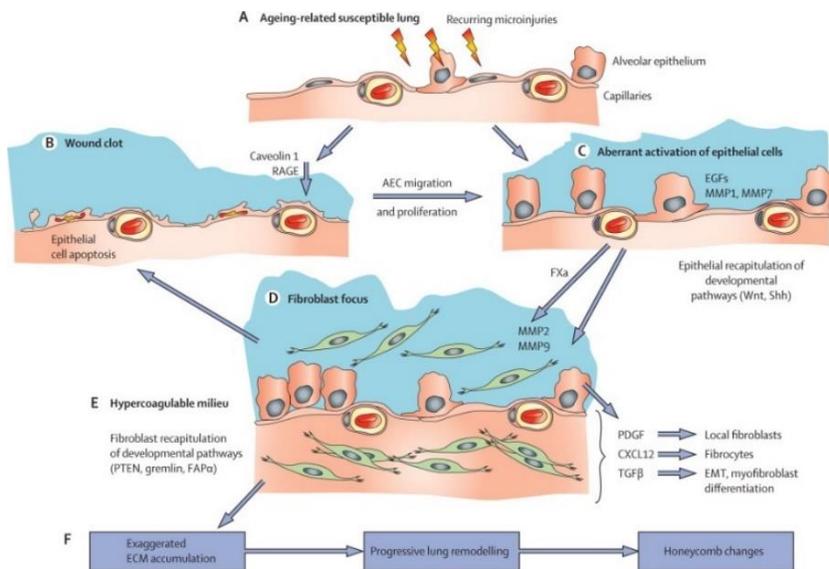


Fig. 1: Esquema realizado por King Jr *et al.* (2011) en el que se representa la formación de los focos de fibroblastos y miofibroblastos en la IPF

Pese a que la causa de la patología sea desconocida, existen factores que incrementan el riesgo de desarrollar la IPF. Por ejemplo, mutaciones en los complejos telomerasa o shelterina y en las proteínas del surfactante están relacionadas con la IPF (Krauss, *et al.* 2019). Además, existen factores ambientales, como la contaminación, el polvo de metales y el tabaco, que se han asociado con el desarrollo y/o progresión de la enfermedad (Fig. 2). Más recientemente, se ha

propuesto que la dieta y la microbiota pulmonar podrían tener un papel importante en la FPI (Mercader-Barceló, *et al.* 2020).

En experimentación, el modelo animal más utilizado es la cepa de ratón C57BL/6, al que se le induce fibrosis pulmonar mediante la administración de 2U/Kg de bleomicina (Moore, *et al.* 2008), aunque la dosis puede variar entre 1-4 U/kg. La bleomicina es un agente antitumoral que tiene como efecto secundario la inducción de enfermedades pulmonares debido a lesiones en el tejido provocadas por roturas en la cadena de DNA y lesiones en las células debido a oxidación (Sleijfer, 2001). Este compuesto induce una fibrosis pulmonar diferente a la IPF ya que, en el caso de la bleomicina, la patología se desarrolla con mayor rapidez y, entre el día 21 y 28 después de su administración, la fibrosis se resuelve por si sola, por lo que no es un modelo del todo representativo de la IPF (Tashiro, *et al.* 2017). En este modelo animal, los marcadores bioquímicos e histológicos de fibrosis pulmonar se estudian en el día 14 tras la administración de bleomicina (Moore, *et al.* 2008).

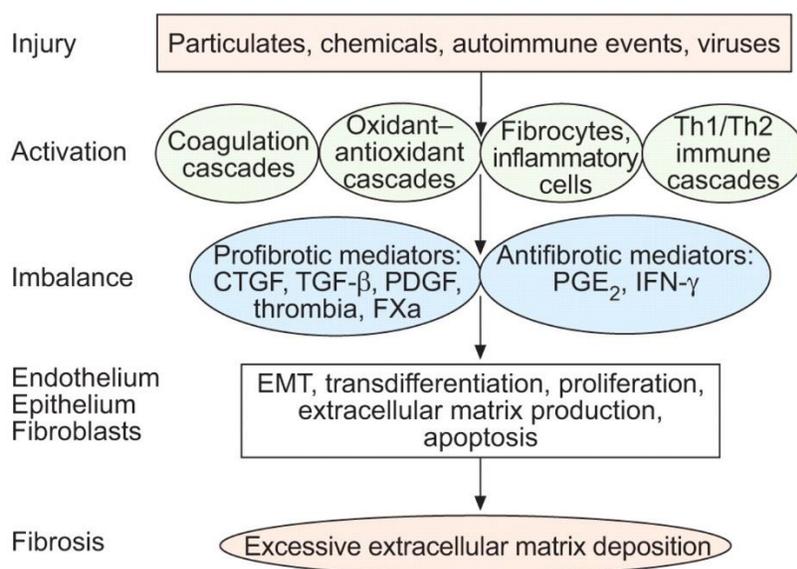


Fig. 2: Esquema realizado por Maher, *et al.* (2007) en el que se representa los diferentes factores ambientales que incrementan el riesgo de IPF y el desajuste que provocan activando diferentes vías, el cual acabado desencadenando una deposición excesiva de matriz extracelular

En las últimas 3 décadas, se han realizado numerosos estudios centrados en la búsqueda de una terapia para la IPF. Estos estudios demostraron que algunos de los fármacos, como el nintenedib o la pirfernidona, tienen un efecto anti-fibrótico reduciendo el deterioro del tejido pulmonar y aumentando la esperanza de vida del paciente (King Jr, *et al.* 2014) (Richeldi, *et al.*

2014). No obstante, estos fármacos presentan efectos secundarios en algunos pacientes y no consiguen revertir el proceso de la patología (Somogyi, *et al.* 2019). Por ese mismo motivo, los estudios actuales se han centrado en terapias alternativas como la terapia de células madre mesenquimales (MSC), en las que se observan resultados beneficiosos (Averyanov, *et al.* 2020).

Las células madre mesenquimales de pulmón (LMSC, *Lung mesenchymal stem cells*) son las células madre residentes encargadas de reparar y mantener el parénquima pulmonar. Una célula madre se considera mesenquimal cuando tiene el potencial de diferenciarse en células de la línea mesodérmica y expresa proteínas de membrana específicas como CD105, CD90 y CD73 (Dominici, *et al.* 2006). Las LMSC, además de poder diferenciarse en los 3 tipos celulares del mesodermo, también tienen la capacidad de diferenciarse en fibroblastos y en miofibroblastos (Sinclair, *et al.* 2013). Los estudios preliminares *in vitro* del grupo de investigación i-Respire muestran que las LMSC presentan características de senescencia celular, incluyendo una menor actividad proliferativa y metabólica (Truyols, *et al.* 2021), así como disfunción mitocondrial (Truyols, *et al.* 2021). Estos resultados son indicativos de agotamiento celular y sugerirían una menor capacidad reparadora y regeneradora. Por otra parte, sorprendentemente, las LMSC de pacientes IPF expresan  $\alpha$ -SMA y dicha expresión se incrementa en respuesta al TGF-beta, lo que significaría que han adquirido un fenotipo de miofibroblasto y sugeriría que podrían contribuir activamente al desarrollo de la IPF. Para poder esclarecer el papel de las LMSC en la progresión de la fibrosis deberían realizarse estudios *in vivo*.

## Hipótesis y objetivos

En base a los resultados *in vitro* anteriormente mencionados, la hipótesis de este estudio es: Las LMSC de pacientes IPF participan activamente en el desarrollo de la fibrosis pulmonar en respuesta a un entorno profibrótico. Por lo tanto, el objetivo general de este estudio es:

Evaluar el efecto de las LMSC de pacientes IPF en la progresión de la fibrosis pulmonar utilizando un modelo animal.

Objetivos específicos:

- 1) Analizar el efecto de LMSC aisladas de pacientes IPF y pacientes sin enfermedad pulmonar intersticial.
- 2) Analizar el efecto de las LMSC humanas en presencia y ausencia de daño pulmonar.

- 3) Analizar el efecto sobre marcadores de inflamación, fibrosis y activación de miofibroblastos.

## Material y métodos

### 1. Cultivos celulares

Se recogieron muestras tisulares de pulmón de necropsias de pacientes de fibrosis pulmonar idiopática y de donantes sin enfermedad pulmonar intersticial por los centros Hospital Universitario de Bellvitge, Hospital Universitario Son Espases y Lund University Hospital (Suecia). Una vez recogidos los tejidos, las células madre mesenquimales de pulmón (LMSC) fueron aisladas por estos centros mediante el protocolo estandarizado de Kajstura, *et al.* (2011).

Para este experimento, primero se validó la potencialidad de las LMSC mediante el test de Rohart, un test basado en el análisis de microarrays para diferenciar las células madre mesenquimales de los otros tipos celulares (Rohart, *et al.* 2016). Seguidamente, se cultivaron las LMSC hasta el pase 6-8, en el que fueron despegadas del frasco mediante una incubación de 1-2 minutos a 37°C con tripsina/EDTA 1x. Una vez las células estaban suspendidas, se introdujeron en un tubo cónico y se diluyeron en PBS para evitar que la tripsina dañara a las células. Posteriormente, se centrifugó el tubo a 1,3 rpm durante 3,5 minutos para precipitar las células. Una vez centrifugado, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 800µl de PBS. Se realizó un conteo celular mediante la cámara de Neubauer y el colorante azul de tripano. Finalmente, se prepararon dos microtubos estériles con aproximadamente 2000 LMSC por µl para la inoculación en ratones, uno con LMSC de pacientes con fibrosis pulmonar (IPF-LMSC) y el otro con LMSC de donantes sin enfermedad pulmonar intersticial (non-ILD-LMSC).

### 2. Animales y procedimientos

Ratones hembra de la cepa consanguínea C57BL/6 de fenotipo salvaje fueron utilizadas como modelo animal para este estudio. El día 0, los ratones se dividieron en 2 grupos en función de la sustancia administrada, el grupo Bleo y el grupo PBS. El grupo Bleo (n=21) recibió una administración por vía intratraqueal de 2U/Kg de bleomicina con la ayuda de una cánula estéril atraumática. Para ello se calculó el volumen a administrar a cada ratón en función de su peso. El grupo PBS (n=15) se le administró PBS mediante la misma metodología en función de su

peso. Cabe destacar que la diferencia en el número de ratones por grupo obedece a compensar la mortalidad producida por la bleomicina.

48 horas posterior a la administración, cada grupo se dividió en 3 subgrupos: 3 subgrupos de n=5 del grupo PBS y 3 subgrupos de n=7 del grupo Bleo, cada uno en una jaula asignada y con comida y agua *ad libitum*. A un subgrupo se le inocularon 100.000 non-ILD-LMSC (Bleo-nonILDLMSC y PBS-nonILDLMSC), al otro subgrupo se le inocularon 100.000 IPF-LMSC (grupos Bleo-IPFLMSC y PBS-IPFLMSC), y al subgrupo restante se le administraron 50ul de PBS (grupos Bleo-PBS y PBS-PBS). Tanto para la administración como para la inoculación, los ratones fueron previamente sedados con 1,5 µl/g de Anesketin 100mg/µl:Sedaxylan 20mg/µl (3:2) por vía intraperitoneal. Se realizó un seguimiento del peso corporal de los ratones en los días 4 y 14.

### 3. Obtención de muestras

Día 14 post-administración de bleomicina, todos los ratones fueron sacrificados por inhalación de dióxido de carbono. Una vez sacrificados, los ratones se pesaron y se recogieron muestras de líquido bronco alveolar (BAL, *broncoalveolar liquid*) y de pulmón de cada individuo. Para obtener el BAL, se realizó una traqueotomía para poder introducir y recoger 1000µl de PBS con la ayuda de una cánula estéril (Fig. 3A). Una vez se recogió el BAL, se introdujo el fluido en un microtubo estéril previamente identificado y se conservó a 4°C hasta su procesamiento. En el caso de los pulmones, primero la sangre fue drenada introduciendo PBS 1x en el ventrículo derecho del corazón (Fig. 3B). Posteriormente, los lóbulos derechos fueron introducidos en nitrógeno líquido y conservados a -80°C para análisis de expresión, mientras que el lóbulo izquierdo fue perfundido en paraformaldehído al 4% para análisis histológicos (Fig. 3C).



Fig. 3: A. Cánula flexible insertada en la tráquea para poder introducir el PBS y recoger el BAL. B. Pulmones de un ratón del grupo PBS-PBS después del drenaje de sangre. C. Lóbulo izquierdo del pulmón preparado para ser introducido en paraformaldehído al 4%.

#### 4. Procesamiento del BAL y análisis celular

Una vez se obtuvo el BAL, 200µl de BAL fueron introducidos en un nuevo microtubo estéril para ser centrifugados a 800rcf durante 3 minutos a 4°C. Posteriormente, se retiró 180µl de sobrenadante para conservarlo para futuros estudios. Una vez retirado parte del sobrenadante, 180µl de tampón de lisis fueron introducidos en el microtubo estéril con el pellet para resuspenderlo. Después de una incubación de 10 minutos, las muestras fueron leídas con la ayuda de un citómetro de flujo. El citómetro cuantifica las partículas de la muestra, que en este caso son las células residentes del líquido broncoalveolar. Las células son clasificadas por el citómetro en linfocitos, macrófagos y granulocitos según la cantidad de luz que divergen de las células, que depende del tamaño y la complejidad (Fig. 4).

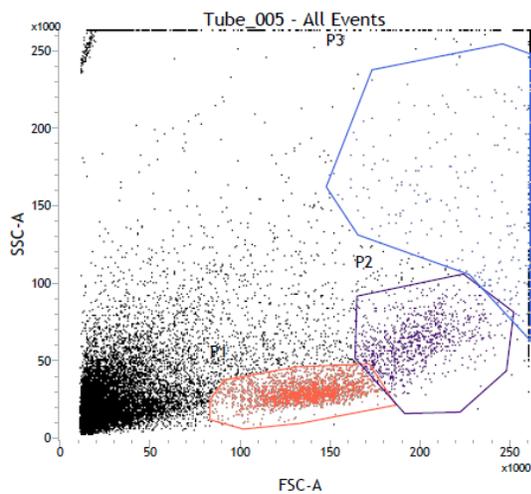


Fig. 4: Ejemplo de las gráficas que proporciona el citómetro al analizar el BAL. El eje de abscisas representa la complejidad celular y el eje de ordenadas al tamaño de la célula. Cada color representa una población celular, de manera que el rojo son linfocitos, el lila macrófagos y el azul granulocitos.

#### 5. Extracción de RNA y proteínas

El tejido previamente congelado fue homogeneizado por crio-pulverización mediante cuentas magnéticas para poder dividir la muestra en dos partes totalmente homogéneas. Es necesario homogeneizar la muestra debido a la heterogeneidad de la fibrosis pulmonar. Una parte fue destinada a la extracción de RNA y la otra para la extracción de proteínas.

En cuanto a la extracción de RNA, primero se disoció el tejido crio-homogeneizado incubándolo con 300µl de trizol durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 100µl

de cloroformo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, los microtubos se centrifugaron a 14.000rpm durante 15 minutos a 4°C para separar la muestra en 3 fases. Se recogió la fase acuosa y se continuó el aislado de RNA con un kit comercial (Extractme Total RNA kit, Blirt) el cual permitió purificar la muestra de RNA y eliminar el DNA con un tratamiento de DNAsas. Una vez el RNA estaba aislado y purificado, se cuantificó con el uso de un espectrofotómetro de tipo Nanodrop.

En cuanto a la extracción de proteínas, el tejido crio-homogeneizado se introdujo en tampón de lisis RIPA. Seguidamente, se mejoró la eficiencia de lisado con la ayuda de un sonicador. Una vez las muestras estaban lisadas, se centrifugaron a 12000rpm durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes resultantes fueron cuantificados con el método del ácido bicinconínico (BCA) mediante un kit comercial (Pierce™ BCA Protein Assay, ThermoFisher Scientific) en placa de ELISA de 96 pocillos. Una vez cuantificado, se prepararon alícuotas para SDS-PAGE a una cantidad de proteína total de 20µg añadiendo una cantidad proporcional de tampón de carga según Laemmli (1970). Finalmente, se desnaturalizaron las proteínas de las alícuotas a 90°C durante 1 minuto y se conservaron a -20°C hasta realizar el Western Blot.

## 6. Retro-transcripción

Una vez cuantificado el RNA aislado de todas las muestras, 500ng de cada muestra fueron introducidos en nuevos microtubos estériles y enrasados a 10µl con agua libre de RNAsas. Posteriormente, se incubaron las muestras a 60°C durante 5 minutos para desnaturalizar el RNA. Una vez desnaturalizado, se introdujeron 10µl de master mix de un kit comercial (cDNA synthesis kit). Esta master mix contiene 2µl de 10x RT reaction buffer, 1µl de inhibidor de RNAsas, 1µl de transcriptasa inversa “transcript me”, 1µl de random nonamers, 1µl de dNTP 10mM mix y 4µl de agua libre de RNAsas. Finalmente, se programó el termociclador para poder realizar la retrotranscripción (Tabla 1).

T°	Minutos
25°C	10
50°C	30
85°C	5
4°C	∞

Tabla 1: Ciclos programados en el termociclador

Una vez se obtuvo el cDNA de la retrotranscripción, se diluyó 10 veces con agua libre de RNasas para inactivar los componentes de la master mix y que estos no interfirieran en la eficiencia de la PCR.

## 7. qPCR

Una vez obtenido el cDNA, se realizaron PCR cuantitativas (real time-PCR o qPCR) para poder determinar la expresión de marcadores fibróticos y proinflamatorios. En cuanto a los marcadores fibróticos, se utilizaron primers de genes que codifican para proteínas de la matriz extracelular como fibronectina y colágeno, y  $\alpha$ -SMA. En cuanto a los marcadores proinflamatorios, se utilizaron genes que codifican para citoquinas e interleucinas proinflamatorias. Para realizar la qPCR, se utilizaron placas de 96 pocillos, en los cuales cada pocillo contenía 2,5 $\mu$ l de muestra de cDNA y 7,5 $\mu$ l de master mix. Para realizar la master mix, se usó un kit comercial (Sensifast SYBR No-ROX kit). Una vez la placa contenía todas las muestras con la master mix correspondiente, se selló con la tapa, se centrifugó a 2000 rcf durante 1 minuto para concentrar todos los componentes en el fondo del pocillo y finalmente, se introdujo en la máquina Bio-Rad cfx96 light cycler programada con los ciclos recomendado por el kit comercial de la master mix.

## 8. Western Blot

Las alícuotas de proteínas fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 10% con SDS y se procedió a la electroforesis en cubeta vertical, primero a 80 V y luego, cuando las muestras ya estaban introducidas en el gel, a 120 V durante aproximadamente 90 minutos. Posteriormente, los geles se desensamblaron de los moldes y se procedió a la transferencia a membrana de PVDF de 0,45 $\mu$ m de poro previamente activada con metanol absoluto. Se utilizó el método de transferencia semilíquida mediante el aparato de transferencia TransBlot TURBO (BIO-RAD) con un protocolo personalizado de 40 minutos a 22 V y 1,2 A. Una vez acabada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con tampón de bloqueo (BSA 5%, Tween-20 1% y azida sódica 0,05% en TBS) durante 1h a temperatura ambiente en agitación continua. Seguidamente, se realizaron incubaciones de 1h en anticuerpo primario no conjugado o conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) preparados según se indica en la Tabla 2, a 4°C durante 12 h en agitación continua. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 5 minutos con TBS-T y se procedió a una segunda incubación de 1h a temperatura ambiente con anticuerpo secundario (en el caso de los anticuerpos primarios conjugados no se realizó este paso). En el caso de la incubación con anti-

$\beta$ -actina conjugado con HRP, se realizó un previo protocolo de stripping de 10 minutos con un tampón comercial (Western Blot Stripping Buffer, Santa Cruz Biotechnology, sc-281698) y se repitió el bloqueo de la membrana. Las membranas fueron reveladas utilizando el principio de la quimioluminiscencia con una solución de peróxido y sustrato ECL comercial (SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate, ThermoFisher Scientific, 34075). La señal emitida fue captada mediante el aparato LAS 100 (GE Healthcare) y las bandas fueron cuantificadas con el programa de análisis de imagen ImageStudio Software (Li-COR).

Anticuerpo	Dilución de trabajo	Eluyente	Nº de referencia	Casa Comercial
Anti- $\beta$ -actina monoclonal de ratón conjugado con HRP	1:25000	BSA 5% en TBS	A3854	Sigma-Aldrich (Merck)
Anti- $\alpha$ -SMA monoclonal de ratón	1:1000	Tampón de bloqueo	A5228	Sigma-Aldrich (Merck)
Anti-citoqueratina-8 monoclonal de conejo	1:5000	Tampón de bloqueo	ab53280	Abcam

Tabla 2: Anticuerpos utilizados para la revelación de membranas

## Resultados

### 1. La bleomicina y las IPFLMSC disminuyen del peso corporal.

El análisis del porcentaje de pérdida de peso corporal de ratones se ha realizado con los datos de día 4 como medida indirecta del daño pulmonar, y de día 14 del tratamiento, para comprobar si alguno de los grupos presenta una recuperación significativa en el desarrollo de la patología. Los resultados de día 4 muestran que la bleomicina reduce significativamente el peso ( $P=0,006$ ). En concreto, las diferencias significativas se observan cuando se comparan el grupo PBS-PBS con el grupo Bleo-PBS ( $P=0,019$ ) y el grupo PBS-nonILD-LMSC con el Bleo-nonILD-LMSC ( $P=0,002$ ) (Fig. 3). Las IPFLMSC también demuestran tener un efecto en la disminución del peso corporal, ya que el grupo PBS-IPFLMSC presenta diferencias que son significativas con los grupos control ( $P=0,01$ ) y non-ILD-LMSC ( $P=0,001$ ). Debido a esta reducción del peso, el grupo Bleo-IPFLMSC no presenta diferencias significativas con el grupo PBS-IPFLMSC (Fig. 5A).

En cuanto a los resultados de día 14, la bleomicina produce el mismo efecto significativo que las pérdidas de peso de día 4, con diferencias que son significativas en los grupos control ( $P=0,001$ ) y non-ILD-LMSC ( $P=0,003$ ) (Fig. 5B). Además, las IPF-LMSC también mantienen el efecto reductor del peso corporal en el día 14, ya que el grupo PBS-IPFLMSC vuelve a presentar diferencias con los grupos PBS-PBS ( $P=0,0001$ ) y PBS-non-ILD-LMSC ( $P=0,0001$ ) (Fig. 5B).

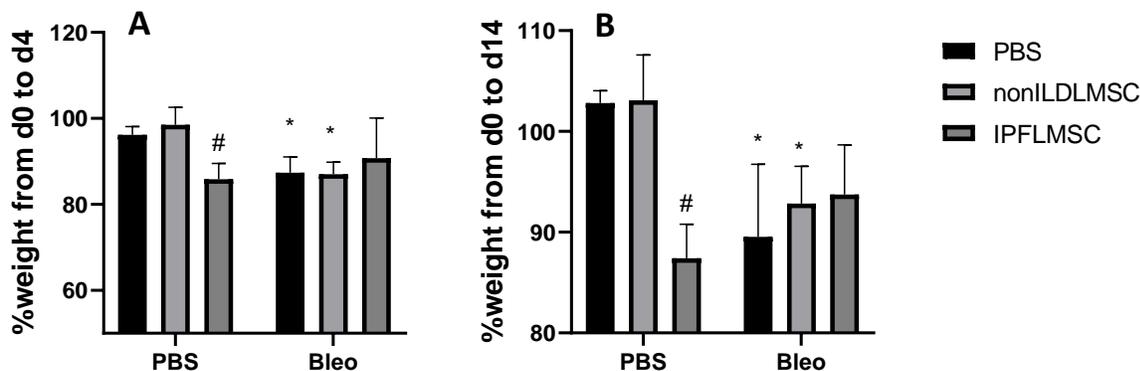


Fig. 5: Promedio del % de pérdida de peso de día 4 (A) y día 14 (B) respecto a día 0. El símbolo \* representa diferencias significativas entre los grupos PBS y Bleo, por ejemplo \* representa la diferencia significativa entre PBS-PBS y Bleo-PBS. El símbolo # señala la diferencia entre los subgrupos del grupo PBS. Un ANOVA de 2 vías y el test multiparamétrico Bonferroni han sido utilizados para analizar diferencias entre grupos.

## 2. La inoculación de LMSC no tiene efecto sobre el número de células del sistema inmune del BAL.

La bleomicina aumenta la concentración de células del sistema inmunitario presentes en el BAL, ya que al comparar el número de eventos por  $\mu\text{l}$  observamos diferencias significativas en linfocitos ( $P=0,0281$ ), macrófagos ( $P=0,0068$ ) y granulocitos ( $P=0,0006$ ) (Fig. 6). En condiciones normales, los granulocitos son el tipo celular más abundante. En cambio, en presencia de bleomicina, los linfocitos son los más abundantes, al ser los que presentan un mayor % de incremento con la bleomicina (9 veces mayor) en comparación a los macrófagos (7 veces mayor) y los granulocitos (6 veces mayor). Por otro lado, no observamos diferencias causadas por el factor de células, ni en ratones sanos ni en ratones tratados con bleomicina.

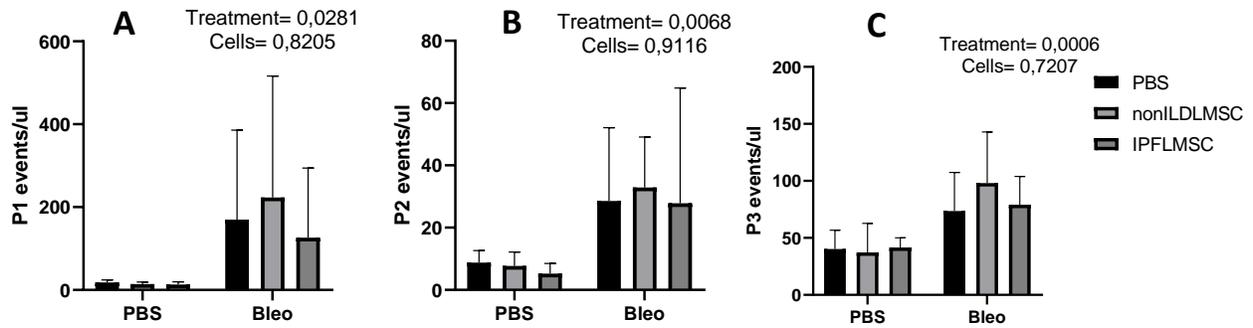


Fig. 6: Número de eventos de linfocitos (A), macrófagos (B) y granulocitos (C) por  $\mu\text{l}$ . Treatment hace referencia al tipo de administración que recibieron y Cells al tipo de células que fueron inoculadas. Un ANOVA de 2 vías y el test multiparamétrico Bonferroni han sido utilizados para analizar diferencias entre grupos.

### 3. La expresión de marcadores proinflamatorios no está afectada por las LMSC ni la bleomicina.

La expresión pulmonar del marcador de infiltración de monocitos, el MCP-1, no está significativamente incrementada en respuesta a la bleomicina ( $P=0,356$ ) (Fig. 7A). Asimismo, la expresión de citoquinas proinflamatorias no se ve alterada por la bleomicina, a excepción de la expresión de la interleuquina6 (IL-6) (Fig. 7B), en la que se puede observar una clara tendencia a aumentar que no es significativa por la variabilidad en la respuesta a la bleomicina ( $P=0,08$ ). La inoculación de células tampoco induce diferencias significativas, ni en los subgrupos PBS ni en los Bleo, en la expresión de los genes MCP-1 ( $P=0,356$ ), IL-6 ( $P=0,4396$ ), TNF- $\alpha$  ( $P=0,9721$ ) y IL-1 $\beta$  ( $P=0,4035$ ). En la Fig. 7C y 7D podemos observar los niveles de expresión de TNF-  $\alpha$  y IL-1 $\beta$  respectivamente.

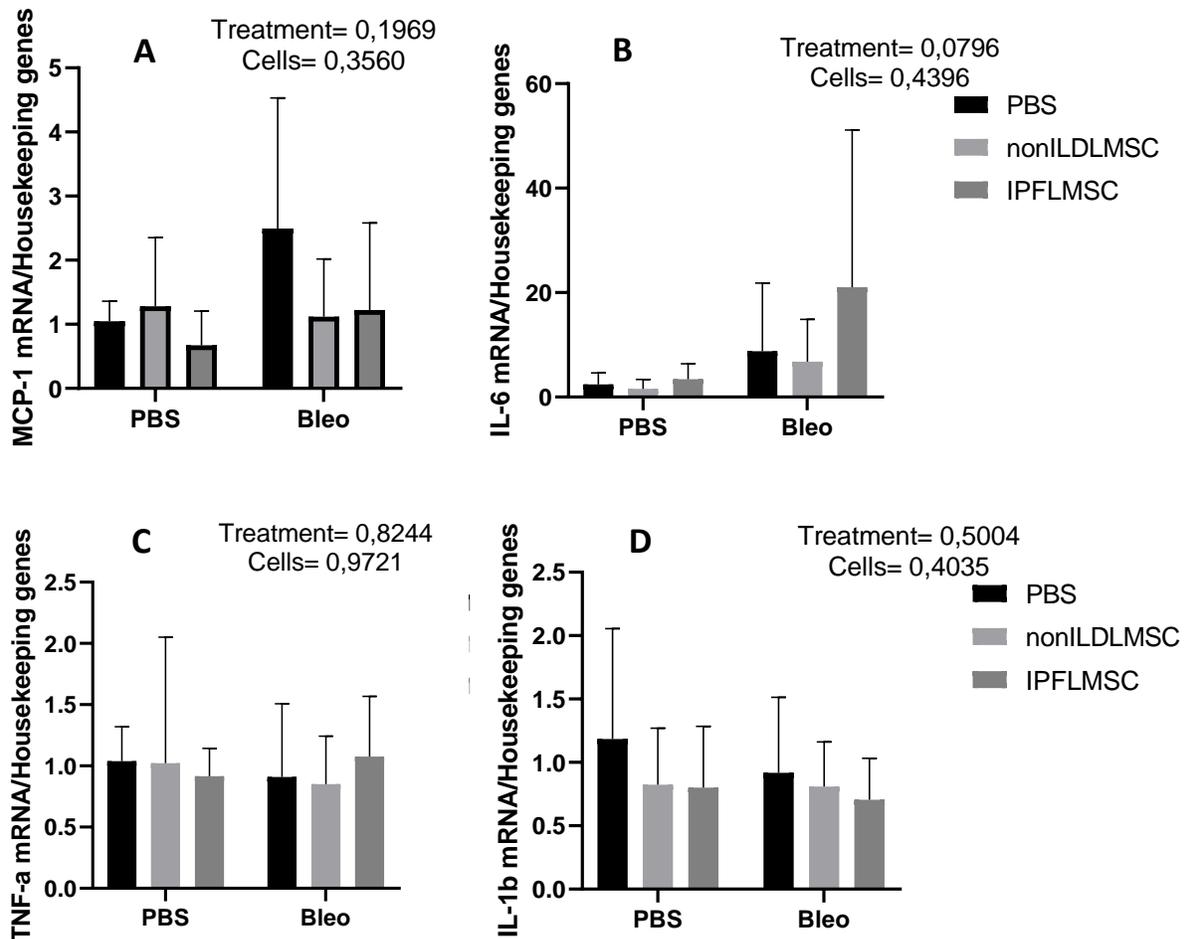


Fig. 7: Expresión de proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) (A), interleucina-6 (IL-6) (B), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (C) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (D) relativa a gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenas (GAPDH) e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT). Treatment hace referencia a la administración que recibieron y Cells a las células inoculadas. Un ANOVA de 2 vías y el test multiparamétrico Bonferroni han sido utilizados para analizar diferencias entre grupos.

#### 4. La inoculación de LMSC no afecta la expresión de componentes de la matriz extracelular inducida por bleomicina.

En la expresión de componentes de la matriz extracelular, se observa cómo tanto la expresión de colágeno como de fibronectina1 (Fig. 8A y 8B) se ven aumentadas por la bleomicina ( $P=0,015$  y  $0,012$  respectivamente). El estudio multiparamétrico de la expresión de colágeno indica que el efecto de la bleomicina presenta una tendencia a aumentar más evidente en el grupo Bleo-PBS ( $P=0,059$ ). Tanto las non-ILD-LMSC como las IPF-LMSC no modifican la expresión de colágeno ( $P=0,669$ ) ni de fibronectina ( $P=0,857$ ), ni por si solas ni ante la presencia de la bleomicina. En la expresión de acta-2 no se observan diferencias significativas por el tratamiento con bleomicina

( $P=0,328$ ). Tampoco hay diferencias significativas por el efecto de las células en la expresión de acta-2, ni por si solas ni en presencia de bleomicina ( $P=0,8573$ ) (Fig. 8C).

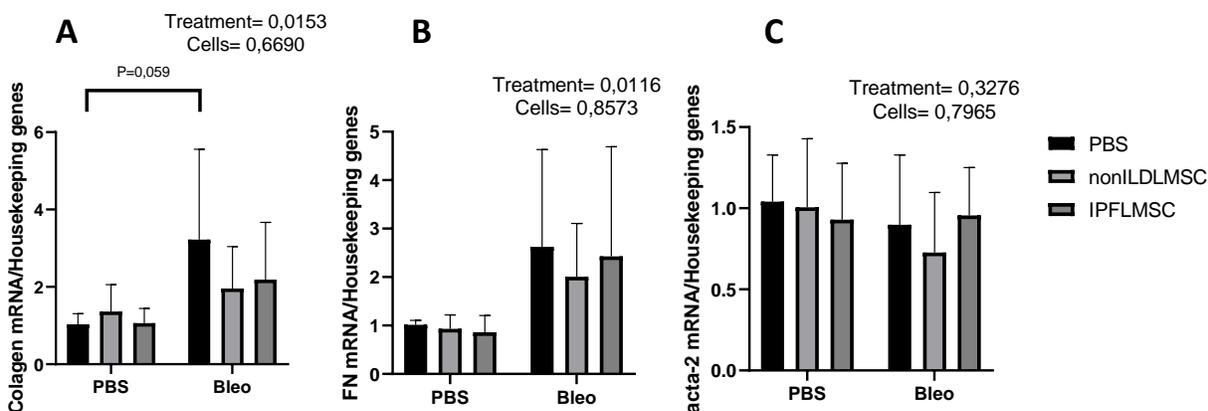


Fig. 8: Expresión de colágeno (A), fibronectina (B), y acta-2 (C) relativa a gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenas (GAPDH) e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT). Treatment hace referencia a la administración que recibieron y Cells a las células inoculadas. Un ANOVA de 2 vías y el test multiparamétrico Bonferroni han sido utilizados para analizar diferencias entre grupos.

## 5. La inoculación de IPFLMSC, en presencia de bleomicina, aumenta la concentración proteica de $\alpha$ -SMA y citoqueratina-8

La bleomicina no incrementa de manera significativa la concentración de  $\alpha$ -SMA ( $P=0,1503$ ) porque hay variabilidad de respuesta entre los grupos Bleo. En concreto, se observa un nivel significativamente mayor de  $\alpha$ -SMA en el subgrupo Bleo-IPF-LMSC en comparación con el subgrupo Bleo-nonILD-LMSC ( $P=0,0094$ ). A diferencia de la administración de bleomicina, la inoculación de LMSC aumenta significativamente la concentración de  $\alpha$ -SMA. El efecto de las células se observa al comparar el grupo Bleo-IPFLMSC con el grupo PBS-PBS ( $P= 0,0237$ ) y Bleo-non-ILD-LMSC ( $P=0,0094$ ). Considerando ambos análisis se deduce que las IPF-LMSC, pero no las non-ILD-LMSC, son responsables del incremento de  $\alpha$ -SMA. Por el contrario, en ausencia de bleomicina ni las IPF-LMSC ni las non-ILD-LMSC parecen tener efecto en la proteína  $\alpha$ -SMA (Fig. 9).

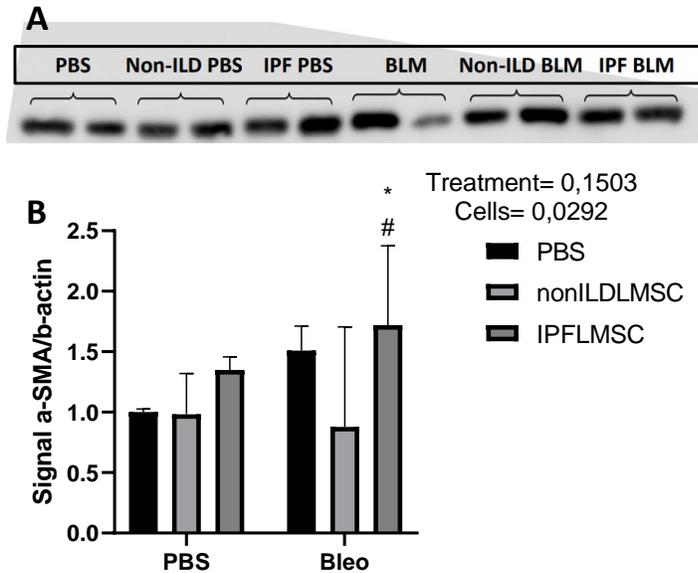


Fig. 9: A. Niveles de proteína de  $\alpha$ -SMA. B. Cuantificación de la señal de las bandas de  $\alpha$ -SMA normalizada con el control de carga ( $\beta$ -actina). El símbolo \* representa los diferencias significativas entre los grupos PBS y Bleo. El símbolo # señala la diferencia dentro del grupo de Bleo o PBS. Un ANOVA de 2 vías y el test multiparamétrico Bonferroni han sido utilizados para analizar diferencias entre grupos.

En cuanto a lo citoqueratina-8, la bleomicina sí que aumenta la concentración de esta proteína ( $P=0,001$ ). Este incremento sólo se observa en el grupo Bleo-IPFLMSC al compararlo con los grupos PBS-PBS ( $P=0,004$ ) y PBS-nonILDLMSC ( $P=0,036$ ). Las non-ILD-LMSC no parecen tener ningún efecto, ni por si solas ni en presencia de bleomicina (Fig. 10).

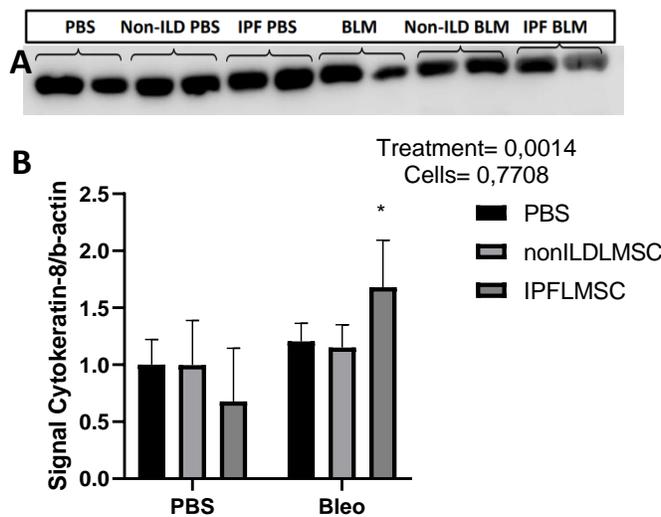


Fig.10: A. Niveles de proteína de Citoqueratina-8. B. Cuantificación de la señal de las bandas de Citoqueratina-8 normalizada con el control de carga ( $\beta$ -actina). El símbolo \* representa diferencias significativas entre los grupos PBS

y Bleo. Un ANOVA de 2 vías y el test multiparamétrico Bonferroni han sido utilizados para analizar diferencias entre grupos.

## Discusión

La IPF es una enfermedad pulmonar crónica relacionada con el envejecimiento que actualmente carece de tratamiento efectivo, resultando letal, por lo que su investigación dirigida a esclarecer las bases moleculares y celulares sigue siendo necesaria (Sueblinvong, et al. 2010). Este estudio se ha centrado en conocer el papel de las LMSC humanas sobre pulmones con un ambiente fibrótico, ya que en resultados anteriores *in vitro* se observó que las LMSC de pacientes IPF adquieren un fenotipo miofibroblástico y que, en presencia de TGF- $\beta$ , aumenta la expresión de PAI-1, una proteína que inhibe las enzimas encargadas de degradar la matriz extracelular, por lo que la actividad de PAI-1 induce la acumulación de componentes de la matriz extracelular (Gharaee-Kermani, et al. 2008). Este es el primer estudio en el que se ha investigado el papel de las MSC pulmonares. Otros estudios, centrados en células madre mesenquimales (MSC), humanas o de ratón, han utilizado células de otros tejidos como la médula ósea o el tejido adiposo. Estos estudios están enfocados en analizar el potencial terapéutico de las MSC y demuestran que la inoculación de estas células en modelos murinos de fibrosis inducida por bleomicina disminuye la concentración de citoquinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF- $\alpha$ , y la expresión  $\alpha$ -SMA, reduciendo así la inflamación y la fibrosis (Gad, et al. 2020). Esto no se correlaciona con nuestros resultados, ya que las non-ILD-LMSC no parecen atenuar efecto de la bleomicina, a excepción de la expresión de colágeno, donde se observa una tendencia en la que sólo el grupo Bleo-PBS presenta una mayor expresión que el grupo PBS-PBS, lo que podrían sugerir que las LMSC de individuos sin enfermedad pulmonar intersticial limitan parcialmente el efecto profibrótico inducido por la bleomicina.

En los estudios de las MSC existe una gran variabilidad en la metodología, ya que hay divergencias en el número y el tipo de MSC inoculadas, la vía utilizada para la inoculación de estas células y el momento en el que son inoculadas (Srouf y Thébaud, 2015). El número de células es un factor importante ya que se desconocía si una dosis elevada de MSC podría provocar efectos adversos. Sin embargo, estudios demuestran que en pacientes con IPF, elevadas dosis de MSC, del orden de billones de células, no perjudican a la salud del paciente, si no que en algunos casos se observa una mayor reducción en la progresión de la patología (Averyanov, et al. 2020) (Zhao et al. 2021). El momento de la inoculación es de gran importancia

ya que puede cambiar totalmente el enfoque del estudio, de manera que, se puede estudiar el efecto terapéutico de las MSC inoculándolas una vez establecida la patología (día 14 a partir de la administración de bleomicina) o podemos observar el efecto preventivo si se inoculan el mismo día de la administración del agente profibrótico. En el caso de las MSC de médula ósea (BMMSC, *bone marrow MSC*), la inoculación temprana parece tener efectos más beneficios que la inoculación tardía (Zhang, *et al.* 2019). El presente estudio, más que la resolución de la enfermedad, se enfoca en el papel que tienen las LMSC en el desarrollo de la IPF. El modelo animal utilizado también influye en la variabilidad de los resultados ya que, en el análisis realizado por Srour y Thébaud (2015), se comparó el efecto de la inoculación de MSC en la expresión de TNF- $\alpha$  de varios estudios, y solo en un estudio, el cual utilizaron ratones SCID en lugar de ratones C57BL/6 o ratas SD, se observó una disminución de la expresión de TNF- $\alpha$ , es decir, un efecto anti-inflamatorio de las MSC. En el caso de las LMSC, no se observa este efecto anti-inflamatorio. Esto puede deberse a la variabilidad de la metodología mencionada anteriormente. Por ejemplo, la cantidad de células que fueron inoculadas puede ser la causa de estas diferencias con respecto a otros estudios, ya que en otros estudios (Huang *et al.* 2015) se han inoculado una cantidad de MSC 10 veces mayor que en nuestro estudio.

El envejecimiento es un mecanismo natural que afecta a la viabilidad y funcionalidad de todos los tipos celulares. Las IPF-LMSC presentan signos de envejecimiento acelerado de acuerdo con los resultados preliminares *in vitro*. Esta característica también se observa en estudios con BMMSC de pacientes IPF, que además de presentar un fenotipo senescente, tienen una limitada capacidad de reparación al inocularlas en modelos murinos con fibrosis inducida por bleomicina (Cárdenas, *et al.* 2018). Sin embargo, en nuestro estudio observamos que las LMSC no solo no disminuyen los efectos de la bleomicina en el desarrollo de la fibrosis, sino que además participan activamente en el desarrollo de la patología, ya que la inoculación de éstas, en presencia de bleomicina, aumenta la expresión de  $\alpha$ -SMA, una proteína presente en el citoesqueleto de los miofibroblastos que promueve un fenotipo contráctil en los fibroblastos (Shahar, *et al.* 1999). De manera que, el aumento en la expresión de esta proteína promueve la adquisición de un fenotipo miofibroblástico en las células pulmonares de ratón (Fonseca, *et al.* 2011).

La bleomicina es un antitumoral que era utilizado como tratamiento de algunos tipos de cáncer como el linfoma de Hodgkin. Posteriormente se observó que el uso de este fármaco estaba estrechamente relacionado con la aparición de fibrosis pulmonar idiopática (Sleijfer, 2001). En el presente estudio, se ha podido observar que la bleomicina ha inducido la fibrosis pulmonar a nivel de expresión de mRNA y de peso corporal, ya que en los ratones del grupo Bleo se ha

producido una disminución del peso corporal y un aumento de la expresión de marcadores fibróticos. Además, la bleomicina ha demostrado, como en otros estudios (Izbiqui, *et al.* 2002), realizar un daño tisular, ya que han aumentado las poblaciones de células del sistema inmune en el BAL.

El pico de inflamación en el modelo murino con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina se da aproximadamente en el cuarto día desde la administración de bleomicina (Moore *et al.* 2008), esto explicaría porque en el día 14, momento en el que se obtuvieron las muestras, no se observan altos niveles de expresión de agentes proinflamatorios. Sin embargo, otros autores sí que observan inflamación en el día 14 (Gad *et al.* 2020). La fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, a diferencia de la IPF, presenta un desarrollo más rápido de la patología (Tashiro, *et al.* 2017) y puede llegar a resolverse (Zia, *et al.* 1992), por lo que los ratones de nuestro estudio pueden haber realizado una resolución temprana, mostrando así una baja expresión de marcadores proinflamatorios. Otra posibilidad de esta baja expresión es la variabilidad en la metodología utilizada por diferentes autores ya que, dependiendo del modelo animal, la dosis, la vía de administración de bleomicina y la duración del tratamiento se observan diferencias entre resultados de distintos estudios (Srouf y Thébaud, 2015).

La citoqueratina-8 es una proteína de los filamentos intermedios que se expresa de forma natural en las células del epitelio bronquial. En IPF y en ratones con fibrosis pulmonar inducida por dosis repetidas de bleomicina, la expresión de esta proteína se ve aumentada (Yi and Ku, 2013) (Redente, *et al.* 2021). Esta expresión aumentada se da en células epiteliales dañadas que pasan a estar en un estado celular transitorio, diferente al resto de células. Estas células dañadas, además de expresar citoqueratina-8, expresan factores profibrogénicos, de manera que promueven el desarrollo de la fibrosis pulmonar (Strunz, *et al.* 2020). Por esta razón no es de extrañar que en nuestro estudio, la bleomicina aumente la concentración de citoqueratina-8, siendo el grupo Bleo-IPFLMSC el único con diferencias significativas, por lo que las IPF-LMSC en presencia de bleomicina pueden tener un efecto en dicho aumento.

En conclusión, las IPF-LMSC parecen tener un papel clave en el desarrollo de la fibrosis pulmonar en presencia de un agente profibrótico. Este papel es específico de las LMSC de pacientes IPF porque las non-ILD-LMSC no desencadenan los mismos efectos. Podríamos considerar las IPF-LMSC como un factor promotor de la patología en el momento en el que hay un estímulo profibrótico.

## Bibliografía

- Álvarez, D., Cárdenes, N., Sellarés, J., Bueno, M., Corey, C., Hanumanthu, V. S., ... & Rojas, M. (2017). IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 313(6), L1164-L1173.
- Averyanov, A., Koroleva, I., Konoplyannikov, M., Revkova, V., Lesnyak, V., Kalsin, V., ... & Baklaushev, V. (2020). First-in-human high-cumulative-dose stem cell therapy in idiopathic pulmonary fibrosis with rapid lung function decline. *Stem cells translational medicine*, 9(1), 6-16.
- Cárdenes, N., Álvarez, D., Sellarés, J., Peng, Y., Corey, C., Wecht, S., ... & Rojas, M. (2018). Senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 1-10.
- Chuang, Hong-Meng, et al. "Mesenchymal stem cell therapy of pulmonary fibrosis: improvement with target combination." *Cell Transplantation* 27.11 (2018): 1581-1587.
- Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Du Bois, R. M. (2010). Strategies for treating idiopathic pulmonary fibrosis. *Nature reviews Drug discovery*, 9(2), 129-140.
- Fonseca, C., Abraham, D., & Renzoni, E. A. (2011). Endothelin in pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 44(1), 1-10.
- Gad, E. S., Salama, A. A. A., El-Shafie, M. F., Arafa, H. M. M., Abdelsalam, R. M., & Khatlab, M. (2020). The anti-fibrotic and anti-inflammatory potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and nintedanib in bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Inflammation*, 43(1), 123-134.
- Gharaee-Kermani, M., Hu, B., Phan, S. H., & Gyetko, M. R. (2008). The role of urokinase in idiopathic pulmonary fibrosis and implication for therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17(6), 905-916.
- Huang, K., Kang, X., Wang, X., Wu, S., Xiao, J., Li, Z., ... & Zhang, W. (2015). Conversion of bone marrow mesenchymal stem cells into type II alveolar epithelial cells reduces pulmonary fibrosis by decreasing oxidative stress in rats. *Molecular medicine reports*, 11(3), 1685-1692.
- Izbicki, G., Segel, M. J., Christensen, T. G., Conner, M. W., & Breuer, R. (2002). Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *International journal of experimental pathology*, 83(3), 111-119.

- Kajstura, J., Rota, M., Hall, S. R., Hosoda, T., D'Amario, D., Sanada, F., ... & Anversa, P. (2011). Evidence for human lung stem cells. *New England Journal of Medicine*, 364(19), 1795-1806.
- King Jr, T. E., Bradford, W. Z., Castro-Bernardini, S., Fagan, E. A., Glaspole, I., Glassberg, M. K., ... & Noble, P. W. (2014). A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 370(22), 2083-2092.
- King Jr, T. E., Pardo, A., & Selman, M. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet*, 378(9807), 1949-1961.
- Krauss, E., Gehrken, G., Drakopanagiotakis, F., Tello, S., Dartsch, R. C., Maurer, O., ... & Guenther, A. (2019). Clinical characteristics of patients with familial idiopathic pulmonary fibrosis (f-IPF). *BMC pulmonary medicine*, 19(1), 1-13.
- Maher, T. M., Wells, A. U., & Laurent, G. J. (2007). Idiopathic pulmonary fibrosis: multiple causes and multiple mechanisms?. *European Respiratory Journal*, 30(5), 835-839.
- Mercader-Barceló, J., Truyols-Vives, J., Río, C., López-Safont, N., Sala-Llinàs, E., & Chaplin, A. (2020). Insights into the role of bioactive food ingredients and the microbiome in idiopathic pulmonary fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6051.
- Moore, B. B., & Hogaboam, C. M. (2008). Murine models of pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(2), L152-L160.
- Redente, E. F., Black, B. P., Backos, D. S., Bahadur, A. N., Humphries, S. M., Lynch, D. A., ... & Riches, D. W. (2021). Persistent, progressive pulmonary fibrosis and epithelial remodeling in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 64(6), 669-676.
- Richeldi, L., Du Bois, R. M., Raghu, G., Azuma, A., Brown, K. K., Costabel, U., ... & Collard, H. R. (2014). Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 370(22), 2071-2082.
- Rohart, F., Mason, E. A., Matigian, N., Mosbergen, R., Korn, O., Chen, T., ... & Wells, C. A. (2016). A molecular classification of human mesenchymal stromal cells. *PeerJ*, 4, e1845.
- Sauleda, J., Núñez, B., Sala, E., & Soriano, J. B. (2018). Idiopathic pulmonary fibrosis: epidemiology, natural history, phenotypes. *Medical Sciences*, 6(4), 110.
- Shahar, I., Fireman, E., Topilsky, M., Grief, J., Schwarz, Y., Kivity, S., ... & Spirer, Z. (1999). Effect of endothelin-1 on  $\alpha$ -smooth muscle actin expression and on alveolar fibroblasts proliferation in interstitial lung diseases. *International journal of immunopharmacology*, 21(11), 759-775.
- Sinclair, K., Yerkovich, S. T., & Chambers, D. C. (2013). Mesenchymal stem cells and the lung. *Respirology*, 18(3), 397-411.
- Sleijfer, S. (2001). Bleomycin-induced pneumonitis. *Chest*, 120(2), 617-624.

- Somogyi, V., Chaudhuri, N., Torrisi, S. E., Kahn, N., Müller, V., & Kreuter, M. (2019). The therapy of idiopathic pulmonary fibrosis: what is next?. *European Respiratory Review*, 28(153).
- Srour, N., & Thébaud, B. (2015). Mesenchymal stromal cells in animal bleomycin pulmonary fibrosis models: a systematic review. *Stem cells translational medicine*, 4(12), 1500-1510.
- Strunz, M., Simon, L. M., Ansari, M., Kathiriya, J. J., Angelidis, I., Mayr, C. H., ... & Schiller, H. B. (2020). Alveolar regeneration through a Krt8+ transitional stem cell state that persists in human lung fibrosis. *Nature communications*, 11(1), 1-20.
- Sueblinvong, V., & Weiss, D. J. (2010). Stem cells and cell therapy approaches in lung biology and diseases. *Translational Research*, 156(3), 188-205.
- Tashiro, J., Rubio, G. A., Limper, A. H., Williams, K., Elliot, S. J., Ninou, I., ... & Glassberg, M. K. (2017). Exploring animal models that resemble idiopathic pulmonary fibrosis. *Frontiers in medicine*, 4, 118.
- Truyols, J., Martin, A., Jahn, A., Rio, C., Sala, E., & Mercader, J. (2021). Role of mitochondrial function of lung mesenchymal stem cells in idiopathic pulmonary fibrosis.
- Truyols J, Ortega G, Martín-Medina A, Elowson L, Ramis JM, Jahn A, Río C, Monjo M, Westergren-Thorsson G, Sala-Llinàs E, Mercader-Barceló J. (2021). Lung mesenchymal stem cells from idiopathic pulmonary fibrosis patients present senescence features and express  $\alpha$ SMA myofibroblast marker. *Congreso SEBBM*.
- Yi, H., & Ku, N. O. (2013). Intermediate filaments of the lung. *Histochemistry and cell biology*, 140(1), 65-69.
- Zhang, E., Yang, Y. E., Zhang, J., Ding, G., Chen, S., Peng, C., ... & Shao, H. (2019). Efficacy of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in animal models of pulmonary fibrosis after exposure to bleomycin: A meta-analysis. *Experimental and therapeutic medicine*, 17(3), 2247-2255.
- Zhao, Y., Yan, Z., Liu, Y., Zhang, Y., Shi, J., Li, J., & Ji, F. (2021). Effectivity of mesenchymal stem cells for bleomycin-induced pulmonary fibrosis: a systematic review and implication for clinical application. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 1-14.
- Zia, S., Hyde, D. M., & Giri, S. N. (1992). Development of a bleomycin hamster model of subchronic lung fibrosis. *Pathology*, 24(3), 155-163.