



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO**



FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS

Medición de los niveles de expresión de los microRNAs
Let 7a y Let 7d en lavado bronquiolo-alveolar y suero
de pacientes con Neumonitis por Hipersensibilidad y
Fibrosis Pulmonar Idiopática

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Xochipilzihuitl Quintero Millán

Director de tesis:

Dr. Eduardo Montes Martínez

Codirectora:

Dra. Carla García Morales

Toluca, Estado de México, Noviembre de 2024



Contenido

Contenido	2
Índice de figuras	4
Índice de tablas	5
Lista de abreviaturas	7
Resumen	11
Marco teórico	12
Fibrosis	12
Fibrosis pulmonar	13
Cicatrización del tejido pulmonar	13
Fibrosis pulmonar y sus componentes	16
Origen de los fibroblastos/miofibroblastos	17
Enfermedades Pulmonares Intersticiales	18
Criterios para la clasificación de EPIDs	19
Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)	21
Mecanismos moleculares para el desarrollo de la FPI	21
Efectos del TGF- β 1 en la FPI	23
Neumonitis por hipersensibilidad (NH)	27
Diagnóstico diferencial entre la FPI y la NH fibrótica	28
Biomarcadores en la fibrosis pulmonar	30
MicroRNAs	31
miRNA Biogénesis, función y mecanismo de acción	33
miRNAs circulantes o extracelulares	35
miRNAs implicados en la fibrosis pulmonar	37
Let-7	39
Let-7a	40
Let-7d	40
Objetivo general	42
Objetivos particulares	42
Justificación	43
Hipótesis	43
Materiales y Métodos	44

Criterios de inclusión y exclusión	44
Para pacientes	44
Para los sujetos control (sanos)	44
Población de estudio	45
Extracción de RNA total del lavado bronquiolo-alveolar (LBA)	46
Extracción por Trizol	46
Extracción por columna (Qiagen)	47
Extracción por columna sin fenol (Qiagen)	48
Cuantificación de RNA total	48
Síntesis del DNA complementario por transcripción reversa (RT)	49
Transcripción Reversa con miScript II RT (SYBR Green)	49
Transcripción Reversa con miRCURY LNA RT (SYBR Green)	50
Transcripción Reversa con kit TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription (Sonda TaqMan)	51
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	53
Kit miScript SYBR Green PCR	53
kit miRCURY LN SYBR Green PCR	54
kit TaqMan Gene Expression Master Mix	55
Análisis in-silico para localizar los mRNA blancos ya reportados	57
Análisis estadísticos	57
Resultados	59
Análisis de la expresión de Let-7a y Let-7d en LBA	65
Análisis de la expresión de Let-7a y Let-7d en suero	67
Análisis in-silico de mRNA blancos para Let-7a y Let-7d y sus vías de señalización asociadas a la FPI	69
Discusión	71
Conclusiones	76
Bibliografía	77

Índice de figuras

Figura 1. Proceso de cicatrización en tejido pulmonar.....	15
Figura 2. Origen múltiple de los miofibroblastos	17
Figura 3. Señalización del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β 1).....	24
Figura 4. Biogénesis de los miRNAs	34
Figura 5. miRNAs extracelulares	36
Figura 6. Curva de amplificación resultado de la RT-qPCR para Cel_miR-39 utilizando la química de SYBR Green.	62
Figura 7. Curva de amplificación resultado de la RT-qPCR para Let-7a utilizando la química de Sonda TaqMan.....	63
Figura 8. Curva de amplificación resultado de la RT-qPCR para Let-7d cambiando el buffer de la RT y utilizando la química de SYBR Green.....	64
Figura 9. Expresión de Let-7a en muestras de LBA	65
Figura 10. Expresión de Let-7d en muestras de LBA	66
Figura 11. Expresión de Let-7a en muestras de suero	67
Figura 12. Expresión de Let-7d en muestras de suero	68
Figura 13. Vía de señalización del TGF- β 1 a través de KEGG.....	70

Índice de tablas

Tabla 1. Componentes para la RT siguiendo la química de SYBR Green.	49
Tabla 2. Ciclos de temperatura para la RT siguiendo la química de SYBR Green.	50
Tabla 3. Componentes para la RT siguiendo la química de SYBR Green usando el kit miRCURY LNA RT.	50
Tabla 4. Ciclos de temperatura para la RT siguiendo la química de SYBR Green usando el kit miRCURY LNA RT.	51
Tabla 5. Componentes para la RT siguiendo la química de Sonda TaqMan.	51
Tabla 6. Ciclos de temperatura para la pre-incubación de los miRNAs.	52
Tabla 7. Ciclos de temperatura para la RT siguiendo la química de Sonda TaqMan.	52
Tabla 8. Componentes para la detección de miRNAs por medio del kit miScript SYBR Green PCR.	53
Tabla 9. Programación del equipo QuantStudio 12K Flex, para la qPCR utilizando el del kit miScript SYBR Green PCR.	54
Tabla 10. Componentes para la detección de miRNAs por medio del kit miRCURY LN SYBR Green PCR.	54
Tabla 11. Programación del equipo QuantStudio 12K Flex, para la qPCR utilizando el kit miRCURY LN SYBR Green PCR.	55
Tabla 12. Componentes para la detección de miRNAs por medio del kit TaqMan Gene Expression Master Mix.	55
Tabla 13. Programación del equipo QuantStudio 12K Flex, para la qPCR utilizando el kit TaqMan Gene Expression Master Mix.	56
Tabla 14. Modificaciones al protocolo de la química de detección de SYBR Green utilizando como miRNA de prueba a Let-7a.	60
Tabla 15. Modificaciones al protocolo de la química de detección de SYBR Green utilizando como miRNA de prueba a Let-7d.	60
Tabla 16. Modificaciones al protocolo de la química de detección de Sonda TaqMan utilizando como miRNA de prueba a Let-7a.	61

Tabla 17. Modificaciones al protocolo de la química de detección de SYBR Green usando el kit miRCURY completo. 64

Tabla 18. Resumen de las principales vías de señalización y mRNA a los que se unen los miRNAs Let-7a y Let-7d..... 69

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Nombre
3'UTR	Región 3' no traducida
5'UTR	Región 5' no traducida
AGO	Proteína Argonauta
AGO2	Proteína Argonauta 2
AI	Antígeno Incitador
ALK	Cinasa Similar a receptor de Activina (del inglés, Activin receptor-Like Kinases)
ATS/ERS	American Thoracic Society/European Respiratory Society
cDNA	DNA complementario
CEA	Células Epiteliales Alveolares
CEAI	Células Epiteliales Alveolares tipo I
CEAII	Células Epiteliales Alveolares tipo II
circRNA	RNA circular
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
DGCR8	Gen 8 de la región crítica del síndrome de DiGeorge
dsRNA	RNA de doble cadena
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico (del inglés, Epidermal Growth Factor)
EPG	Enfermedad Pulmonar del Granjero
EPIDs	Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos (del inglés, Fibroblast Growth Factor)
FPI	Fibrosis Pulmonar idiopática
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad
HIF-1α	Factores de Transcripción Inducibles por Hipoxia 1 α
HIF-2α	Factores de Transcripción Inducibles por Hipoxia 2 α

HMGA2	Grupo A2 de alta movilidad (del inglés High Mobility Group AT-hook 2)
IGF-I	Factor de Crecimiento similar a la Insulina (del inglés insulin-like growth factor)
IL-13	Interleucina 13
IL-1β	Interleucina 1 Beta (del inglés interleukin-1 Beta)
IL-6	Interleucina 6
KL-6	Antígeno Krebs von den Lungen-6
KGF	Factor de Crecimiento de Queratinocitos (del inglés Keratinocyte Growth Factor)
LBA	Lavado Bronquilo-Alveolar
lncRNA	RNA largo no codificante
LOXL2	Lisil Oxidasa tipo 2
MAPK	Proteína Quinasa Qctivada por Mitógenos
MEC	Matriz Extracelular
miRNA	microRNA
MMPs	Metaloproteasas de Matriz (del inglés Matrix Metalloproteinase)
MO	Medula ósea
mRNA	RNA mensajero
ncRNA	RNA no codificante
NH	Neumonitis por Hipersensibilidad
NIA	Neumonía Intersticial Aguda
NIH	Neumonía Intersticial Habitual
NII	Neumonías Intersticiales Idiopáticas
NIU	Neumonía Intersticial Usual
NOC	Neumonía Organizada Criptogénica
ORF	Marco de Lectura Abierta (del inglés Open Reading Frame)
P.ej.	Por ejemplo
PACT	Proteína Activadora de PKR
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
piRNA	RNA que interactúa con PIWI
pre-miRNA	Precursor del miRNA
pri-miRNA	Transcrito primario del miRNA
RBP	Proteínas de unión a RNA
RILI	Lesión Pulmonar Inducida por Radiación
RISC	Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (por sus siglas en inglés, RISC)
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Transcripción Reversa
SP-A	Proteína Surfactante A (del inglés Surfactant Protein-A)
SP-D	Proteína Surfactante D (del inglés Surfactant Protein-D)
TAB3	Proteína de unión 3
TAZ	coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (del inglés Transcriptional oactivator with PDZ-binding motif)
TC	Tomografías Computarizadas
TCAR	Tomografía Computarizada de Alta Resolución
TEM	Transición Epitelio-Mesénquima
TEndM	Transición Endotelio-Mesenquima
TGF- β1	Factor de Crecimiento Transformante beta tipo 1 (del inglés Transforming Growth Factor Beta 1)
TGFBR1	Receptor del TGF- β tipo I
TGFBR2	Receptor del TGF- β tipo II
TGFBR3	Receptor del TGF- β tipo III
TGFβ	Factor de Crecimiento Transformante beta (del inglés Transforming Growth Factor Beta)
TIMPs	Inhibidores de Metaloproteasas de Matriz (del inglés Tissue Inhibitor of Metallo-Proteinases)

TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa (del inglés tumor necrosis factor-alpha)
TRBP	Proteína de unión a RNA de respuesta de transactivación
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (del inglés, Vascular Endothelial Growth Factor)
YAP	Proteína asociada a yes (del inglés Yes-associated protein)
α-AML	alfa- Actina de Musculo Liso

Resumen

Marco teórico. La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y la neumonitis por hipersensibilidad (NH) forman parte de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas. La FPI es una enfermedad fibrosante, crónica, progresiva y de etiología desconocida que deriva en la pérdida irreversible de la función pulmonar. En contraste, la NH es de etiología conocida, que se asocia a la exposición por inhalación a uno o varios antígenos, quienes presentarán una respuesta inmunitaria exagerada del tipo inflamatoria y/o fibrótica. Hasta el momento, no existen pruebas moleculares que discriminen de manera confiable entre la FPI de la NH fibrótica debido a las similitudes de ambas enfermedades. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo fue determinar si los miRNAs Let-7a y Let-7d podrían funcionar como posibles biomarcadores diferenciales entre ambas patologías.

Metodología. Los niveles de expresión de los miRNAs Let-7a y Let-7d mediante la técnica de RT-qPCR tiempo real, en muestras de lavado bronquilo-alveolar (LBA) y sueros de pacientes diagnosticados con NH, FPI y controles.

Resultados. Los niveles de expresión del miRNA Let-7a en los LBA se encontraron sobre expresados en el grupo con FPI y NH respecto al grupo control, siendo estadísticamente significativos solo para el grupo con FPI ($P= 0.0119$) pero no así entre el grupo de FPI y NH ($P=0.8423$), sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de expresión para el miRNA Let-7d. Los niveles séricos de ambos miRNAs Let-7a y Let-7d se encontraron disminuidos en el grupo con FPI ($P= 0.0214$ y 0.0326) y NH ($P= 0.0034$ y 0.0220) respecto al grupo control, sin embargo, no se observan diferencias entre el grupo de FPI vs NH ($P= 0.8811$ y 0.9996).

Conclusión. Los resultados obtenidos sugieren por primera vez la participación de Let-7a y Let-7d en la NH debido a su participación en la regulación de la vía de señalización del TGF- β 1/SMAD. Se reafirma la participación de Le-7d en la FPI, añadiendo ahora a Let-7a en la regulación de los receptores del TGF- β 1 (TGFBR1 y 2) y del factor de transcripción HMGA2.

Marco teórico

Fibrosis

La fibrosis se define, indistintamente del tejido donde se presente, como el resultado final a una respuesta tisular de reparación y/o cicatrización descontrolada, a partir de una inflamación crónica producto de una respuesta inmunitaria persistente (Wynn, 2007, 2008). La inflamación crónica es el resultado de una exposición recurrente a diferentes estímulos como pueden ser: infecciones persistentes y/o constantes, reacciones inmunitarias, exposición a agentes químicos volátiles, lesiones mecánicas y por radiación ionizante produciendo lesiones pulmonares inducidas por radiación (RILI del inglés, radiation-induced lung injury), entre otros (Arroyo-Hernández et al., 2021; Wynn, 2008).

La fibrosis se caracteriza, independientemente del agente causal, como aquella remodelación tisular a partir de la formación de tejido fibrosante, debido a un depósito excesivo de componentes de la matriz extracelular (MEC) tales como: colágeno, fibronectina y elastina. Estos componentes pueden depositarse en la periferia del tejido dañado durante el proceso de cicatrización y por lo tanto de reparación (Pardali et al., 2017; Vettori, 2012).

La formación de tejido fibrótico es de hecho, un mecanismo normal y eficiente de reparación, en donde la acumulación de componentes de la MEC es transitoria. Sin embargo, cuando la lesión se vuelve persistente, dicho mecanismo pierde la capacidad de autorregularse, resultando en la acumulación de la MEC, comprometiendo de esta manera la arquitectura tisular y la funcionalidad del órgano. Por lo tanto, si la respuesta de reparación deja de regularse, el resultado final podría desencadenar en una insuficiencia orgánica y eventualmente a la falla de este (Henderson et al., 2020). A este proceso de eventos no regulados se le conoce también como fibrogénesis o mecanismo fibrótico. En el que participan una amplia variedad de componentes moleculares (citocinas, quimiocinas y otras moléculas) y celulares (fibroblastos, células del sistema inmune, etc.) (O'Reilly, 2016).

Existe un grupo de patologías donde una de las características principales es el desarrollo de la fibrosis (Golec et al., 2023; Wynn, 2007). A dichas patologías también se les denomina como fibroproliferativas o fibróticas debido a los múltiples mecanismos celulares y moleculares que interaccionan y desencadenan un proceso inflamatorio y/o fibrótico. De hecho, estos mecanismos pueden afectar a diferentes órganos y tejidos, tales como: el hígado, los riñones, los pulmones, el corazón o la piel (Nangia-Makker et al., 2022; Weiskirchen et al., 2019). El espectro de trastornos fibróticos abarca desde aquellas en donde la fibrosis se extiende sistemáticamente, como sucede en la esclerosis sistémica, hasta aquellas patologías fibróticas locales, que atacan directamente a un órgano como sucede en la fibrosis miocárdica, la fibrosis hepática, la fibrosis pulmonar y la fibrosis renal entre otras (Ding et al., 2013; Peng et al., 2019; Rosenbloom et al., 2017; Varga & Abraham, 2007).

Fibrosis pulmonar

El desarrollo y evolución de la fibrosis pulmonar es un proceso patológico que se engloba dentro de las enfermedades fibróticas pulmonares. Estas patologías pulmonares son clasificadas en aquellas de etiología desconocida como lo sería la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) o en aquellas donde el desarrollo de la fibrosis es el resultado final de una inflamación crónica como en la neumonitis por hipersensibilidad fibrótica (NH) (Morris, 2006; Selman et al., 2001).

Cicatrización del tejido pulmonar

Una vez que se produce una lesión en el tejido pulmonar da inicio el proceso de cicatrización (Guillamat-Prats, 2021). Inicialmente, cuando las células del epitelio y /o endotelio sufren una lesión, sintetizan mediadores inflamatorios que desencadenan la activación de la cascada de coagulación, permitiendo la formación de un coágulo, es decir la formación de MEC provisional (Figura1) (Wynn, 2011).

El tipo de células que conforman el 99% la superficie alveolar, son células del epitelio alveolar tipo I y II (CEAI y CEAll) o también conocidas como Neumocitos tipo I y II. El porcentaje de presencia en la superficie alveolar es el 96% y 4% respectivamente. Una cualidad importante de las CEAll es su función en la

regeneración del epitelio alveolar después de haberse producido una lesión (Castranova et al., 1988).

Durante el proceso de cicatrización, el tipo de células que intervienen principalmente son las CEA y los fibroblastos, ambos tipos celulares producen metaloproteasas de matriz (MMPs) tales como: MMP-1, MMP-7, MMP-8 y MMP- 9, que alteran a la membrana basal, permitiendo que las células inflamatorias puedan llegar al sitio de la lesión (p. ej., neutrófilos, macrófagos, linfocitos y eosinófilos) (Craig et al., 2015). La producción de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas mediada por los fibroblastos y las CEA propicia el reclutamiento de células del sistema inmune (mencionadas anteriormente) y estas a su vez secretan citocinas y factores de crecimiento, de entre los cuales está el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), Interleucina 13 (IL-13) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Lei et al., 2016; Parsons et al., 2007; Wynn, 2003). Todo esto convierte a la zona de lesión en un ambiente de retroalimentación positiva en donde las mismas células se encargan de secretar moléculas que ayudan a la activación y migración de otros tipos celulares para completar el proceso de cicatrización.

Durante el proceso de cicatrización, los miofibroblastos funcionan como las principales células efectoras de la remodelación y reparación de tejidos. Además, se caracterizan por un marcado aumento en los niveles de expresión de la α -actina del músculo liso (α -AML), que es inducida por el estímulo de TGF- $\beta 1$ y promueve esta diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto (Hinz et al., 2007; B. Hu et al., 2003). Los miofibroblastos secretan una mayor concentración de componentes de la MEC (colágeno I y III), que proporcionan un ambiente favorable para que, a través de la MEC, las células epiteliales/ endoteliales migren y procedan a dividirse promoviendo de esta manera, la regeneración del tejido dañado (Desmouliere et al., 1993; Hinz et al., 2001; Mori et al., 2005).

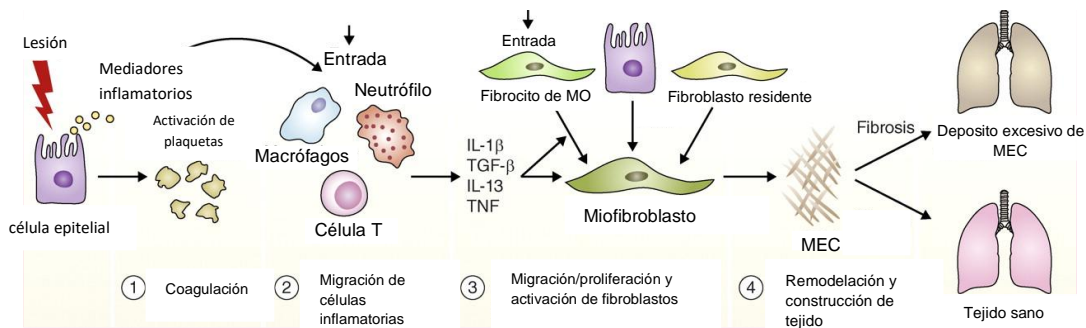


Figura 1. Proceso de cicatrización en tejido pulmonar. Al provocarse una lesión en las CEA da inicio un proceso denominado cicatrización, el cual consta de cuatro etapas. Coagulación (1), migración de células inflamatorias (2), migración/proliferación y activación de fibroblastos (3) y por último una fase de reconstitución de tejido (4) (Wynn, 2011).

Para que un proceso de cicatrización desencadene en el desarrollo de un proceso pro-fibrotico, se deben producir alteraciones que culminen en la acumulación excesiva de componentes de la MEC y en consecuencia se produzca una remodelación en la arquitectura pulmonar (Figura 1) (Todd et al., 2012). Por consiguiente, la fibrosis pulmonar puede definirse como aquel proceso patológico que, mediante la exposición continua a microlesiones de manera repetitiva, desencadenan la activación y/o diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y a su vez en un depósito excesivo de la MEC (Ortiz-Zapater et al., 2022).

Fibrosis pulmonar y sus componentes

La información reportada en algunas evidencias sugiere la participación de al menos 2 rutas para el desarrollo de fibrosis pulmonar: a) la ruta epitelial presentada por la FPI y b) la ruta inflamatoria donde se engloba a las restantes neumopatías intersticiales difusas diferentes a la FPI (como lo sería la Neumonitis por hipersensibilidad, sarcoidosis, enfermedades colágeno-vasculares, inhalación de partículas inorgánicas como la sílice, etc.) (Pardo & Selman, 2002). Esta hipótesis sugiere la participación e interacción de múltiples eventos moleculares tales como: (1) pérdida de células endoteliales y CEAI; (2) pérdida de la integridad de la membrana basal; (3) proliferación de CEAI y endoteliales con una MEC inapropiada sin la capacidad de restablecer la estructura normal alveolar, (4) reclutamiento y proliferación de los fibroblastos y miofibroblastos y, (5) acumulación excesiva de la MEC (Selman et al., 2001; Strieter & Mehrad, 2009a).

El tipo celular predominante dentro de la fibrosis pulmonar es el fibroblasto. Los fibroblastos están implicados en los procesos de cicatrización, inflamación y la angiogénesis. Además, son capaces de producir y responder a una amplia gama de señales, paracrinas y autocrinas (Kendall & Feghali-Bostwick, 2014). Al activarse se ve incrementada su proliferación y su síntesis de TGF- β 1, citocina fibrogénica por excelencia, lo que a su vez promueve su diferenciación a miofibroblastos, siendo este último tipo celular el principal responsable de elevar el depósito de colágeno tipo I, que es parte de la MEC (Phan, 2002). Así mismo, los miofibroblastos son capaces de aumentar la producción de otras proteínas, como son: la α -AML y algunas proteínas de la MEC como, colágeno tipo I, II IV y V (Col I, II, III, IV y V) (Gabbiani, 2003).

Origen de los fibroblastos/miofibroblastos

El origen de los miofibroblastos es heterogéneo (Figura 2), ya que pueden derivarse de células mesenquimales locales, de células progenitoras de la médula ósea (fibrocitos) y del proceso de Transición Epitelio-Mesenquima (TEM), por mencionar algunos (Pardali et al., 2017).

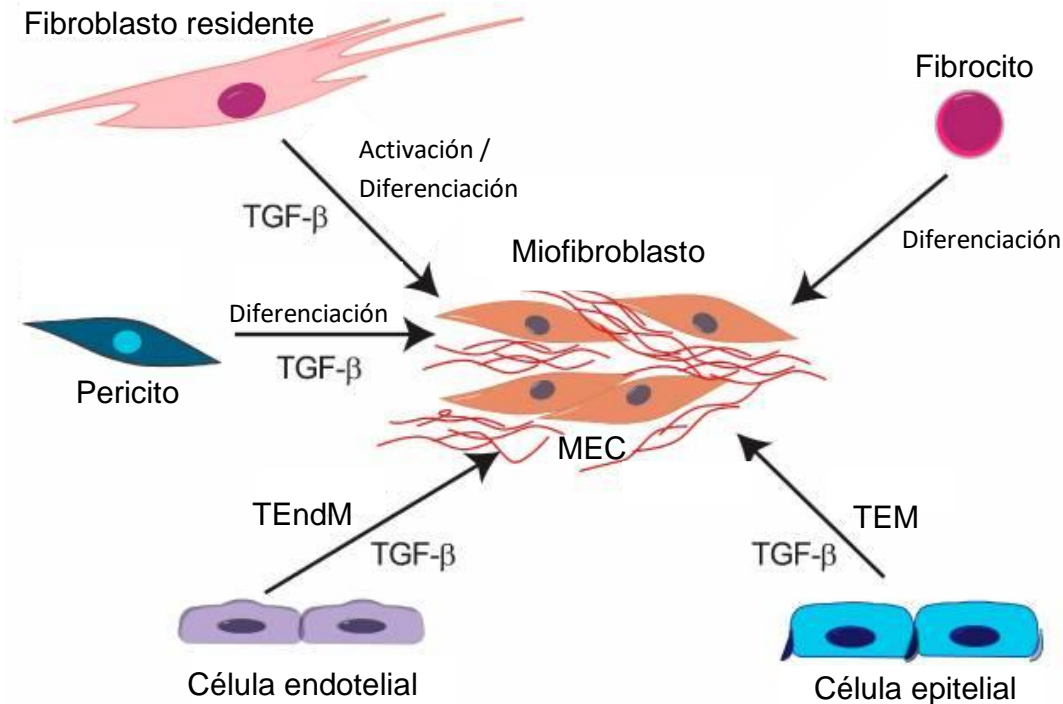


Figura 2. Origen múltiple de los miofibroblastos. La diferenciación a miofibroblasto no es exclusiva del fibroblasto residente, sino también de múltiples células que, a través de un estímulo, sufren una transición que ayuda a conferir un fenotipo tipo miofibroblasto (Pardali et al., 2017).

Otro proceso que participa en el desarrollo del patrón fibrótico es la TEM, el cual se considera como un proceso transitorio en donde las células epiteliales como las endoteliales, pierden la capacidad de secretar sus marcadores respectivos (citoqueratinas, E-cadherina, ZO-1 y AQP5) iniciando así la expresión de marcadores de una célula tipo miofibroblasto como la α -AML, vimentina y desmina principalmente (Pardali et al., 2017; Willis et al., 2005; Zeisberg et al., 2007). Resumiendo, el proceso de TEM, es un mecanismo asociado a la fibrosis pulmonar debido a su capacidad de promover la remodelación en la arquitectura tisular (Corvol et al., 2009; J. M. Lee et al., 2006).

En el contexto patológico, los mecanismos anteriormente descritos, convergen entre sí de tal manera que la integridad del tejido se ve comprometida, principalmente producto de una exposición continua y persistente a diferentes factores de riesgo que se han asociado al desarrollo de la FPI tales como: infecciones virales asociadas a la presencia del virus Epstein-Barr (EBV, del inglés Epstein Barr Virus), el citomegalovirus (CMV) y el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV, del inglés Kaposi Sarcoma Human Virus), tabaquismo, radiación, reflujo gastroesofágico, etc (Baumgartner et al., 1997, 2000; Heukels et al., 2019; Phan et al., 2021; Ryu et al., 2014; Wootton et al., 2011).

Enfermedades Pulmonares Intersticiales

Existe un grupo de enfermedades pulmonares denominadas como Enfermedades Pulmonares Parenquimatosas Difusas (EPPDs), también conocidas como Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas (EPIDs) (ATS/ERS”, 2002). Las EPIDs se caracterizan por ser un conjunto diverso de trastornos pulmonares, con características patológicas que se encuentran en varios niveles de inflamación y/o fibrosis (Adegunsoye & Ryerson, 2021; Oliveira et al., 2018).

El daño a la arquitectura pulmonar ocasionado en las EPIDs se localiza principalmente en el parénquima pulmonar (Kalchiem-Dekel et al., 2018). Dicha estructura está constituida por una superficie formada por sacos alveolares que permiten llevar a cabo el intercambio gaseoso de manera eficaz (Suki et al., 2011). El intersticio pulmonar, es el encargado de delimitar el espacio entre el endotelio y el epitelio de los pulmones, llegando a ser el tejido más comprometido en las EPIDs (Wollin et al., 2019). Además del intersticio, se pueden ver afectados los alvéolos, los bronquios y los bronquiolos (Kreuter et al., 2021).

Criterios para la clasificación de EPIDs

Los criterios de evaluación y diagnóstico para diferenciar entre los subtipos de EPIDs se han ido actualizando con el pasar de los años, permitiendo incorporar y/o modificar información crítica para la precisión de un diagnóstico diferencial (Guler & Corte, 2021). La diferenciación entre la FPI y otras EPIDs mejoró en la década de 1990, a partir del uso de tomografías computarizadas (TC) de tórax (Müller & Coiby, 1997).

Sin embargo, en el 2000 la declaración de consenso expedida por La Sociedad Torácica Americana y la Sociedad Respiratoria Europea (ATS/ERS, del inglés American Thoracic Society/European Respiratory Society) determinó las características descriptivas de la FPI y sus diferencias fisiopatológicas y morfológicas de otras EPIs ("ATS/ERS", 2000). A partir del año 2000 y hasta la actualidad, se han publicado diversas actualizaciones sobre su clasificación y métodos de diagnóstico. En el 2002, se anexaron nuevos criterios estandarizados internacionalmente, para la clasificación de las NII, proponiendo siete entidades clinicopatológicas. Además, se aclaró que, para establecer un diagnóstico con el menor porcentaje de variación, lo debe realizar un equipo multidisciplinario que cumpla estrictamente los criterios de evaluación clínica, radiológica y patológicos publicados ("ATS/ERS", 2002).

Dichos criterios de diagnóstico se mantuvieron hasta el 2013. En este año se estipuló la posibilidad de realizar un diagnóstico certero de la FPI, sin la necesidad de la toma de una biopsia pulmonar, siempre y cuando los estudios radiológicos demuestren el patrón de neumonía intersticial habitual (NIH). Se subraya que debido a las similitudes que existen entre las patologías fibrosantes del pulmón, en la actualidad continúa siendo complicado emitir un diagnóstico específico de la FPI. Por lo que adicionalmente, se ha recomendado tener bajo observación la progresión de la enfermedad durante determinados periodos de tiempo (Travis et al., 2013). Por otro lado, en el mismo 2013, se suma una nueva patología a este grupo de

EPIDs, denominada fibroelastosis pleuroparenquimatosa idiopática (Travis et al., 2013).

Para el 2018, es publicada una nueva versión de la Guía de práctica clínica de ATS/ERS/JRS/ALAT, la cual brinda un enfoque visual más detallado sobre los aspectos clínicos, patológicos y radiológicos que permiten ejercer una comparativa con mayor precisión entre los diferentes tipos y subtipos que existen de las EPIDs (Oliveira et al., 2018).

Concluyendo, actualmente se definen las NIIIs o EPIDs como un conjunto heterogéneo de patologías que dañan el parénquima pulmonar, ocasionando lesiones tisulares producidas por una amplia variedad de estímulos, las cuales pueden ser reparadas por diferentes rutas. La primera, la ruta inflamatoria, mediada por células del sistema inmunológico y la segunda, la ruta fibrosante, mediada por las CEA (Pardo & Selman, 2002; Selman et al., 2001). Se han reportado que las EPIDs que siguen una ruta inflamatoria tienden a ser reversibles, mientras que aquellas con un comportamiento fibrótico (FPI y NINE) no presentan esta cualidad de regeneración (Kreuter et al., 2021).

En el pasado, la hipótesis que se planteaba proponía a la inflamación como un proceso previo al estado fibrosante, afirmando que la inflamación crónica provocaba la cicatrización fibrótica, por lo que la EPID crónica y la FPI eran el resultado final a una respuesta inflamatoria crónica derivada de lesiones repetitivas en el epitelio alveolar (Keogh & Crystal, 1982). Sin embargo, dicha hipótesis fue descartada cuando disociaron a la inflamación como única vía posible desencadenante del desarrollo fibrótico. Adicionalmente, se aportaron evidencias donde separaron la ruta fibrótica de la inflamatoria, cuando al usar terapia antiinflamatoria no se observaron cambios significativos, en la reversión del proceso fibrosante de las patologías en estudio (Corvol et al., 2009b; Wells & Hogaboam, 2007).

Es importante resaltar la evolución sobre la comprensión de estas patologías pulmonares con base a evidencias clínicas y experimentales, sobre todo en el desarrollo patológico fibrosante idiopático del pulmón. Ya que como se mencionó,

inicialmente se pensaba que un proceso inflamatorio crónico derivaba en un patrón fibrótico en el tejido (Keogh & Crystal, 1982). Mientras que en la actualidad, ya se plantea que el patrón de neumonía intersticial habitual característico de la EPIDs fibrosantes y de la FPI, se debe a un proceso cicatrizante anormal mediado por una re-epitelización inadecuada y focos fibroblásticos (Selman et al., 2001; Strieter & Mehrad, 2009).

Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)

La FPI es una enfermedad pulmonar intersticial de comportamiento fibrosante crónico, progresivo y de etiología desconocida, que conduce al colapso alveolar debido a la pérdida de la arquitectura del alvéolo, reduciendo la capacidad respiratoria y finalmente promoviendo una falla orgánica, debido a la pérdida irreversible de la función pulmonar (Raghu et al., 2018; Redente et al., 2021).

La FPI es considerada la enfermedad pulmonar fibrótica más común entre las EPIDs, se ha asociado a los siguientes factores: género (principalmente en hombres), envejecimiento (50-70 años), tabaquismo, susceptibilidad genética y factores ambientales (Raghu et al., 2006, 2011). El tiempo medio de supervivencia posterior al diagnóstico es entre 2 a 4 años (Ley et al., 2011; Stainer et al., 2021). Además, el patrón fibrótico desarrollado en la FPI es provocado principalmente de un proceso anormal de cicatrización, mediado por las CEA (King et al., 2011).

Mecanismos moleculares para el desarrollo de la FPI

En el pulmón las CEA son descritas como aquellas células de mayor relevancia en el mantenimiento de la homeostasis pulmonar (Bissonnette et al., 2020). Las CEAI participan en el intercambio de gases y la regulación del líquido alveolar (Wong & Johnson, 2013), mientras que las CEAI tienen funciones secretoras y actúan como progenitoras epiteliales (Barkauskas et al., 2013; Vanderbilt et al., 2003).

Durante el proceso normal de cicatrización, las CEA llevan a cabo la re-epitelización, proceso derivado de una respuesta rápida y eficiente para restaurar la barrera epitelial. En dicho proceso, la migración, la proliferación y la diferenciación de las CEA se encuentra regulado. En la FPI, este mecanismo se vuelve ineficiente provocando un desequilibrio celular, al disminuir el porcentaje de las CEAI derivado del agotamiento regenerativo e hiperplasia de las CEAI (cuboidalización epitelial) y la alteración tanto de la expresión de moléculas de adhesión (E-cadherina y la β -catenina) como de los antígenos MHC de clase II (Kallenberg et al., 1987; Nisticò et al., 2012; Selman et al., 2001), ocasionando la pérdida de la arquitectura alveolar.

Bajo este contexto, se ha sugerido un modelo integral para el inicio, desarrollo y progresión de la FPI, en donde convergerían aquellos factores de riesgos asociados con el individuo, exposición, predisposición génica y envejecimiento, que conducirían a una activación anormal de las células epiteliales, liberando mediadores de varias vías responsables de la formación y activación de los focos fibroblásticos/miofibroblásticos y la activación de un patrón fibrótico (Pardo & Selman, 2021).

A nivel molecular, diferentes vías de señalización convergen entre sí con el fin de contribuir a la activación y mantenimiento de los miofibroblastos a consecuencia de una lesión crónica. Se han relacionado varias rutas de señalización como son: la vía del TGF- β 1, Wntless/Int (WNT) y, más recientemente, la vía YAP/TAZ (proteína asociada a yes (YAP)/coactivador transcripcional con señalización de motivo de unión a PDZ (TAZ)), las cuales interaccionan para mediar la respuesta fibrótica (Piersma et al., 2015).

Siendo el TGF- β 1 un mediador fisiológico importante en la fibrogénesis, no es considerado como la única molécula desencadenante para el desarrollo de la fibrosis pulmonar. Existen otras citocinas que juegan un rol profibrótico, por ejemplo, la sobreexpresión de IL-1 β que se ha visto involucrada en la pérdida de la arquitectura pulmonar debido a la disminución de las células epiteliales y alveolares (Strieter & Mehrad, 2009). Además del TGF- β 1, existen otros factores de crecimiento

que también son secretados por las CEA posterior a sufrir una lesión, el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés Epidermal Growth Factor), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés Vascular Endothelial Growth Factor), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, del inglés Fibroblast Growth Factor) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés Platelet Derived Growth Factor) funcionan como mediadores pro-fibroticos al inducir la formación de focos fibróticos conformados por fibroblastos y miofibroblastos (Huang et al., 2020; Sgalla et al., 2018).

Efectos del TGF- β 1 en la FPI

EL TGF- β 1 está ampliamente implicado en diferentes eventos profibrosantes dentro del desarrollo de la fibrosis pulmonar tales como: la proliferación y la migración de fibroblastos (Schreier et al., 1993), la promoción de la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos (Desmouliere et al., 1993), la inducción de la TEM en CEA a través de la activación de Smad2 (Kasai et al., 2005), la síntesis de proteínas de la MEC y la resistencia de los miofibroblastos a la apoptosis (Dees et al., 2021; Khalil & Greenberg, 1991; Pardali et al., 2010; Zhang & Phan, 1999). También se ve implicado en el incremento de colágena (I y III principalmente) y la modulación de la expresión de MMPs (MMP1-,2,3,7,8,9 y10) y de inhibidores de metaloproteasas de matriz (TIMPs, del inglés Tissue Inhibitor of Metallo-Proteinases) (TIMPs-1,2,3 y 4) (Ask et al., 2008; Kelly et al., 2003; McKeown et al., 2009; Rosas et al., 2008; Selman et al., 2000; Sokai et al., 2015).

Existen diferentes isoformas del TGF- β presentes en los mamíferos denominados TGF- β 1, 2 y 3, cada uno codificado por un gen diferente. El TGF- β 1 se encuentra predominante en los tejidos (Schiller et al., 2004) y es considerado como una proteína multifuncional secretado por una amplia variedad de tipos celulares como son: plaquetas, monocitos/macrófagos, células T, células epiteliales y fibroblastos (Ask et al., 2008; Biernacka et al., 2011; Dees et al., 2021; Györfi et al., 2018).

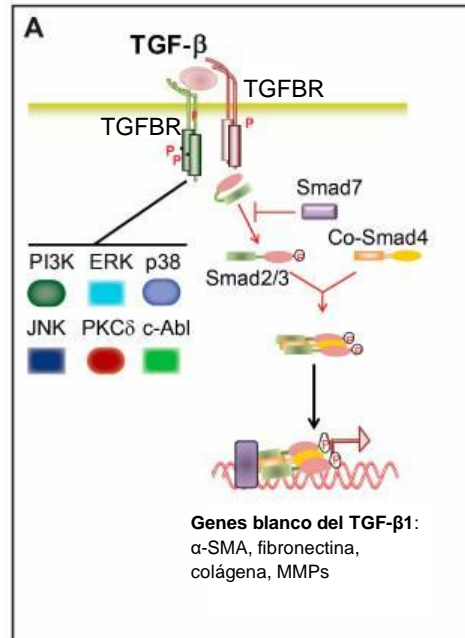


Figura 3. Señalización del factor de crecimiento transformante-β (TGF-β1). (A) El TGF-β1 interactúa con el receptor de TGF-β tipo 2 (TGFβR2), que a su vez recluta y activa (fosforila) al receptor ALK5 del receptor de TGF-β tipo I (TGFβ1). Fosforilando a Smad2/3 formando un complejo con Smad4 capaz de translocar al núcleo y desencadenar así la cascada de señalización para la síntesis de diferentes moléculas de interés, como: Fibronectina, colágena (I y III), MMPs, α-AML, entre otras.

La cascada canónica de señalización del TGF-β1 comienza con su interacción con el receptor TGFβR2 y posteriormente con el receptor TGFβR1, lo que induce su fosforilación y activación de la serina/treonina quinasas (Biernacka et al., 2011). Además, esta interacción es compartida con la isoforma TGF-β2, mientras que para la isoforma TGF-β3 la unión inicial se lleva a cabo con el receptor TGFβR3, que posteriormente reclutará y activará a los recetores TGFβR2 y TGFβR1 respectivamente (Hata & Chen, 2016; Hu et al., 2018).

Existen siete tipos de receptores tipo 1 en los mamíferos (ALK 1-7) denominados; cinasa similar a receptor de activina (ALK), la cinasa 5 similar al receptor de activina (ALK5) o también llamado TGFβR1 es el tipo más común entre las células epiteliales y mesenquimales ya que la señalización de TGF-β1 puede promover efectos pro-fibróticos (Artz et al., 2016; Muñoz-Félix et al., 2013; Rahimi & Leof, 2007). Posterior a

la unión del complejo ligando-receptor a ALK5/TGF β R2, esta cinasa fosforila a su sustrato Smad2/3, quien al activarse forma un complejo con Smad4, permitiéndole trasladarse al núcleo para ejercer su función activadora o represora de la transcripción (Pardali et al., 2017). La familia Smad, se subdivide en tres grupos; las Smads activadas por receptores (R-Smads, Smad1, 2, 3, 5 y 8), las Smad mediadoras comunes (Co-Smad, Smad4) y las Smads inhibitoras (I-Smads, Smad6 y 7), (Derynck & Budi, 2019; Pardali et al., 2017).

El TGF- β 1 induce la activación de los fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos, mediante el aumento en la producción de α -AML y a su vez, estos secretan su propio TGF- β 1 lo que genera una producción exacerbada y en bucle de componentes de la MEC (Dobaczewski et al., 2010; Gu et al., 2007; Hu et al., 2003). También regula la síntesis de componentes de la MEC tales como colágenas (Col I y III principalmente), fibronectina, elastina, etc (Tatler & Jenkins, 2012) y promueve la supervivencia de células mesenquimales/fibroblastos mediante la resistencia a la apoptosis, al inducir la síntesis de p38 dependiente de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (vía de señalización no canónica del TGF- β 1) e independiente de SMAD, que activa a la vía de señalización de fosfatidilinositol 3'-OH quinasa (PI3K) /AKT que se encarga de regular a los fibroblastos (Horowitz et al., 2004; Yu et al., 2002).

Así mismo, se ha descrito la participación del TGF- β 1 como activador principal de la cascada de Wnt/ β -catenina mediante la regulación positiva de β -catenina y GSK-3 β (Ye & Hu, 2021). Además, se ha reportado que en los fibroblastos, el TGF- β 1 induce la expresión de MMPs, como en el caso de las MMP-2,9, que inducen mediante la activación de la vía de señalización ERK1/2, como también de las integrinas (α V, especialmente α V β 3, α V β 5 y α V β 6) y en la supresión de moléculas anti-fibróticas como la prostaglandina E2 (PGE2) o algunos miRNAs como Let-7d, la familia miR-200 o miR-141, entre otros (Bauman et al., 2010; Bormann et al., 2022; Honda et al., 2010; Korpál et al., 2008; Minnis et al., 2015; Pandit et al., 2010; Ramírez et al., 2011; Saito et al., 2013; Scaffidi et al., 2004).

La inducción del proceso de TEM en las CEAs mediante el TGF- β 1 se puede activar por múltiples vías como son: la vía Smads, MAPK y PI3K (Cantley, 2002; Hagimoto et al., 2002; Horowitz et al., 2004; Xu et al., 2009). Durante este proceso se reprime la expresión de marcadores epiteliales, como la E-cadherina (B. Hu et al., 2003). También induce la apoptosis mediante la activación de la caspasa-3 y la regulación negativa de la expresión de p21 en las CEAll (Hagimoto et al., 2002; C. G. Lee et al., 2004), disminuyendo el número total de CEAll y generando el fenómeno de hiperplasia. Por lo tanto, el TGF- β 1 es un actor clave en los procesos fibróticos, actuando tanto sobre los fibroblastos como sobre las CEA.

Neumonitis por hipersensibilidad (NH)

La NH o también conocida como alveolitis alérgica extrínseca es una enfermedad pulmonar intersticial de etiología conocida, que se asocia a la exposición por inhalación a uno o varios antígenos en individuos susceptibles, quienes en desarrollarán una respuesta inmune exagerada (Hamblin et al., 2022; Selman et al., 2012). La NH es considerada tanto una enfermedad inflamatoria como fibrótica que afecta al espacio alveolar, bronquios y al intersticio (Raghu et al., 2020). Anteriormente, la NH se subdividía en tres estados clínicos; la NH aguda, subaguda y crónica. Sin embargo, actualmente de acuerdo con la ATS/JRS/ALAT del 2020, se clasifican en dos grupos: la NH fibrótica y la NH no fibrótica (Furusawa et al., 2020; Raghu et al., 2020; Selman et al., 2012).

Los pacientes con NH fibrótica son clínicamente similares a los de FPI, inclusive en el pronóstico de vida. Las evidencias sugieren que el desarrollo de NH fibrótica depende de ciertos factores como, por ejemplo; la susceptibilidad del paciente en respuesta a la exposición del antígeno, la intensidad y duración a la exposición de este, así como antecedentes familiares (Furusawa et al., 2020; Heukels et al., 2019; Rodríguez de Castro et al., 1993).

De manera general, la NH es considerada una patología causada por la exposición e inhalación a un antígeno incitador (AI), que no siempre es posible identificar. Tal es el caso de la enfermedad pulmonar del granjero (EPG) provocada por una variedad de antígenos que incluyen actinomicetos (***Saccharopolyspora rectivirgula***, ***Thermoactinomyces vulgaris***) y mohos (***Aspergillus***, ***Absidia***, ***Penicillium***, ***Wallemia***, ***Fusarium***) (Bellanger et al., 2019). En el caso del pulmón humidificador (PH) se atribuye a casos de NH asociada con al uso de humidificadores (Volpe et al., 1991) y el pulmón de criador de palomas, que se le atribuye a la inhalación de partículas pequeñas procedentes de heces, plumas y suero de aves pequeñas (palomas, periquitos, gallinas, canarios, loros, tórtolas, perdices y otras aves pequeñas), aunque también se ha presentado en individuos que interactúan con ropa y artículos fabricados con plumas (Morell et al., 2008; Selman et al., 2012).

Para que el AI produzca una respuesta en el organismo, debe entrar en contacto con las mucosas (respiratorias o gastrointestinales) o con la piel, siendo las células presentadoras de antígeno (CPAs) las encargadas de iniciar la respuesta inmune innata (Raghu et al., 2020; Vasakova et al., 2019).

Para que la NH adquiera el tipo fibrótico semejante a la FPI, la inhalación del AI debe de ser continua, generando una respuesta inmune crónica. Se ha propuesto que la neumonía intersticial habitual (NIH), que caracteriza a la FPI y a la NH fibrótica, esta mediada por la apoptosis de las CEA la cual permite la formación de focos fibrosantes, contribuyendo a la activación de fibroblastos y a la senescencia prematura (Jinta et al., 2010).

Diagnóstico diferencial entre la FPI y la NH fibrótica

El diagnóstico de las EPIDs requiere de un equipo médico multidisciplinario integral experto en enfermedades pulmonares intersticiales que usen diferentes parámetros, que les permitan interpretar un diagnóstico certero con base en análisis patológicos, de imagen y clínicos. No obstante, los resultados pueden confundirse con otras EPIDs (Kreuter et al., 2021; Sverzellati et al., 2015).

Los estudios que actualmente se realizan para un mejor diagnóstico son; tomografía computarizada de alta resolución (TCAR), pruebas de función pulmonar, pruebas serológicas, análisis de lavado bronquilo-alveolar (LBA) y de biopsia pulmonar. Sin embargo, dichos estudios son limitados para obtener un diagnóstico puntual y un tratamiento adecuado para mejorar el pronóstico de vida del paciente (Adegunsoye & Ryerson, 2021). En determinadas patologías, los resultados no logran ser concluyentes entre las diferentes EPIs. Esto sucede comúnmente en el diagnóstico entre la NH fibrótica y la FPI, lo que complica su diagnóstico, manejo y pronóstico de vida (Varone et al., 2020).

Para conseguir brindar un diagnóstico acertado de NH, de acuerdo con la guía clínica publicada en 2020 por la ATS/JRS/ALAT, primero se debe de descartar por medio de evidencia radiológica y/o histopatológica la presencia de fibrosis, cuando las manifestaciones clínicas sugieren un fenotipo NH no fibrótico, el comité

recomienda realizar un historial clínico para identificar exposiciones potenciales de antígenos. Además, se sugiere una prueba de IgG en suero contra todos los AI conocidos. Se recomienda la obtención de LBA para el análisis celular de linfocitos y muestras de biopsia pulmonar solo cuando las pruebas mencionadas, no hayan proporcionado un diagnóstico concluyente. Para pacientes con sospecha de un fenotipo NH fibrótico, se realiza una prueba de IgG antígeno específica, la obtención de LBA y la criobiopsia pulmonar transbronquial y biopsia pulmonar quirúrgica (Raghu et al., 2020).

Las características clínicas y de la TC son cruciales para el diagnóstico de NH ya que, a la fecha, no existen pruebas moleculares que discriminen entre ambas patologías. Por lo que la búsqueda de marcadores que permitan el diagnóstico diferencial y pronóstico de estas patologías continúa siendo motivo de estudio (Guiot et al., 2017).

Biomarcadores en la fibrosis pulmonar

Un biomarcador molecular es aquella sustancia cuantificable, con un rango de acción a nivel celular o menor (ejemplos; proteína, ácido ribonucleico (RNA)) y que participe en un mecanismo biológico de determinada patológica. Debe de cumplir con ciertas cualidades que ayude a diferenciar entre estadios normales a patológicos. Para diferenciar a la FPI de otras EPIDs, un buen biomarcador será, aquel que se pueda evaluar en muestras biológicas de fácil obtención. Además, de mostrar buena especificidad y reproducibilidad (Ley et al., 2014).

Actualmente, el diagnóstico de la FPI se basa en la identificación de un patrón de neumonía intersticial usual (NIU) en muestras histológicas y de imagen. Aunado a datos clínicos, sintomatología y pruebas de función pulmonar (Raghu et al., 2018). Anteriormente, el interés primordial era encontrar alguna biomolécula con niveles de expresión diferencial entre FPI y pacientes control. No obstante, actualmente el interés es contar con biomoléculas que además diferencien entre la FPI y otras EPIDs, debido a su difícil diagnóstico fuera de un centro de referencia y a la necesidad de un grupo multidisciplinario para realizarlo. Habitualmente, la búsqueda de biomarcadores se ha realizado en LBA y tejido pulmonar (Vasakova et al., 2017). Sin embargo, lo más recomendable es utilizar muestras menos invasivas como, sangre periférica, suero o plasma (Rosas et al., 2008).

Las moléculas que se han evaluado como posibles biomarcadores entre la FPI y las EPIDs, forman parte de vías de señalización implicadas en la fibrogenesis de la fibrosis pulmonar. En el caso de la FPI, se han medido moléculas que afectan procesos como la reparación de las CEA, la proliferación de fibroblastos y la remodelación de la MEC. Y para la NH fibrótica y no fibrótica se han buscado moléculas involucradas en la respuesta mediada por células inmunitarias, proliferación de fibroblastos y remodelación de la MEC, estas dos últimas compartidas con la FPI (Stainer et al., 2021).

En la literatura se reporta la búsqueda de biomarcadores vinculados a funciones fisiológicas de las CEA, particularmente las CEAI, debido al papel crucial de éstas

en la patogénesis de la FPI. Entre estas moléculas está el antígeno Krebs von den Lungen-6 (KL-6), la cual es una proteína membranal localizada en la superficie de las CEAll, que promueve la migración, proliferación y supervivencia de los fibroblastos (Hirasawa et al., 1997; Kobayashi & Kitamura, 1995).

Otras biomoléculas que se han considerado como posibles biomarcadores durante la fibrogénesis son las metaloproteinasas de matriz 1 y 7 (MMP-1 y MMP-7 respectivamente) (Rosas et al., 2008), la lisil oxidasa tipo 2 (LOXL2) y la periostina (Guiot et al., 2017). Se ha señalado la existencia de EPIDs con un comportamiento fibrótico independiente de la inflamación (Raghu et al., 2020), lo que sugiere la existencia de biomoléculas relacionadas con la fibrogénesis pulmonar, que no solo están presentes en la FPI, sino que pueden distinguirse de la fibrosis pulmonar no asociada a la inflamación (NH fibrótica). Finalmente, y en investigaciones más recientes, están los miRNAs los cuales pueden ser medidos en el suero/plasma de pacientes con alguna EPID y correlacionar sus niveles de expresión con las variables clínicas de los pacientes. Estos miRNAs se han propuesto como biomarcadores para diagnóstico y como posibles blancos terapéuticos en una amplia variedad de enfermedades intersticiales (Alipoor et al., 2016; P. Chen et al., 2022; Guz et al., 2014; Hennessey et al., 2012; Kim et al., 2020).

MicroRNAs

Cerca del 75% del genoma humano se transcribe en RNA no codificante (ncRNA), mientras que solo un 3% tiene la capacidad para codificar en proteína. Este ncRNA se clasifica de acuerdo a su longitud, forma y ubicación en: microRNAs (miRNAs), ncRNAs largos (lncRNAs), RNA circulares (circRNAs) y RNAs que interactúan con PIWI (piRNA), cada uno con diferentes funciones a nivel celular (Yan & Bu, 2021).

El primer miRNA descrito fue Lin-4, identificado en el nematodo ***C. elegans*** en 1993 (Lee et al., 1993), a pesar de ello, no fue sino hasta el 2000, con el descubrimiento de miRNA Let-7 en ***C. elegans***, que la investigación de estos RNA pequeños se intensificó. Y años más tarde, este miRNA fue catalogado como altamente conservado (Pasquinelli et al., 2000).

Los miRNAs son RNAs pequeños no codificantes de una sola hebra, con una longitud entre los 18 a 22 nucleótidos, que se encargan de regular de manera post-transcripcional a sus RNAs mensajeros (mRNA) blancos. Su mecanismo de acción se atribuye, a la unión entre el miRNA y la proteína Argonauta 2 (AGO2), lo que da como resultado la formación del Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (por sus siglas en inglés, RISC). Dicho complejo, se dirige a la región 3' no traducida (3'UTR) del mRNA interfiriendo así con la traducción (Gebert & MacRae, 2019; Long et al., 2018; Niaz, 2018). Si bien existe la posibilidad de que el sitio de unión entre un miRNA y su mRNA blanco ocurra en una región de marco de lectura abierta (ORF) o 5' UTR es significativamente menos efectiva y frecuente en comparación con la unión en la región 3' UTR (Lytle et al., 2007). Se dice que los miRNAs regulan negativamente, ya inhiben o degradan a su mRNA blanco (Cerón-Pisa et al., 2022; Marques & Gama-Carvalho, 2022).

miRNA Biogénesis, función y mecanismo de acción

La biogénesis de los miRNAs comienza en el núcleo, mediada por la RNA polimerasa II, sintetizando el transcrito primario del miRNA (pri-miRNA) a partir del gen del miRNA (Lee et al., 2004). Dependiendo de la región del núcleo donde se transcriba, será el tipo de RNA polimerasa que actuará en núcleo, RNA pol II; en nucleolo; RNA pol III (Etheridge et al., 2011). El pri-miRNA adopta la forma de una horquilla, con una longitud aproximada de 2000 pares de bases, madurando en dos fases; la primera en núcleo y la segunda en el citoplasma, proceso mediado por dos enzimas ribonucleasas (Lino Cardenas et al., 2013).

Durante la fase nuclear participa la enzima Drosha/DGCR8, formando un complejo capaz de escindir al pri-miRNA generando así al precursor del miRNA maduro (pre-microRNA) (Matsuyama & Suzuki, 2019). El pre-miRNA es dirigido fuera del núcleo por medio del complejo de poro nuclear exportina-5. Utilizando como fuente de energía a la molécula GTP y como cofactor a la proteína Ran (Yi et al., 2003).

La segunda fase de maduración se lleva a cabo a nivel del citoplasma, mediada por el complejo proteico formado por la enzima Dicer y dos proteínas de unión al RNA de doble cadena (dsRNA); la proteína activadora de PKR (PACT) y la proteína de unión a RNA de respuesta de transactivación (TRBP). En esta fase el pre-miRNA experimenta la eliminación del bucle en horquilla, liberando el miRNA maduro de doble cadena (estructura-dúplex) con una longitud de 21 a 24 nucleótidos. El miRNA de doble cadena se une a la proteína AGO2, para generar a RISC (Kishore et al., 2014). En este paso se retiene solo una de las dos cadenas del miRNA maduro, conocida como la cadena guía, mientras que la otra, cadena pasajera o miRNA* es degradada (Matsuyama & Suzuki, 2019).

La interacción del RISC y el mRNA blanco se da generalmente, sobre la región 3'UTR del mRNA blanco mediante complementariedad de bases, a través de la región de siembra que abarca entre 2 y 7 nucleótidos de longitud. Inhibiendo la traducción (Agarwal et al., 2015). Los miRNAs interactúan con una amplia variedad de mRNA blancos debido al amplio espectro de interacción entre su región de

siembra y el porcentaje que complementariedad con éste. Lo que contribuye a que un solo miRNA pueda regular varios mRNAs (Ambros, 2004).

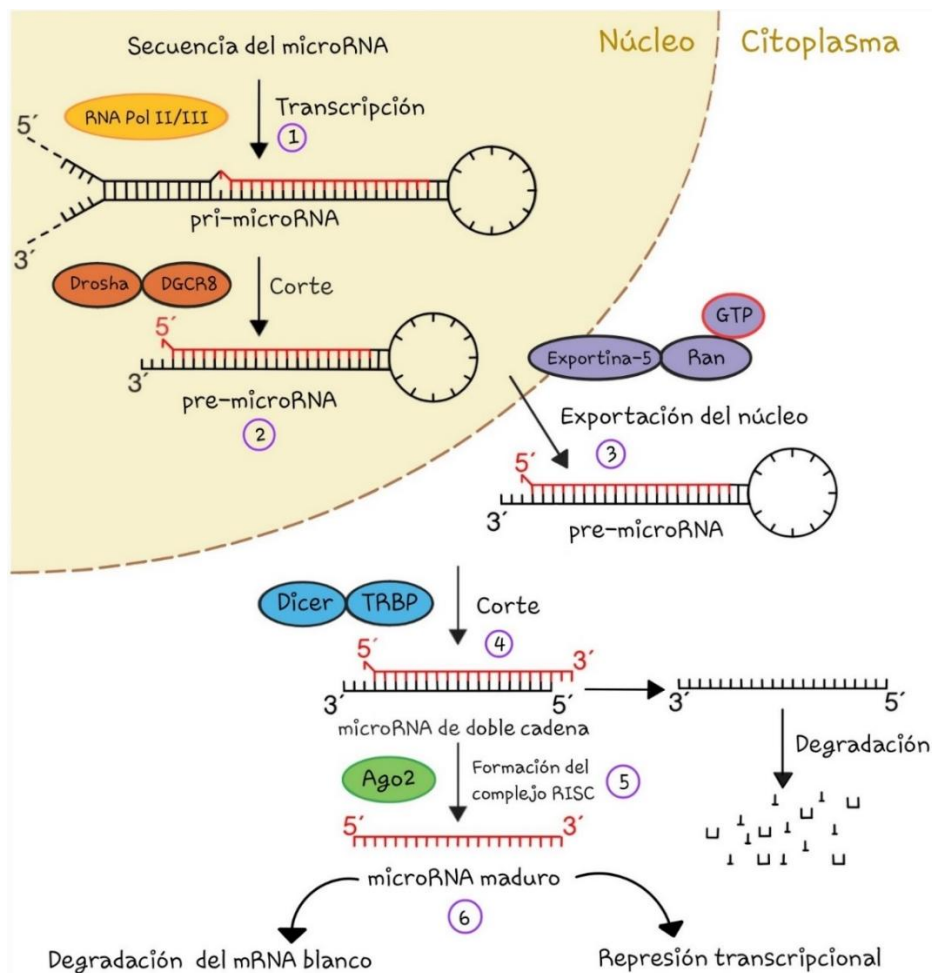


Figura 4. Biogénesis de los miRNAs. 1) Se transcribe el miRNA a partir del gen que lo codifica por medio de la RNA polimesara II/ III, este transcrito se denomina como pri-microRNA. 2) Este pri-microRNA es madurado por el complejo proteico formado por Droscha/DGCR8 produciendo un pre-microRNA. 3) Posteriormente, el pre-microRNA es dirigido fuera del núcleo por medio del complejo de poro nuclear exportina-5 al citoplasma, 4) el pre-microRNA es procesado mediante el complejo de Dicer/TRBP. 5) El miRNA maduro será dirigido a su mRNA blanco por medio del complejo RISC y AGO2. 6) Que resultara en la represión de la transcripción o de eliminación completa del mRNA (Winter et al., 2009).

En el contexto de la FPI, se han reportado miRNAs que poseen propiedades profibróticas y antifibróticas (Vettori et. al., 2012). Entre el grupo de los antifibróticos se encuentran let-7d, miR-26a/b (Pandit et al., 2010) y el miR-29 (Maurer et al.,

2010), los cuales son capaces de mitigar el desarrollo de la fibrosis pulmonar, y cuya expresión esta disminuida en la FPI. En contraparte aquellos con actividad profibrosante como son: el miR-155 (Pottier et al., 2009), el miR-21 (G. Liu et al., 2010) y el miR-23a (agrupados con -27a) (Cho et al., 2011), los cuales están sobre-expresados.

miRNAs circulantes o extracelulares

En la búsqueda de moléculas como potenciales biomarcadores, se han realizado investigaciones enfocadas en evaluar la presencia de miRNAs en distintos fluidos corporales. En la actualidad se ha logrado medir niveles de expresión de miRNAs en 12 fluidos corporales humanos distintos. Como la leche materna, calostro, saliva, líquido seminal, lágrimas y orina considerados de fácil obtención. Y aquellos obtenidos por métodos invasivos como el líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural y líquido peritoneal. Se ha logrado determinar que la presencia de miRNAs se ve afectada dependiendo del tipo de fluido utilizado, la condición preexistente del sujeto de donde fue extraído el fluido y a la función específica de cada miRNA, de acuerdo con su propiedad constitutiva o dependiente de la patología en estudio (Weber et al., 2010).

Los miRNAs de manera extracelular, son estables y su abundancia esta intrínsecamente relacionada con la condición del individuo de donde se obtuvieron (Kumar et al., 2017). En la actualidad se pueden encontrar miRNAs extracelularmente en diferentes condiciones; (1) encapsulados en microvesículas o (2) secretados de manera libre asociados a complejos proteicos que les confieren estabilidad (Figura 5) (Jung & Suh, 2014).

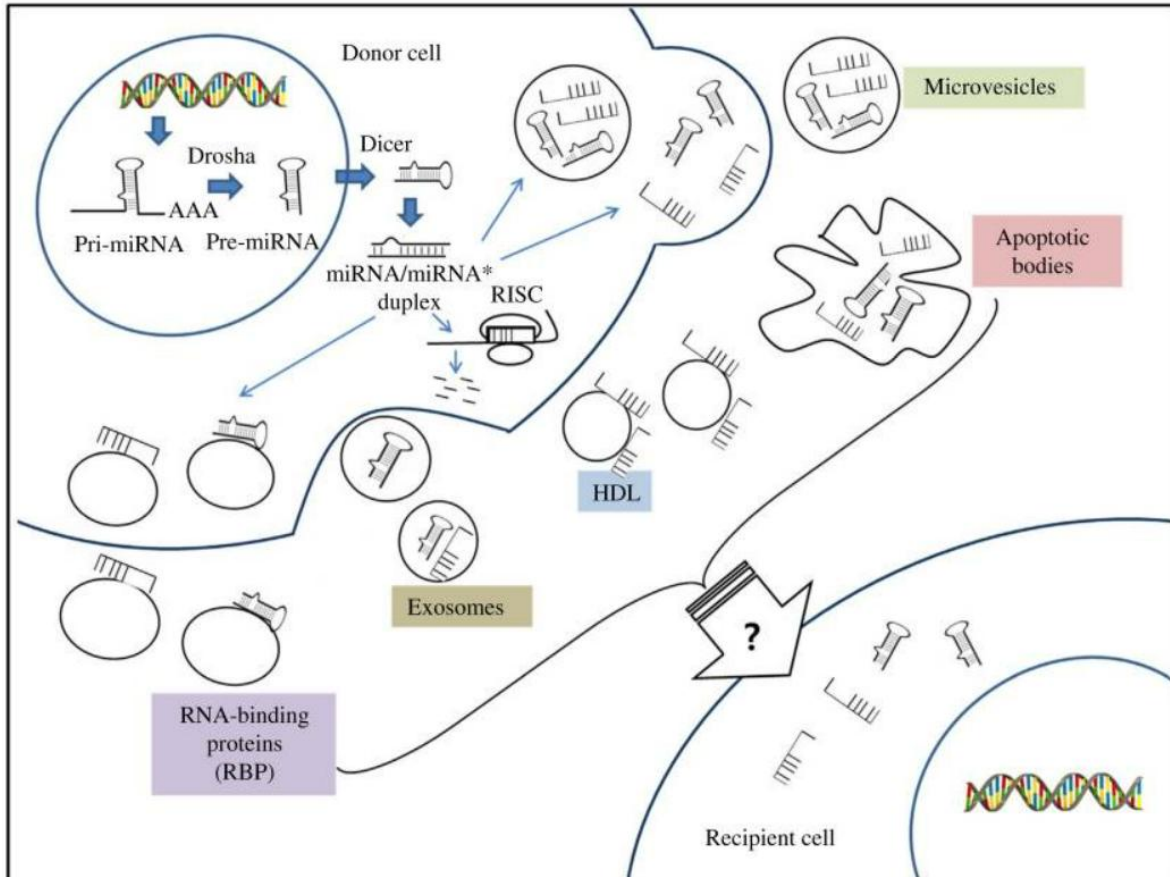


Figura 5. miRNAs extracelulares. Se sugiere el mecanismo mediante el cual los miRNAs se encuentran de manera extracelular (Exosomas y microvesículas) como también asociándose a complejos de proteínas de unión a RNA (RBP) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Jung & Suh, 2014).

miRNAs implicados en la fibrosis pulmonar

El perfil de expresión de los miRNAs se ha vinculado a procesos relacionados con el desarrollo de la fibrogénesis a nivel pulmonar, ya sea en el contexto fibrótico, inflamatorio o en ambos. Hasta el momento, se han identificado miRNAs en una variedad de fluidos como lo son: sangre/suero, LBA y esputo (Pattarayan et al., 2018; Zhang et al., 2021).

Se ha reportado la participación de diversos miRNAs en la fibrogénesis y la progresión de la FPI y otras EPIDs. El miR-21 está sobre-expresado y en muestras de suero, en tejido de pacientes con FPI y en modelos murinos. Además, se atribuye que sus niveles de expresión están estrechamente ligados con el aumento de la actividad del TGF- β 1 mediante el bloqueo de SMAD7, molécula inhibitoria en la vía de señalización. Lo que sugiere que el aumento en la expresión de miR-21 funciona como un potencial activador fibrótico (Dirol et al., 2022; Liu et al., 2010; Oak et al., 2011).

El miR-155 también se encuentra incrementado en la FPI, se ha analizado su actividad *in vitro* en fibroblastos pulmonares humanos como también en fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en modelos murinos. El miR-155 induce la síntesis de colágeno tipo 1 y 3 (Kurowska-Stolarska et al., 2017; P. Li et al., 2013). La sobre expresión de miR-155 es inducida por citocinas inflamatorias como lo son; IL-1 β y TNF- α en fibroblastos pulmonares. Y regular negativamente el mRNA del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF, del inglés Keratinocyte Growth Factor), proteína involucrada en la reparación de lesiones (Pottier et al., 2009).

El miR-210 también se encuentra sobre-expresado en FPI, el cual se ha relacionado con el aumento en la proliferación celular ya que su mRNA diana es el inhibidor de c-myc MNT (Zhang et al., 2009). Por lo que se ha reportado que la eliminación de miR-210 aumenta los niveles de MNT inhibiendo la proliferación de fibroblastos (Bodempudi et al., 2014). Durante la proliferación de fibroblastos, aumenta la síntesis de colágeno tipo I dentro del espacio alveolar, creando un remodelamiento del tejido alveolar y un ambiente hipóxico (Bodempudi et al., 2014; Selman et al.,

2001). La hipoxia estimula la proliferación de algunos tipos celulares utilizando los factores de transcripción inducibles por hipoxia 1 y 2 alfa (HIF-1 α y HIF-2 α), lo que a su vez promueve una sobreexpresión de miR-210.

En contraste, se han identificado miRNAs regulados negativamente. La disminución del miR-26a en el tejido pulmonar de ratones y humanos se asocia con una sub-expresión de Col I y Col III, inducida por TGF- β 1, además inhibe el papel restrictivo que tiene sobre el CTGF, el cual promueve la diferenciación a miofibroblastos (Liang et al., 2014). En cuanto al miR-18a-5p, también se ha reportado sub-expresión en la FPI, su blanco es el receptor TGF β R2, lo que le permite asociarse a la vía profibrotica del TGF- β 1 (Zhang et al., 2017).

Tres miembros de la familia miR-200 (miR-200a, miR-200b y miR-200c) también se han asociado con la fibrosis, debido a su regulación significativamente disminuida en modelos murinos de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y en pacientes con FPI. Además, se ha sugerido su participación en la regulación de la TEM inducida por el TGF- β 1 en las CEA, ya que su sobreexpresión disminuye la expresión de marcadores mesenquimales en las CEA (Yang et al., 2012). Let-7d también se encuentra reducido en pacientes con FPI y que su inhibición está relacionada directamente con el TGF- β 1 y con la producción de marcadores mesenquimales (Pandit et al., 2010).

Adicionalmente, los niveles de expresión sub-expresados de Let-7d que se han detectado en suero, plasma y tejido pulmonar le confieren cualidades antifibróticas, debido a que su inhibición favorece a la TEM en la CEA y eventualmente promueve un incremento en los niveles de colágeno (Huleihel et al., 2014; Min et al., 2016; Pandit et al., 2010).

Let-7

La familia de miRNA Let-7 se encuentra ampliamente conservada en un gran número de especies. Su participación está involucrada en varios procesos celulares, tales como: regulación de genes, proliferación, apoptosis, diferenciación y división celular, regulación en la formación de músculo, entre otros (Pasquinelli et al., 2000; X. Wang et al., 2012).

Es común que, en organismos complejos, los miembros de la familia Let-7 tengan más de una copia de su propia secuencia dentro del genoma. Es importante poder distinguir entre las isoformas de la familia Let-7. El sistema de nomenclatura se basa en asignar una letra como sufijo, que hace referencia a la isoforma, mientras que el número se refiere al loci genómico. El ser humano tiene 13 loci distintos que codifican para nueve miRNA de la familia Let-7 (Lee et al., 2016).

En humanos, se han descrito 2 miRNAs de la familia de Let-7 (Let-7a-1, 7a-2, 7a-3, 7b, 7c, 7d, 7e, 7f-1, 7f-2, 7g, 7i, y mir-98). Tres de estas secuencias precursoras, producirán la secuencia madura de Let-7a (Let-7a-1, let-7a-2 y let-7a-3) localizadas en el cromosoma 9, 11 y 22 respectivamente. En el caso para Let-7f, tiene dos secuencias precursoras (Let-7f-1 y Let-7f-2) localizadas en el cromosoma 9 y X respectivamente, mientras que en el caso de los miembros Let-7b; Let-7c; Let-7d; Let-7e, solo existe una copia y se localizan en el cromosoma 22, 21, 9 y 19 respectivamente (Matsuura et al., 2018; Roush & Slack, 2008).

Let-7d fue el primer miRNA relacionado con la FPI (Pandit et al., 2010). Los miRNAs pertenecientes a la familia Let-7 tienen como blanco al Grupo A2 de alta movilidad (HMGA2) (Mayr et al., 2007). El HMGA2 es un regulador de la TEM y se expresa específicamente en las CEAs de pacientes con FPI. HMGA2 facilita la transcripción de SNAI1 y TWIST, factores de transcripción clave que promueven la TEM (Thuault et al., 2006).

Let-7a

Se ha reportado la participación de Let-7a en la TEM y en la síntesis de moléculas profibroticas, entre otros procesos asociados con el desarrollo de la fibrosis pulmonar (Kumar et al., 2011; Pandit et al., 2011). Sin embargo, es en tejido hepático donde se ha reportado su principal papel como fibrogénico, asociando su inhibición a una sobreexpresión de marcadores mesenquimales tales como; α -AML, Col I y Col IV, lo que sugiere su participación en la TEM y su posible papel en la vía de señalización TGF- β 1/Smad (Zhang et al., 2019).

En el pulmón, se ha sugerido que Let-7a inhibe la síntesis de la interleucina-6 (IL-6) y que en condiciones normales disminuye el proceso de inflamación. Al inhibir la expresión de la IL-6, la respuesta inflamatoria no continua e impide una respuesta inmunitaria adecuada tras la exposición de un AI. EL mecanismo sugerido para describir la inhibición de Let-7a, es mediante la activación de Lin-28B en la vía de señalización Wnt/ β -catenina (Henderson et al., 2010; Iliopoulos et al., 2009). La vía Wnt/ β -catenina se encuentra activa de manera normal durante el desarrollo y se ha asociado su reactivación en tejidos adultos posterior a sufrir una lesión y en la progresión de un fenotipo fibrótico (Henderson et al., 2010).

Let-7d

Let-7d es un miRNA expresado en la etapa adulta, por las CEA y, en condiciones fisiológicas normales se encuentra sobre-expresado en el tejido pulmonar. Sin embargo, se encuentra disminuido en pacientes con FPI en comparación con pacientes sanos. La unión de Smad3 a la región promotora de Let-7d inhibe su expresión y promueve un aumento de HMGA2 y de la TEM incrementando los niveles de expresión de algunos represores transcripcionales de la E-caderina (Zed-1, Zeb-2, TWIST, Snail y Slud) (McConkey et al., 2009; Pandit et al., 2010). A su vez, aumenta la síntesis de marcadores mesenquimales (N-cadherina-2, vimentina y α -actina de músculo liso (α -AML) promoviendo la acumulación de componentes de la MEC derivado de los fibroblastos procedentes de la TEM (Selman & Pardo, 2006; Thuault et al., 2006). Le-7d es un miRNA ampliamente estudiado en la FPI con

reportes tanto en suero/plasma como en células provenientes de tejido pulmonar (Lacedonia et al., 2021; Liang et al., 2016).

Objetivo general

Evaluar los niveles de expresión de los miRNAs Let-7a y Let-7d en pacientes con neumonitis por hipersensibilidad (NH) y compararlos con los niveles de expresión en sujetos con fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

Objetivos particulares

- Estandarizar la extracción del RNA total del LBA.
- Estandarizar la medición de la expresión de Let-7a y Let-7d en LBA.
- Medir los niveles de expresión de los miRNAs Let-7a y Let-7d en el suero de pacientes con NH y FPI.
- Comparar y analizar la expresión de Let-7a y Let-7d en muestras de LBA versus suero.
- Analizar si los miRNAs evaluados podrían utilizarse como biomarcadores diferenciales entre la FPI y la NH.

Justificación

Frecuentemente los pacientes con NH crónica desarrollan fibrosis pulmonar progresiva y en formas avanzadas de la enfermedad puede confundirse con fibrosis pulmonar idiopática o con neumonía intersticial no específica. Por lo tanto, el determinar si los miRNA Let-7a y Let-7d, pueden contribuir a diferenciar la NH de la FPI, aportará nueva información sobre los mecanismos patogénicos de ambas patologías y eventualmente a realizar un mejor diagnóstico, pronóstico y la generación de posibles blancos terapéuticos para cada enfermedad. Adicionalmente, hasta la fecha no existen reporte sobre los niveles de expresión de los miRNAs mencionados en la NH.

Hipótesis

Habrà una diferencia de expresión en los niveles de los microRNAs Let-7a y Let-7d entre la FPI vs la NH y en comparación con el grupo control en LBA como en muestras de suero.

Materiales y Métodos

Criterios de inclusión y exclusión

Las muestras de suero y lavados bronquiolo-alveolar remanentes (protocolo B3112) que se utilizaron para esta tesis, fueron de pacientes diagnosticados con neumonitis por hipersensibilidad y fibrosis pulmonar idiopática de acuerdo con los criterios de la guía de diagnóstico de la ATS/ERS/JRS/ALAT.

Para pacientes

Los criterios de inclusión

- 1) Pacientes del INER con diagnóstico documentado de fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad crónica según las guías de la ATS/ERS/JRS/ALAT.
- 2) Hombres o mujeres de 50 años o mayores.
- 3) Cuenten con pruebas de función respiratoria al momento del diagnóstico

Los criterios de exclusión

- 1) Cualquier signo de enfermedad aguda (exacerbación aguda) en los 30 días anteriores a la visita 1.
- 2) Diagnóstico conocido de otros trastornos respiratorios importantes (tuberculosis, sarcoidosis, aspergilosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica)
- 3) Incapacidad de efectuar pruebas respiratorias

Para los sujetos control (sanos)

Los criterios de inclusión

- 1) Hombres o mujeres mayores de 30 años.
- 2) Que hayan firmado consentimiento informado
- 3) Que no se conozcan portadores de enfermedad pulmonar

Los criterios de exclusión

- 1) Cualquier signo de enfermedad aguda respiratoria en los 30 días anteriores a la visita 1.
- 2) Diagnóstico conocido de otros trastornos respiratorios importantes (tuberculosis, sarcoidosis, aspergilosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica).
- 3) Patrón obstructivo o sugerente de restricción pulmonar posterior a la espirometría.

Población de estudio

Muestras de suero y LBA remanentes de pacientes diagnosticados con neumonitis por hipersensibilidad y fibrosis pulmonar idiopática, así como suero y LBA control. Todas las muestras son sueros y LBA remanentes que fueron obtenidos como parte de otro protocolo registrado en el laboratorio (B3112). El protocolo actual aprobado por los comités de investigación, de ética y de bioseguridad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias para el uso de los remanentes de suero y LBA es el B26-22.

Muestras de LBA		
Control	NH	FPI
8	10	8
Muestras de Suero		
Control	NH	FPI
16	24	19

Extracción de RNA total del lavado bronquiolo-alveolar (LBA)

La extracción del RNA total de LBA se realizó comparando 3 métodos diferentes; TRIzol™ (Gibco), columna con QIAzol (Qiagen) y por columna miRNeasy Serum/Plasma Advanced (Qiagen). Cada uno de los métodos se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con ligeras modificaciones para optimizar la pureza y rendimiento de cada método. La concentración total del RNA se midió por espectrofotometría (nanodrop). El RNA total de muestras de suero, se realizó mediante una técnica, previamente estandarizada, a base de columnas miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen).

Extracción por Trizol

Se usó el reactivo TRIzol™ LS Invitrogen (Thermo-Fisher scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, a cada 250 µL de LBA se añadieron 750 µL de reactivo TRIzol más 0.5×10^{10} de copias del miRNA del nematodo ***Caenorhabditis elegans*** (cel_miR-39) como control de la extracción. La muestra se homogenizó usando vórtex durante 5 seg e incubando a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se añadieron 200 µL de cloroformo, mezclando por vórtex y dejando incubar entre 2-3 min a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 10 000 rpm a 4°C por 15 min. Al finalizar, la fase acuosa que contiene al RNA, se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 mL, en donde se añadieron 500 µL de isopropanol y 2 µL de glucógeno (como acarreador de RNA), se mezcló por vórtex y se dejó incubar durante 10 min. Al concluir, se centrifugó a 10 000 rpm a 4°C durante 10min. Se descartó el sobrenadante por decantación y se lavó el botón de RNA total agregando 1000 µL de etanol al 75%, mezclando brevemente mediante vórtex y centrifugando a 7 500 rpm a 4°C durante 5 min. El sobrenadante se descartó para permitir el secado parcial del botón de RNA, el cual se resuspendido adicionando 20 µL de agua libre de nucleasas. La concentración de RNA total se cuantificó utilizando el equipo NanoDrop a una longitud de onda (λ) de 260 nm. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Extracción por columna (Qiagen)

Se utilizó el kit miRNeasy Serum/Plasma de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se utilizaron 500 µL de LBA a los que se añadió 1 000 µL de reactivo de lisis QIAzol, la solución se homogenizó utilizando vórtex e incubando a temperatura ambiente durante 5 min. Al termino, se agregaron 0.5×10^{10} de copias de *Caenorhabditis elegans* (cel_miR-39) como control de la extracción. Se adicionaron 200 µL de cloroformo, homogenizando por vórtex e incubando por 3 min a temperatura ambiente. Para separar la fase acuosa de la mezcla, se centrifugo a 12 500 rpm a 4°C durante 15 min. Todos los pasos siguientes se realizaron a temperatura ambiente. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo, a la cual se le adicionaron 800 µL de etanol al 100% y homogenizando por vórtex. De esta mezcla, se transfirieron 700 µL a la columna RNeasy MinElute spin y se centrifugó a 10 500 rpm durante 15 seg, eliminando el eluído. Este paso se repite hasta terminar con el total de la mezcla. Se agregaron a la columna 700 µL del buffer de lavado RWT y se centrifugó a 10 500 rpm durante 15 seg. Al termino, se descartó el eluído para luego adicionar 500 µL del buffer RPE, centrifugando a 10 500 rpm durante 15 seg y descartando nuevamente el eluído. Finalmente, la columna fue lavada adicionando 500 µL de estanol al 80% y centrifugando a 10 500 rpm durante 2 min y por último, con la tapa abierta de la columna, centrifugar a 12 500 rpm durante 5 min. Se cambió el tubo de recolección y el RNA es eluído de la columna agregando 14 µL de agua libre de nucleasas. Se dejó incubar por un minuto y posteriormente se centrifugó a 12 500 rpm durante un minuto. Este último paso se repite por lo que el volumen final obtenido de RNA purificado fue de 28 µL el cual se almacenó a -80°C hasta su uso.

Extracción por columna sin fenol (Qiagen).

El RNA total se purificó usando el miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente. Se utilizaron 200 μL de LBA al que se le añadieron 60 μL del buffer RPL, esto se mezcló por vórtex por 5 seg e incubando durante 3 min. Posteriormente, se agregaron 1.6×10^8 copias de *Caenorhabditis elegans* (cel_miR-39) como control de la extracción. Enseguida se añadieron 20 μL del buffer RPP, homogenizando por vórtex durante 20 seg e incubando por 3 minutos y al termino, se centrifugó a 10 000 rpm durante 3 min. El sobrenadante se trasfirió a un nuevo tubo, añadiendo un volumen 1:1 de isopropanol. La mezcla se homogenizó por vórtex y se transfirió a una columna RNasy MinElute, la cual se centrifugó por 8 000 rpm durante 15 seg. Al termino, se retiró la columna para descartar el eluído. Se adicionaron 700 μL del buffer RWT a la columna y se centrifugó a 8 000 rpm durante 15 seg, posteriormente se eliminó el eluído. Se agregaron 500 μL de etanol al 80% en la columna y se centrifugó a 10 000 rpm durante 2 min. Se cambió el tubo de recolección y se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min con la tapa abierta. Para eluir el RNA total de la columna, se cambió el tubo de recolección y se adicionaron 20 μL de agua libre de nucleasas, incubando un minuto y posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm durante 1 min con la tapa cerrada. Este paso se repitió una vez más. Obteniendo un volumen final de 36 μL de RNA total el cual se almacenó a -80°C hasta su uso.

Cuantificación de RNA total

La concentración de las muestras de RNA purificado, fue obtenida por un espectrofotómetro NanoDrop a 260nm como longitud de onda.

Síntesis del DNA complementario por transcripción reversa (RT)

El RNA se transcribió de forma inversa a DNA complementario (cDNA) con tres kits diferentes. Dos de ellos, para ser utilizado en el sistema de SYBR Green y el tercero, para ser utilizado con el sistema de Sonda TaqMan. Los kits de RT para el sistema de SYBR Green fueron, miScript II RT Kit y miRCURY LNA RT Kit de Qiagen. Y para el de Sonda TaqMan, el kit TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription de Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific).

Transcripción Reversa con miScript II RT (SYBR Green)

El kit miScript II RT incluye los siguientes componentes: miScript Reverse Transcriptase Mix, 10x miScript Nucleics Mix, 5x miScript HiSpec Buffer y 5x miScript HiFlex Buffer. La RT se hizo siguiendo el protocolo del fabricante, con ligeras modificaciones. Las condiciones volumétricas para cada componente se especifican en la Tabla 1.

Tabla 1. Componentes para la RT siguiendo la química de SYBR Green.

Componente	Volumen
5x miScript HiSpec Buffer o 5x miScript HiFlex Buffer	4 µL
10x miScript Nucleics Mix	2 µL
miScript Reverse Transcriptase	2 µL
Agua libre de RNAsas	Variable
RNA total	Variable
Volumen final de reacción	20 µL

Las condiciones de temperatura para programar el termociclador en la RT se especifican en la Tabla 2.

Tabla 2. Ciclos de temperatura para la RT siguiendo la química de SYBR Green.

Paso	Tiempo	Temperatura
RT	60 min	37°C
Inactivación de la reacción	5 min	37°C
Almacenaje	∞	4°C (hielo)

Transcripción Reversa con miRCURY LNA RT (SYBR Green)

Este kit es complementario al kit de extracción de RNA total miRNeasy Serum/Plasma Advanced. El kit miRCURY LNA RT, incluye los siguientes componentes; 5x miRCURY SYBR Green RT Reaction Buffer, RNase-free wáter, 10x miRCURY RT Enzyme Mix, UniSpo RNA spike-in (opcional). La RT se realizó siguiendo el protocolo del fabricante con ligeras modificaciones. Las condiciones volumétricas para cada componente se especifican en la Tabla 3.

Tabla 3. Componentes para la RT siguiendo la química de SYBR Green usando el kit miRCURY LNA RT.

Componente	Volumen
5x miRCURY SYBR Green RT Reaction Buffer	2 µL
10x miRCURY RT Enzyme Mix	1 µL
Agua libre de RNAsas	Variable
RNA total	Variable
Volumen final de reacción	10 µL

Las condiciones de temperatura para programar el termociclador en la RT se especifican en la Tabla 4.

Tabla 4. Ciclos de temperatura para la RT siguiendo la química de SYBR Green usando el kit miRCURY LNA RT.

Paso	Tiempo	Temperatura
RT	60 min	42°C
Inactivación de la reacción	5 min	95°C
Almacenaje	∞	4°C (hielo)

Transcripción Reversa con kit TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription (Sonda TaqMan)

El kit TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific), incluye los siguientes componentes; 10X RT buffer, dNTP mix w/dTTp, RNase inhibitor y MultiScribe™ RT enzyme. La RT se realizó siguiendo el protocolo del fabricante, realizando ligeras modificaciones. Las condiciones volumétricas para cada componente se especifican en la Tabla 5.

Tabla 5. Componentes para la RT siguiendo la química de Sonda TaqMan.

Componente	Volumen
dNTP mix	0.5 µL
deMultiScribe RT enzyme	1 µL
10x RT buffer	1.5 µL
RNase inhibitor	0.19 µL
Agua libre de RNAsas	2.81 µL
RNA total	Variable
Oligo	Variable
Volumen final de reacción	15 µL

En este método, se realizó una previa incubación entre el RNA total y el oligo de interés.

Las condiciones de temperatura para la pre-incubación fueron las siguientes se especifican en la Tabla 6.

Tabla 6. Ciclos de temperatura para la pre-incubación de los miRNAs.

<i>Paso</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
	5 min	85°C
	5 min	60°C
<i>Almacenaje</i>	∞	4°C (hielo)

Al término de la pre-incubación, se agregó el volumen correspondiente a los componentes para la RT.

Las condiciones de temperatura para programar el termociclador en la RT para Sonda TaqMan se especifican en la Tabla 7.

Tabla 7. Ciclos de temperatura para la RT siguiendo la química de Sonda TaqMan.

<i>Paso</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
	60 min	16°C
	30 min	42°C
<i>Inactivación de la reacción</i>	5 min	85°C
<i>Almacenaje</i>	∞	4°C (hielo)

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

El cDNA se amplificó a partir de tres diferentes Kits Master Mix para qPCR. El Kit miScript SYBR Green PCR y el kit miRCURY LN SYBR Green PCR para la química de SYBR Green ambos de QIAGEN y el Kit TaqMan Gene Expression Master Mix de Applied Biosystems. Siguiendo las siguientes condiciones y sus respectivas modificaciones.

Kit miScript SYBR Green PCR

El protocolo para el método de detección por SYBR Green utilizando el kit miScript SYBR Green PCR se describe en la Tabla 8. Brevemente, está constituido por 5 μ L de 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 1 μ L 10x miScript Universal Primer, 1 μ L 10x miScript Primer Assay (primer de interés hsa-let-7^a-5p / hsa-let.7d-5p) (Tabla 8).

Tabla 8. Componentes para la detección de miRNAs por medio del kit miScript SYBR Green PCR.

Componente	Volumen
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	5 μ L
10x miScript Universal Primer	1 μ L
10x miScript Primer Assay	1 μ L
Agua libre de RNAsas	Variable
cDNA	Variable
Volumen final de reacción	10 μ L

Las condiciones del termociclado para el equipo QuantStudio 12K Flex, durante la PCR en tiempo real se describen en la Tabla 9. Brevemente, el cDNA se sometió a una temperatura inicial de 95 °C durante 15 min; 40 ciclos a 94°C durante 15 s y 55°C durante 30 s; y luego 70°C durante 30 segundos.

Tabla 9. Programación del equipo QuantStudio 12K Flex, para la qPCR utilizando el del kit miScript SYBR Green PCR.

Paso	Tiempo	Temperatura
Activación inicial	15 min	95°C
Desnaturalización	15 s	94°C
Alineación	30 s	55°C
Elongación	30 s	70°C
No de ciclos	40 ciclos	

kit miRCURY LN SYBR Green PCR

El protocolo para el método de detección por SYBR Green utilizando el kit miRCURY LN SYBR Green PCR se describe en la Tabla 10. Brevemente, está constituido por 5 µL de 2x miRCURY SYBR Green PCR Master Mix, 0.05 µL ROX Reference Dye, 1 µL del primer (hsa-let-7^a-5p / hsa-let.7d-5p (Primer Assay)) y 0.95 µL de agua libre de nucleasas (Tabla 10).

Tabla 10. Componentes para la detección de miRNAs por medio del kit miRCURY LN SYBR Green PCR.

Componente	Volumen
2x miRCURY SYBR Green Master Mix	5 µL
ROX Reference Dye	0.05 µL
Primer Assay	1 µL
Agua libre de RNAsas	Variable
cDNA	Variable
Volumen final de reacción	10 µL

Las condiciones del termociclado para el equipo QuantStudio 12K Flex, se describen en la Tabla 11. Brevemente, el cDNA se sometió a una temperatura inicial de 95 °C durante 2 min; 40 ciclos a 95°C durante 10 s y 56°C durante 60s(Tabla 11).

Tabla 11. Programación del equipo QuantStudio 12K Flex, para la qPCR utilizando el kit miRCURY LN SYBR Green PCR.

Paso	Tiempo	Temperatura
Activación inicial	2 min	95°C
Desnaturalización	10 s	95/°C
Alineación / Elongación	60 s	56°C
No de ciclos	40 ciclos	

kit TaqMan Gene Expression Master Mix

El protocolo para el método de detección por Sonda TaqMan utilizando el kit TaqMan Gene Expression Master Mix se describe en la Tabla 12. Brevemente, está constituido por 5 µL de 2x TaqMan Gene Expression Master Mix, primer (hsa-let-7a-5p / hsa-let.7d-5p (Primer Assay)) y agua libre de nucleasas (Tabla 12).

Tabla 12. Componentes para la detección de miRNAs por medio del kit TaqMan Gene Expression Master Mix.

Componente	Volumen
2x TaqMan Gene Expression Master Mix	5 µL
Primer Assay	Variable
Agua libre de RNAsas	Variable
cDNA	Variable
Volumen final de reacción	10 µL

Las condiciones del termociclado para el equipo QuantStudio 12K Flex, se describen en la Tabla 13. Brevemente, el cDNA se sometió a una temperatura inicial de 50 °C durante 2 min; 40 ciclos a 95°C durante 10 min, 95°C durante 15 s y 60°C durante 60 s (Tabla 13).

Tabla 13. Programación del equipo QuantStudio 12K Flex, para la qPCR utilizando el kit TaqMan Gene Expression Master Mix.

<i>Paso</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
<i>Incubación</i>	2 min	50°C
<i>Activación de la polimerasa</i>	10 min	95°C
<i>Desnaturalización</i>	15 s	95°C
<i>Alineación / Elongación</i>	60 s	60°C
<i>No de ciclos</i>	40 ciclos	

Análisis in-silico para localizar los mRNA blancos ya reportados

Mediante el uso del software de predicción de objetivos de miRNA (DIANA-miRPath v4.0). Se predijeron las posibles interacciones entre los miRNAs Let-7a y Let-7d en las vías de señalización implicadas en el desarrollo de la fibrosis pulmonar en la FPI y la NH fibrótica. Adicionalmente se consideraron esquemas de dichas vías usando la información de la librería de genes y genomas de Kyoto (KEGG).

Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad prism 8. Los niveles de expresión de los miRNAs Let-7a y Let-7d se determinaron mediante el método $2^{-\Delta Ct}$.

El modelo matemático permite calcular los cambios de la expresión génica relacionando la amplificación del gen normalizador y el gen de interés. Brevemente, el método $2^{-\Delta Ct}$ consiste en utilizar los valores de Ct generados en el equipo de qPCR. El desarrollo de la fórmula es el siguiente:

$$2^{-\Delta Ct} = \Delta Ct(Ct \text{ de interes} - Ct \text{ gen normalizador})$$

Donde el ΔCt es producto de la diferencia del Ct del miRNA de interés y el Ct del gen normalizador (***C.elegans*** miR-39), lo que resulta en un número sin unidades que representa el nivel de expresión en la reacción de qPCR.

La distribución de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Brevemente, para ambas mediciones de Let-7a y Let-7d proveniente de LBAs, se obtuvieron valores $P < 0.05$, rechazando la hipótesis nula de que ambos conjuntos de datos provenían de una distribución normal, es decir, se implementaron pruebas no paramétricas.

Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, para determinar si la expresión del miRNA de interés, es diferente en al menos uno de los tres grupos. Sin embargo, para determinar en cuál de los tres grupos existe esta diferencia significativa, se seleccionó la opción de comparación múltiple entre grupos, que ofrece la prueba de de Kruskal-Wallis.

Por otro lado, para ambas mediciones de Let-7a y Let-7d provenientes de suero, se obtuvieron valores de $P > 0.05$, aceptando la hipótesis nula de que ambos conjuntos de datos provenían de una distribución normal, es decir, se implementaron pruebas paramétricas

Se utilizó la prueba de ANOVA, para determinar si la expresión del miRNA de interés, es diferente en al menos uno de los tres grupos. Sin embargo, para determinar en cuál de los tres grupos existe esta diferencia significativa, se seleccionó la opción de comparación múltiple entre grupos, que ofrece la misma prueba de ANOVA múltiple.

Resultados

Uno de los objetivos fue estandarizar una técnica de extracción, amplificación y medición de miRNAs a partir de muestras de LBA. Por lo tanto, es importante describir las modificaciones que se llevaron a cabo para obtener datos cuantificables y comparables entre muestras de pacientes control y aquellos con FPI y NH, tanto en LBA como en sueros.

Es de esta manera, la razón de porque se describen las modificaciones realizadas para ambos protocolos tanto para la RT como para la PCR en tiempo real, usando ambas químicas de detección (SYBR Green y por Sonda TaqMan). Dicho lo anterior, en las tablas 14, 15 y 16 se resumen las condiciones de trabajo que se necesitaron para optimizar el proceso de medición de los miRNAs Let-7a y Let-7d en LBA.

En la Tabla 14, se muestra de manera resumida, las condiciones experimentales utilizando el miRNA Let-7a como objetivo de medición. Para ello se describe, tanto el método de extracción del RNA total utilizado, el realizar y donde se modificó un paso a lo largo del protocolo de la extracción, además de cuanto RNA se tomó de cada muestra y el buffer implementado para la reacción de RT. Por último, durante la qPCR se consideró el volumen de cDNA utilizado como parte de las modificaciones. Lo que define en gran medida, los volúmenes y la preparación de la mezcla para llevar a cabo la reacción en cada de la polimerasa utilizando la química de SYBR Green.

Tabla 14. Modificaciones al protocolo de la química de detección de SYBR Green utilizando como miRNA de prueba a Let-7a.

Método de extracción	Condiciones de extracción	Tratamiento con DNasa	RNA total	RT	qPCR
TRIzol	Sin modificaciones al protocolo	SI	200 ng	Buffer HiSpec y cDNA diluido en 50 µL	3 µL cDNA & 2 µL cDNA
QIAzol	1000 µL de QIAzol y 500 µL de LBA	NO	100 ng	Buffer HiSpec y cDNA sin diluir	2 µL cDNA directo
TRIzol	1200 µL TRIzol y 400 µL LBA	SI	400 ng	Buffer HiSpec y cDNA sin diluir	3 µL cDNA directo
TRIzol	Sin modificaciones al protocolo	SI	ng en 9 µL de RNA total	Buffer HiSpec y cDNA sin diluir	3 µL cDNA directo
TRIzol	Sin modificaciones al protocolo	SI	500 ng	Buffer HiFlex y cDNA diluido en 200 µL	2.5 µL cDNA diluido
TRIzol	Sin modificaciones al protocolo	SI	500 ng	Buffer HiFlex y cDNA diluido en 200 µL	5 µL cDNA diluido

Por otro lado, en la Tabla 15, se muestra de igual manera, las condiciones experimentales, pero ahora utilizando el miRNA Let-7d como objetivo de medición.

Tabla 15. Modificaciones al protocolo de la química de detección de SYBR Green utilizando como miRNA de prueba a Let-7d.

Método de extracción	Condiciones de extracción	Tratamiento con DNasa	RNA total	RT	qPCR
TRIzol	Sin modificaciones al protocolo	SI	500 ng	Buffer HiFlex y cDNA diluido en 200 µL	5 µL cDNA diluido
QIAzol	Sin modificaciones al protocolo	NO	1000 ng	Buffer HiFlex y cDNA diluido en 50 µL	3 µL cDNA diluido
miRNeasy Serum/Plasma	3.5 µL spike y 200 µL de LBA	NO	40 ng	Buffer HiFlex y cDNA sin diluir	3 µL cDNA diluido
miRNeasy Serum/Plasma	3.5 µL spike y 1000 µL de LBA	NO	ng en 12 µL de RNA total	Buffer HiFlex y cDNA sin diluir	3 µL cDNA diluido
miRNeasy Serum/Plasma	3.5 µL spike y 200 µL de LBA	NO	40 ng	miRCURY LNA RT Kit	3 µL cDNA diluido

Para la Tabla 16, se muestra de manera resumida, las condiciones experimentales utilizando el miRNA Let-7a como objetivo de medición, pero para la química de detección con Sonda TaqMan. De igual manera, se describe tanto el método de extracción del RNA total utilizado, el cómo no se realizaron modificaciones en el protocolo de extracción, cuanto RNA se tomó de cada muestra. Por último, para la qPCR, se consideró si el cDNA a utilizar se usaba de manera directa (como lo especifica el protocolo) o se diluía.

Tabla 16. Modificaciones al protocolo de la química de detección de Sonda TaqMan utilizando como miRNA de prueba a Let-7a.

Método de extracción	Condiciones de extracción	Tratamiento con DNasa	RNA total	RT	qPCR
TRizol y QIAzol	Sin modificaciones al protocolo	SI (TRizol)	100 ng (TRizol)	Pre-incubación y cDNA sin diluir	2 µL cDNA
		NO (QIAzol)	50 ng (QIAzol)		
TRizol	Sin modificaciones al protocolo	SI	500 ng	Pre-incubación y cDNA sin diluir	2 µL cDNA directo

Las primeras pruebas que se realizaron fueron para la química de detección de SYBR Green. Donde se modificó tanto el volumen de muestra biológica, como la cantidad de RNA utilizado para el RT. Se observó, que dichas modificaciones no mostraban un cambio significativo en cuanto a la detección de los miRNAs, lo que sugiere que la extracción de RNA total fuera poco compatible con la muestra o que se generara poco cDNA, y que conllevara a una amplificación tardía con un CT entre 38-40 (Figura 6).

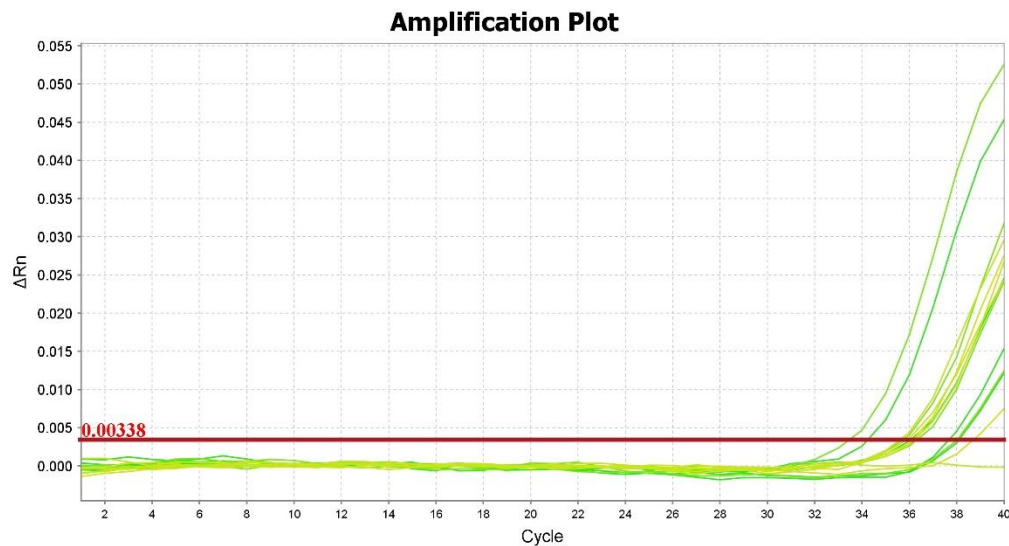


Figura 6. Curva de amplificación resultado de la RT-qPCR para Cel_miR-39 utilizando la química de SYBR Green.

Con base a estos resultados, se optó por utilizar la química de detección por Sonda TaqMan (Tabla 16). En donde se utilizaron muestras de RNA extraídas tanto por el reactivo TRIzol como con QIAzol. Se obtuvieron curvas de amplificación en algunas muestras, pero sin mostrar consistencia en todas ellas, en consecuencia, la técnica de detección se descartó (Figura 7).

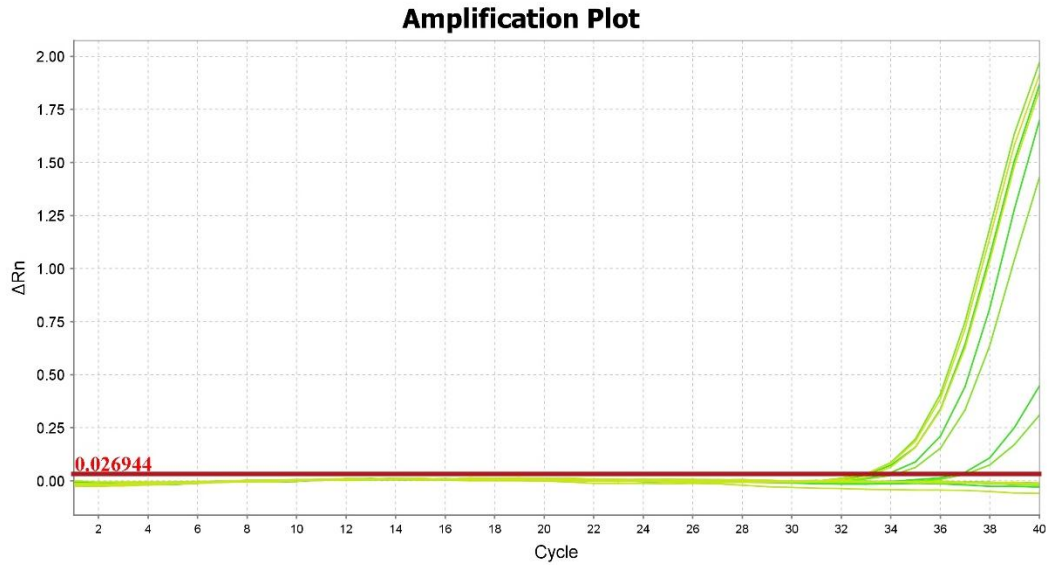


Figura 7. Curva de amplificación resultado de la RT-qPCR para Let-7a utilizando la química de Sonda TaqMan.

Se regreso a la química de SYBR Green, donde se cambió el buffer para la RT, cambiando el buffer específico para amplificar miRNA maduros (HiSpec) a uno recomendado tanto para miRNAs maduros como para precursores de miRNAs (HiFlex). Las variaciones entre la cantidad de RNA total en ng inicial, el uso de un buffer diferente y la concentración de cDNA, lograron una mejora considerable en cuanto a la amplificación de los miRNAs de interés, en donde se bajaron los ciclos de amplificación (32-36) sin embargo, sin ser suficiente (Figura 8).

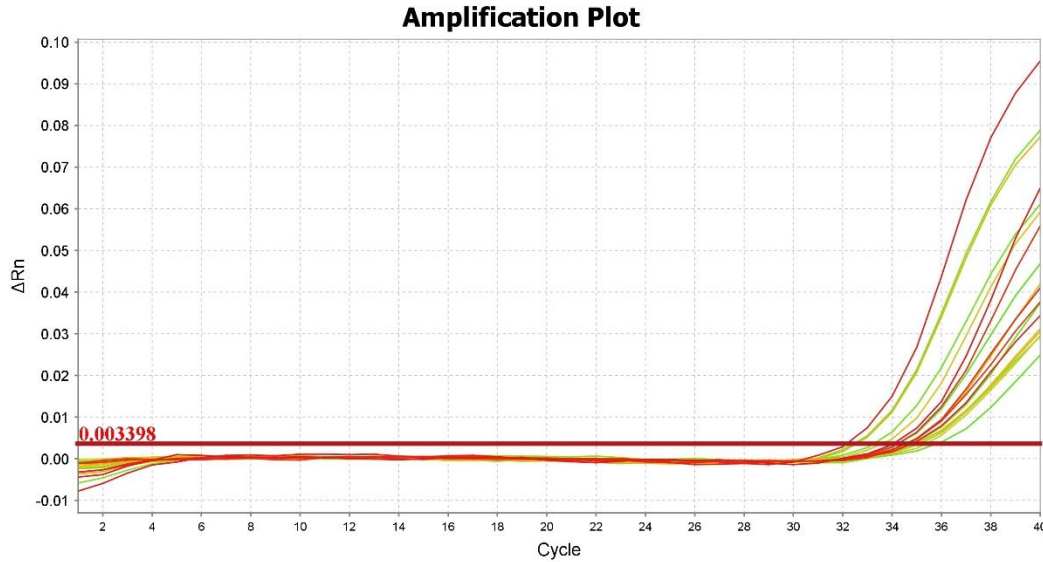


Figura 8. Curva de amplificación resultado de la RT-qPCR para Let-7d cambiando el buffer de la RT y utilizando la química de SYBR Green.

En consecuencia, se planteó el uso de un método de extracción capaz de retener RNA pequeños utilizando el kit por Columna miRNeasy Serum/Plasma. Aunado a esto, se implementó el uso de kit miRCURY LNA/miRNA SYBR Green PCR, sistema específico para la amplificación de miRNAs. En las Tablas 10 y 11, se describen las modificaciones realizadas en dicho sistema de detección, capaces de generar una amplificación de las secuencias procedentes de los miRNAs Let-7a y Let-7d.

Siguiendo este nuevo sistema, los ciclos de amplificación eran constantes en todas las muestras, pero eran muy altos (38/39), por lo tanto, se realizaron ligeras modificaciones. Estas condiciones finales de estandarización se describen en la Tabla 17.

Tabla 17. Modificaciones al protocolo de la química de detección de SYBR Green usando el kit miRCURY completo.

Método de extracción	Condiciones de extracción	Tratamiento con DNasa	RNA total	RT	qPCR
miRNeasy Serum/Plasma	3.5 µL spike y 200 µL de LBA	NO	40 ng	miRCURY LNA RT Kit	3 µL cDNA diluido

Análisis de la expresión de Let-7a y Let-7d en LBA

Al comparar los niveles de expresión en LBA del miRNA Let-7a se observó un incremento estadísticamente significativo entre el grupo FPI vs el control (*P= 0.0119) (Figura 9). En el caso del grupo de NH versus el grupo control, también hubo un aumento, pero no significativo (P= 0.1735). Tampoco hubo diferencias significativas de expresión entre FPI versus NH (P= 0.8423).

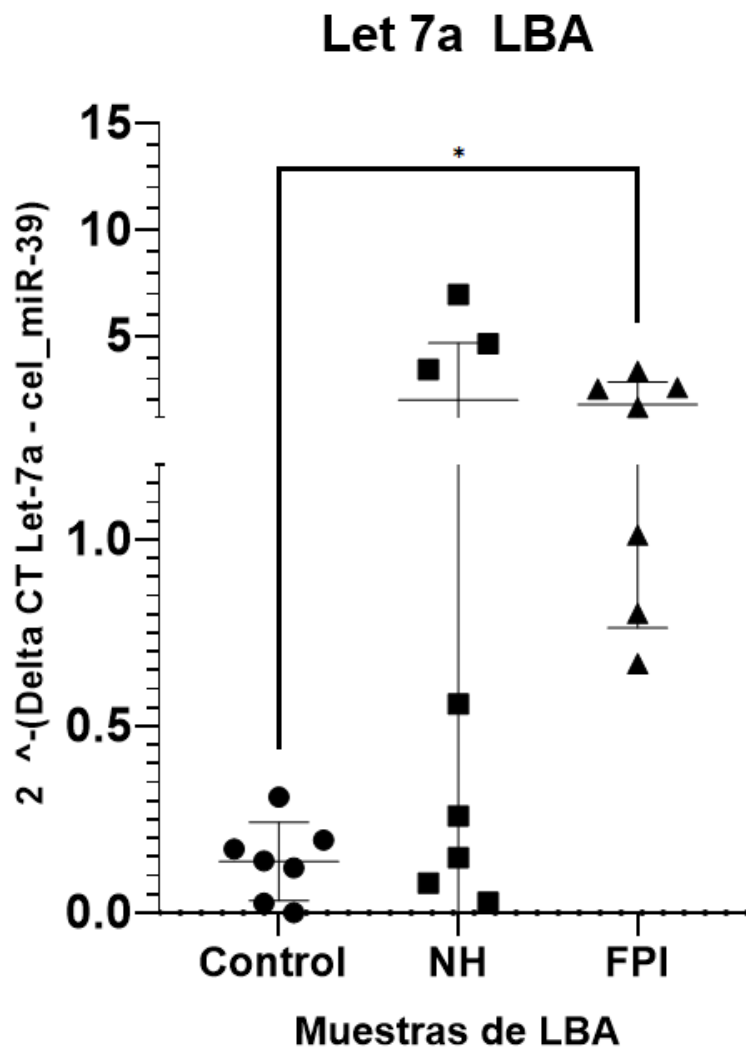


Figura 9. Expresión de Let-7a en LBA. Se observa un incremento de la expresión de Let-7a tanto en el grupo de NH como de FPI con respecto a los controles, pero solo significativo en el grupo de FPI versus Control (*P= 0.0119).

Al comparar los niveles de expresión en LBA del miRNA Let-7d, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en el grupo FPI versus el control ($P= 0.2105$) (Figura 10). Y tampoco se observó una diferencia significativa entre el grupo de NH versus el grupo control en la expresión del miRNA Let-7d ($P>0.9999$). Por último, no hubo diferencias significativas entre la expresión de Let-7d entre FPI versus NH ($P= 0.8003$).

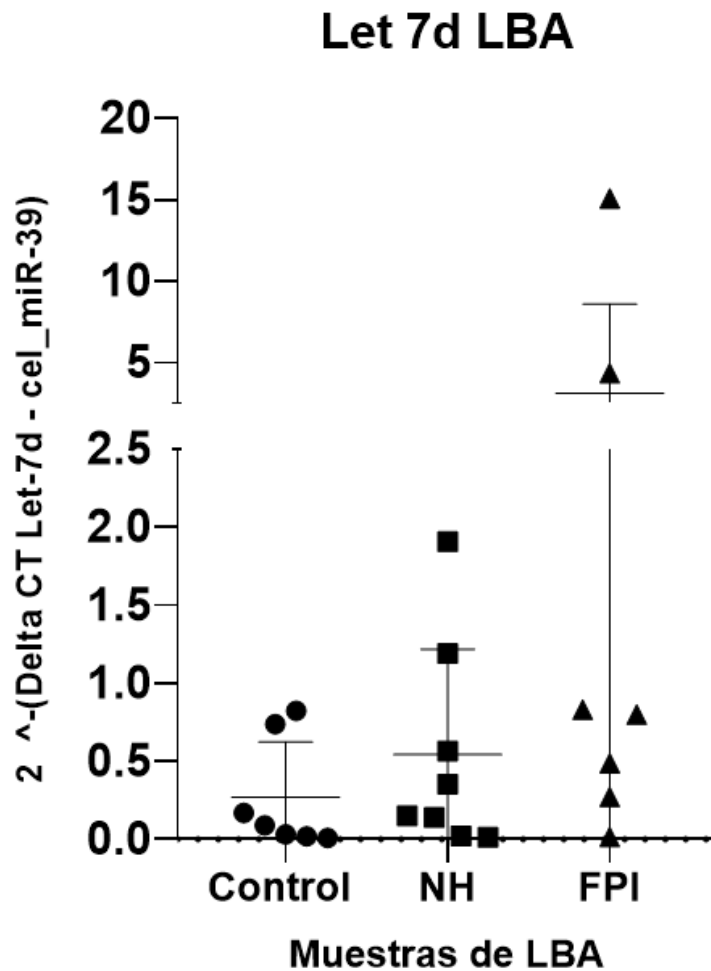


Figura 10. Expresión de Let-7d en muestras de LBA. La expresión de Let-7d entre los tres grupos de estudio, no mostro ningún tipo de diferencia significativa.

Análisis de la expresión de Let-7a y Let-7d en suero

Al comparar los niveles de expresión en el suero, del miRNA Let-7a entre el grupo de NH versus el grupo control se observó una disminución estadísticamente significativa (**P= 0.0034) (Figura 11). También, entre el grupo de FPI versus el grupo control, hubo una disminución estadísticamente significativa de Let-7a (*P= 0.0214). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de Let-7a entre FPI versus NH (P= 0.8811).

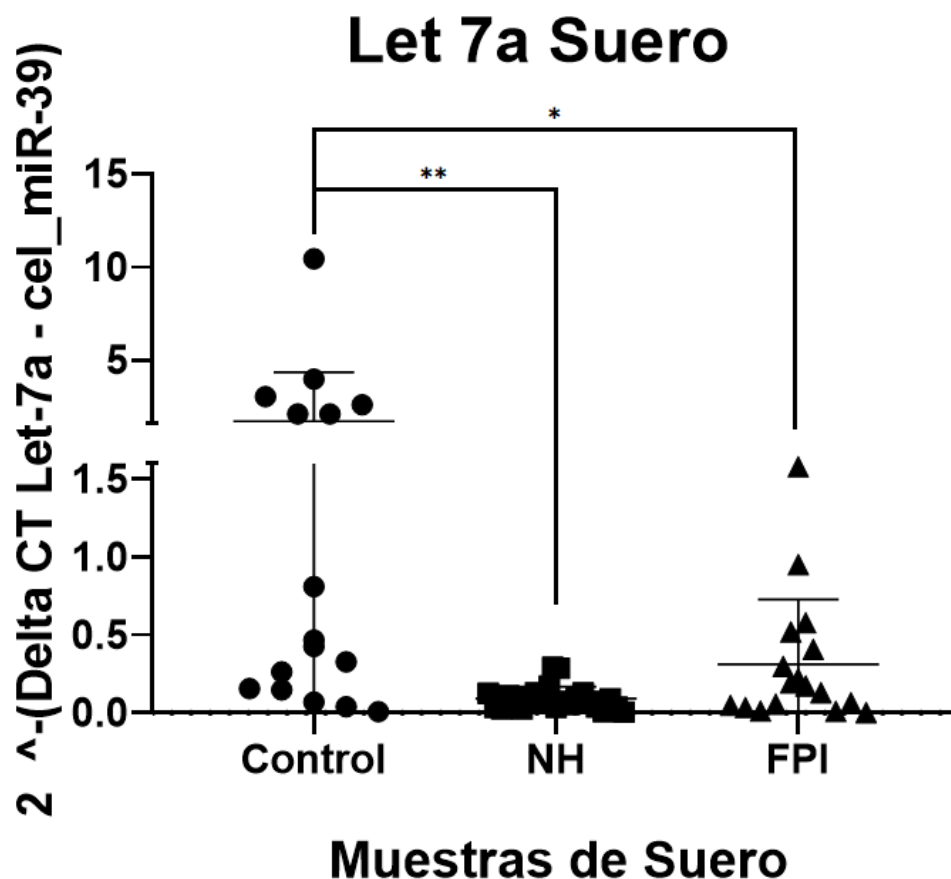


Figura 11. Expresión de Let-7a en muestras de suero. Se observó un incremento significativo de la expresión de Let-7a tanto en el grupo de NH (**P= 0.0034) como de FPI (*P= 0.0214) con respecto a los controles.

Al comparar los niveles de expresión en el suero, del miRNA Let-7d entre el grupo de FIP versus el control, se observó una disminución estadísticamente significativa (*P= 0.0326) (Figura 12). Entre el grupo de NH versus el grupo control, también se observó una disminución estadísticamente significativa (*P= 0.0220). Sin embargo, no hubo diferencias significativas de expresión de Let-7d entre FPI versus NH (P= 0.9996).

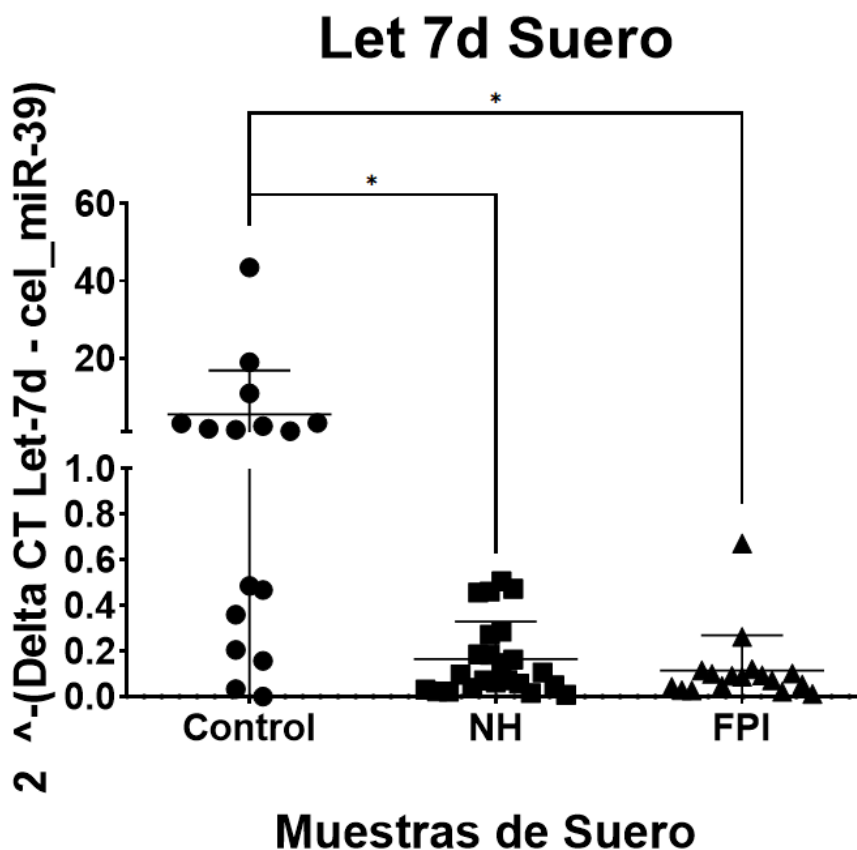


Figura 12. Expresión de Let-7d en muestras de suero. Se observó un incremento significativo de la expresión de Let-7d tanto en el grupo de NH (*P= 0.0220) como de FPI (*P= 0.0326) con respecto a los controles.

Análisis in-silico de mRNA blancos para Let-7a y Let-7d y sus vías de señalización asociadas a la FPI.

Después de realizar el análisis para identificar los posibles mRNAs diana de los miRNAs utilizando la herramienta KEGG Pathway Analysis, utilizada para identificar vías de señalización específicas en las que participan los genes diana, se determinaron primordialmente 3 genes blanco-asociados a la vía de señalización del TGF- β 1, vía involucrada en el desarrollo de la FPI (Tabla 18).

Tabla 18. Resumen de las principales vías de señalización y mRNA blanco a los miRNAs Let-7a y Let-7d.

miRNA	Vía de señalización	Genes blancos	Valor P
Let-7a y Let-7d	Vía de señalización del TGF- β 1	TGF β R1	0.0000307
		TGF β R2	
		MAPK1	

De acuerdo con la Figura 13, Let-7a y Let-7d tienen efecto directo en ambos receptores del TGF- β 1 (TGF β R1/ TGF β R2), impidiendo que se acople el TGF- β 1 a su receptor.

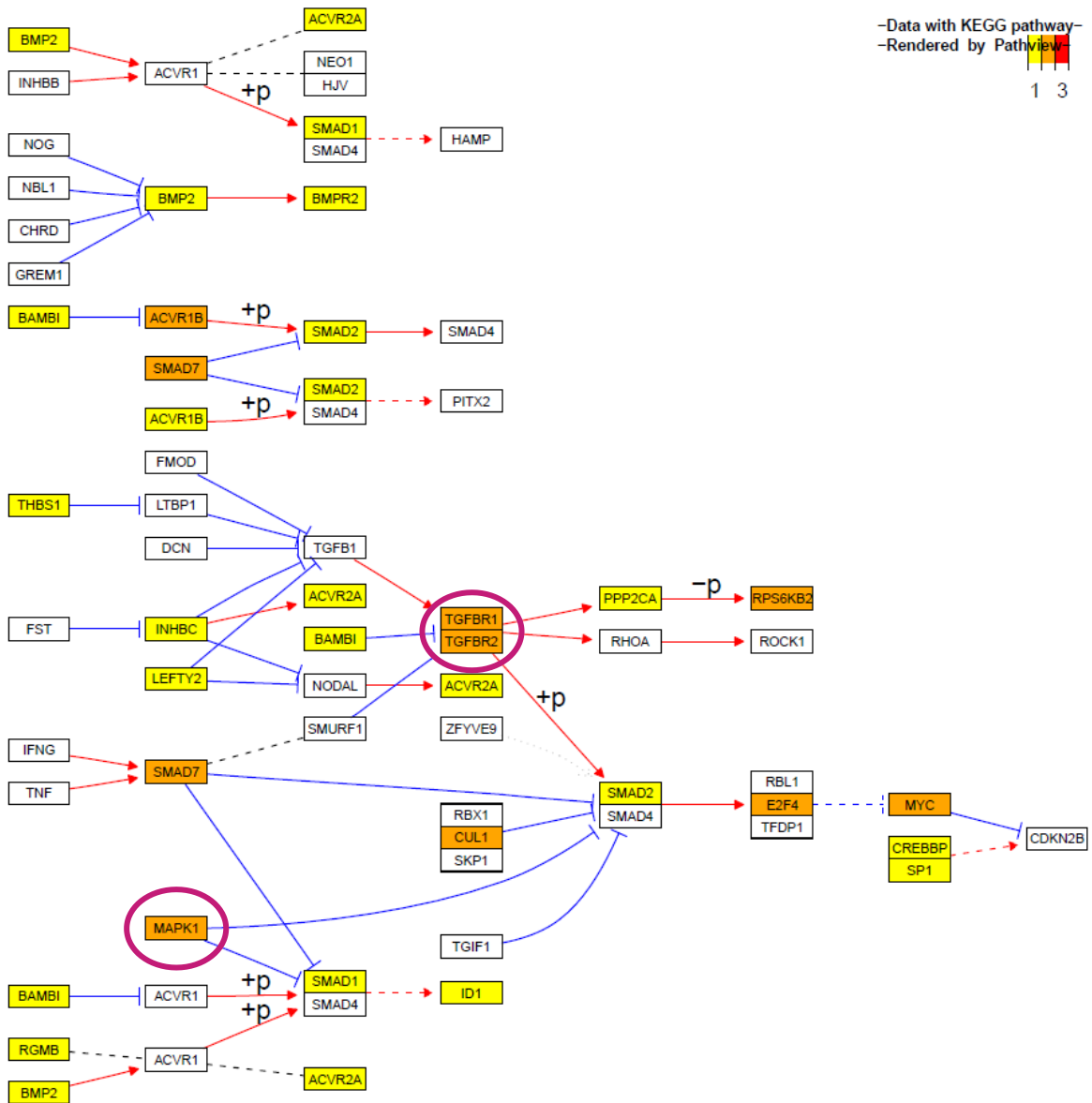


Figura 13. Vía de señalización del TGF- β 1 a través de KEGG. Se señalan aquellos genes blanco para Let-7a y Let-7d que participan en la vía de señalización del TGF- β 1.

Discusión

La evaluación de diversas moléculas en el suero, plasma y LBA en la FPI y otras EPIDs se ha enfocado principalmente en su utilidad como posibles biomarcadores diferenciales para el diagnóstico y pronóstico entre la FPI y la NH. Se han evaluado varias proteínas en el suero y plasma de los pacientes con FPI y otras EPIDs como lo son: la MMP-1, la MMP-2, la MMP-7, la MMP-9, la MMP-13, el TIMP-1, -2, -3 y -4, el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)-I, el CTGF, la proteína surfactante A y D (SP-A y SP-D), KL-6 y el ligando de quimiocina CC 18 (CCL18), por mencionar algunas. Sin embargo, ninguna de ellas mostró alguna utilidad como biomarcador efectivo para el diagnóstico de la FPI y menos aún para diferenciarla de otras EPIDs como la NH (Bormann et al., 2022; Fukuda et al., 1998; Hamai et al., 2016; Krein & Winston, 2002; Lasky et al., 1998; Nkyimbeng et al., 2013; Selman et al., 2000; K. Wang et al., 2017).

Desde su descubrimiento hasta la actualidad, los miRNAs han podido ser evaluados en varias muestras biológicas como tejido, suero, plasma, lágrimas y orina. Siendo los miRNAs séricos los más estudiados debido a la facilidad de obtención de las muestras y a su estabilidad en la circulación (Fleige & Pfaffl, 2006; Jung et al., 2010; Li et al., 2018; Teoh & Das, 2022; Yang et al., 2015).

El creciente número de evidencias respaldan la importancia de los miRNAs en el proceso fibrosante del pulmón y su potencial función como biomarcadores, al poder ser medidos en diferentes fluidos biológicos. Es así que el poder encontrar algún miRNA distintivo entre la FPI y algunas EPIDs, empezó a hacer motivo de varios estudios. A la fecha, se han reportado algunos miRNAs significativamente elevados en pacientes con FPI en contraste con el grupo control, entre los que se destacan el miR-21, miR-155, miR-590, miR-210 y miR-199a (Bodempudi et al., 2014; Dirol et al., 2022; P. Li et al., 2013; Lino Cardenas, Henaoui, et al., 2013). Por otro lado, también se han identificado miRNAs regulados negativamente, entre ellos se incluyen a los miR-29, miR-185, miR-18a, miR-26a, miR-15a y Let-7d (Bibaki et al., 2018; Y. Chen et al., 2019; Lacedonia et al., 2021; Liang et al., 2016; Pandit et al., 2010;

Tang et al., 2019; Tsitoura, Wells, Karagiannis, Lasithiotaki, Vasarmidi, Bibaki, Koutoulaki, Sato, & Demetrios, 2016; Q. Zhang et al., 2017). Lo que demuestra su potencial uso como biomarcadores. Sin embargo, la búsqueda de miRNAs específicos para diferenciar la FPI de la NH, sigue siendo motivo de estudio (Hamblin et al., 2022; Raghu et al., 2020). Por lo que tomando como antecedente que había evidencias sobre la disminución tanto de Let-7a y Let-7d en sueros de FPI, pero no así con la NH (Yang et al., 2015).

Entonces el encontrar diferencias en la expresión del miRNA Let-7a y Let-7d en la FPI y la NH, así como su correlación en el suero, podría brindar apoyo en el diagnóstico diferencial de la FPI, ya que la obtención de LBA forma parte del protocolo de diagnóstico para los pacientes con sospecha de FPI y evitar así la biopsia pulmonar. Sin embargo, a pesar de ser el LBA una muestra que permite analizar los componentes celulares y moleculares (proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos, etc.) que recubren al epitelio alveolar, lo que le da la relevancia biológica a la muestra (“ATS/ERS”, 2000; “ATS/ERS”, 2002; Carvalho et al., 2017; Oliveira et al., 2018; Raghu et al., 2018). Es un tipo de muestra que requiere de personal especializado para su obtención. A pesar de ello, los niveles de subexpresión de Let-7d ya han sido reportados en la FPI en muestras de suero, tejido pulmonar y en modelo murino de bleomicina. Pero como se mencionó, no hay reportes de sus niveles de expresión en LBA y menos aún de pacientes con NH (Błach & Mackiewicz, 2022; Liang et al., 2016; Min et al., 2016; Pandit et al., 2010; Tsitoura et al., 2016).

En algunas evidencias se describe que, bajo condiciones fisiológicas normales, tanto Let-7a como Let-7d, se encuentran altamente expresados (tejido, suero, plasma y LBA) y que su inhibición se asocia con el aumento de varios componentes de la ruta de señalización del TGF- β 1 como son: los receptores (TGFBR1 y 2) y marcadores mesenquimales como HMGA2, vimentina, N-cadherina y α -AML. Además, de su participación en otros procesos biológicos como lo son: la apoptosis, la TEM y el depósito excesivo de MEC ejerciendo un efecto dentro de la progresión

de la fibrosis pulmonar (Huleihel et al., 2014; Pandit et al., 2010, 2011; Vuga et al., 2009; Willis & Borok, 2007).

Si bien, tanto Let-7a y Let-7d comparten mRNAs blancos, entre los que destacan los receptores (TGFBR1 y 2) y HMGA2, también se plantea la participación de Let-7a en una vía de señalización diferente a su isoforma Let-7d. Esto se debe a que los niveles de expresión de Let-7a en suero, se encuentran disminuidos en pacientes con NH y FPI, siendo estadísticamente significativo solo para NH. Lo que plantea que Let-7a participa no solo a nivel de fibroblastos pulmonares y CEA como su isoforma Let-7d, sino que también podría estar asociado a un mecanismo de acción relacionado a la respuesta inflamatoria, independiente del mecanismo fisiopatológico asociado con la FPI (Henderson et al., 2010; Iliopoulos et al., 2009). Dicho papel sería mediante la vía de señalización medida por el factor nuclear κ B (NF- κ B), que se encarga de regular la respuesta inmune y por ende la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, induciendo la síntesis de Lin28, quien es capaz de inhibir a Let-7a y de esta manera no puede ejercer su acción sobre la IL-6, que es una citocina inflamatoria (Iliopoulos et al., 2009; O’Dea & Hoffmann, 2009).

Asimismo, se ha reportado y corroborado la presencia disminuida de Let-7d en el contexto de FPI, siendo un miRNA directamente implicado en la proliferación de miofibroblastos y el depósito excesivo de MEC, incluyendo a miR-21 y miembros de la familia miR-29 (Bibaki et al., 2018; Palleschi et al., 2020; Tsitoura, Wells, Karagiannis, Lasithiotaki, Vasarmidi, Bibaki, Koutoulaki, Sato, & Demetrios, 2016; Tzouvelekis & Kaminski, 2015).

No obstante, los niveles de expresión de Let-7a y Let-7d a partir de las muestras de sobrenadante de LBA en este estudio, no concuerdan con su contraparte medida en suero, ni tampoco con la literatura citada. Se debe agregar, que estas discrepancias no son un caso atípico, ya que en 2021 Lacedonia y colaboradores, reportaron una regulación negativa en miRNAs considerados profibróticos (miR-21 y miR-210) (Lacedonia et al., 2021). Ellos plantean el supuesto de que, debido a que sus mediciones se hicieron a partir de miRNAs provenientes de exosomas,

muchos miRNAs permanecen en la célula, y que de manera análoga el contenido exosomal no refleja la concentración verdadera de los miRNAs y otras moléculas dentro de la célula. Siguiendo esta lógica, podemos decir que tentativamente dicha regulación positiva de Let-7a y la falta de significancia de Let-7d en LBA podría ser reflejo del contenido total de miRNAs libres como de aquellos provenientes de exosomas y que las mediciones en tejido reflejan a aquellos miRNAs que no fueron liberados o encapsulados en microvesículas (Lacedonia et al., 2021; Pandit et al., 2010).

Por otro lado, en la literatura, se ha reportado la presencia de miRNAs tanto de manera libre extracelularmente como aquellos provenientes de exosomas celulares (Kuse et al., 2020; H. Lee et al., 2019; Z. Liu et al., 2022; Tsitoura, et al., 2016). Como el caso de Liu y colaboradores (2018), que evaluaron el patrón de expresión de los miRNAs exosomales obtenidos del sobrenadante de LBA de pacientes con FPI en comparación con un grupo control sano. En este estudio se destacó la subexpresión del miR-30^a en el grupo de FPI, el cual actúa sobre la proteína de unión 3 (TAB3), gen directamente asociado con la vía del TGF- β 1. Con estudios de transfección para sobre expresar dicho miRNA observaron que atenuaba la síntesis de TAB3, α -AML y fibronectina, por lo que concluyeron que la sobrerregulación de miR-30^a podría ser útil para atenuar el desarrollo de la FPI (Liu et al., 2018). Curiosamente este mismo estudio, también se reportó la subexpresión de Let-7d en los exosomas de LBA, al igual que en nuestro estudio hecho en el sobrenadante de LBA directamente.

En el presente estudio se evaluaron los niveles de expresión de los miRNAs Let-7a y Let-7d, en donde se sugiere su participación para diferenciar entre NH vs Controles y a su vez asociarles tentativamente como posibles marcadores diferenciales entre la FPI y la NH (Raghu et al., 2020; Selman et al., 2001).

Las mediciones obtenidas en el suero de nuestro estudio concuerdan con lo reportado en la literatura, donde se describe el probable papel antifibrótico de Let-7d. Ya que se ha observado que su inhibición transcripcional esta mediada por la

unión de Smad3 a su promotor, mecanismo esencial en la vía de señalización TGF β /SMAD. Lo que da como resultado un aumento de HMGA2 en la FPI, molécula reguladora de la TEM expresada por las CEA (Huleihel et al., 2014; Thuault et al., 2006). Basándose en esta premisa y a la homogeneidad entre la secuencia de Let-7a y Let-7d, en pacientes con una EPI epitelio-dependiente, los niveles de estos miRNAs deberían de estar a la baja, lo que no explicaría porque a nivel de LBA esto no sucede.

Conclusiones

Los niveles de expresión de los miRNAs Let-7a y Let-7d con el número de muestras manejado en este trabajo, no permiten distinguir entre la FPI y la NH. Se observó una subexpresión de ambos miRNAs tanto en la NH fibrótica como en la FPI. El hallazgo más importante en esta tesis fue haber evaluado los niveles de expresión de los miRNAs Let-7a y Let-7d tanto en LBA como en suero de pacientes con NH, que hasta la fecha no habían sido medidos en este tipo de patología. El hecho de que no haya diferencias en la expresión de ambos miRNAs reafirma la importancia de evaluar todas aquellas moléculas de interés en la FPI y compararlas con otra EPID ya que el comportamiento fibrótico es muy parecido inclusive a nivel circulatorio. Actualmente solo la MMP-7 en suero, es el marcador más promisorio ya que su expresión es diferencial entre FPI y controles sanos y entre FPI y NH en una cohorte de Estados Unidos y una de pacientes mexicanos).

El uso de LBA como potencial material de extracción de miRNAs presenta ciertas limitantes, esto se debe a que los resultados sugieren que la regulación positiva de Let-7a y la falta de diferencia significativa de Let-7d en LBA podría deberse a que se están considerando la concentración total de miRNAs, proveniente de aquellos miRNAs libres o contenidos en vesículas extracelulares y no solo de los presentes exclusivamente de tejido.

Asimismo, una de las principales limitantes en el uso de muestras de LBA, es su dificultad para obtener la cantidad y la pureza del RNA comparada con el suero, plasma, orina y líquido cefalorraquídeo.

Bibliografía

- Adegunsoye, A., & Ryerson, C. J. (2021). Diagnostic Classification of Interstitial Lung Disease in Clinical Practice. *Clinics in Chest Medicine*, 42(2), 251–261. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2021.03.002>
- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J.-W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *ELife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- Alipoor, S. D., Adcock, I. M., Garssen, J., Mortaz, E., Varahram, M., Mirsaiedi, M., & Velayati, A. (2016). The roles of miRNAs as potential biomarkers in lung diseases. *European Journal of Pharmacology*, 791, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.09.015>
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350–355. <https://doi.org/10.1038/nature02871>
- American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). (2000). *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(2 Pt 1), 646–664. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.2.ats3-00>
- American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. (2002). *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165(2), 277–304. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.2.ats01>
- Arroyo-Hernández, M., Maldonado, F., Lozano-Ruiz, F., Muñoz-Montaño, W., Nuñez-Baez, M., & Arrieta, O. (2021). Radiation-induced lung injury: current evidence. *BMC Pulmonary Medicine*, 21(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12890-020-01376-4>
- Artz, A., Butz, S., & Vestweber, D. (2016). GDF-15 inhibits integrin activation and mouse neutrophil recruitment through the ALK-5/TGF- β RII heterodimer. *Blood*, 128(4), 529–541. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-696617>
- Ask, K., Bonniaud, P., Maass, K., Eickelberg, O., Margetts, P. J., Warburton, D., Groffen, J., Gauldie, J., & Kolb, M. (2008). Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF- β isoform 1 but not TGF- β 3. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(3), 484–495. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.08.016>
- Barkauskas, C. E., Counce, M. J., Rackley, C. R., Bowie, E. J., Keene, D. R., Stripp, B. R., Randell, S. H., Noble, P. W., & Hogan, B. L. M. (2013). Type 2 alveolar

- cells are stem cells in adult lung. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(7), 3025–3036. <https://doi.org/10.1172/JCI68782>
- Bauman, K. A., Wettlaufer, S. H., Okunishi, K., Vannella, K. M., Stoolman, J. S., Huang, S. K., Courey, A. J., White, E. S., Hogaboam, C. M., Simon, R. H., Toews, G. B., Sisson, T. H., Moore, B. B., & Peters-Golden, M. (2010). The antifibrotic effects of plasminogen activation occur via prostaglandin E2 synthesis in humans and mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 1950–1960. <https://doi.org/10.1172/JCI38369>
- Baumgartner, K. B., Samet, J. M., Coultas, D. B., Stidley, C. A., Hunt, W. C., Colby, T. V., & Waldron, J. A. (2000). Occupational and environmental risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: a multicenter case-control study. Collaborating Centers. *American Journal of Epidemiology*, 152(4), 307–315. <https://doi.org/10.1093/aje/152.4.307>
- Baumgartner, K. B., Samet, J. M., Stidley, C. A., Colby, T. V., & Waldron, J. A. (1997). Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 155(1), 242–248. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.155.1.9001319>
- Bellanger, A.-P., Reboux, G., Rouzet, A., Barrera, C., Rocchi, S., Scherer, E., & Millon, L. (2019). Hypersensitivity pneumonitis: A new strategy for serodiagnosis and environmental surveys. *Respiratory Medicine*, 150, 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2019.02.019>
- Bibaki, E., Tsitoura, E., Vasarmidi, E., Margaritopoulos, G., Trachalaki, A., Koutoulaki, C., Georgopoulou, T., Spandidos, D. A., Tzanakis, N., & Antoniou, K. M. (2018). miR-185 and miR-29a are similarly expressed in the bronchoalveolar lavage cells in IPF and lung cancer but common targets DNMT1 and COL1A1 show disease specific patterns. *Molecular Medicine Reports*, 17(5), 7105–7112. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8778>
- Biernacka, A., Dobaczewski, M., & Frangogiannis, N. G. (2011). TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 29(5), 196–202. <https://doi.org/10.3109/08977194.2011.595714>
- Bissonnette, E. Y., Lauzon-Joset, J.-F., Debley, J. S., & Ziegler, S. F. (2020). Cross-Talk Between Alveolar Macrophages and Lung Epithelial Cells is Essential to Maintain Lung Homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 11, 583042. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583042>
- Błach, J., & Mackiewicz, B. (2022). How much do we know about genetic predisposition of hypersensitivity pneumonitis? *Annals of Agricultural and Environmental Medicine : AAEM*, 29(2), 306–308. <https://doi.org/10.26444/aaem/148049>

- Bodempudi, V., Hergert, P., Smith, K., Xia, H., Herrera, J., Peterson, M., Khalil, W., Kahm, J., Bitterman, P. B., & Henke, C. A. (2014). miR-210 promotes IPF fibroblast proliferation in response to hypoxia. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 307(4), L283-94. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00069.2014>
- Bormann, T., Maus, R., Stolper, J., Tort Tarrés, M., Brandenberger, C., Wedekind, D., Jonigk, D., Welte, T., Gauldie, J., Kolb, M., & Maus, U. A. (2022). Role of matrix metalloprotease-2 and MMP-9 in experimental lung fibrosis in mice. *Respiratory Research*, 23(1), 180. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02105-7>
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5573), 1655–1657. <https://doi.org/10.1126/science.296.5573.1655>
- Carvalho, A. S., Cucu, C. M., Lavareda, C., Miguel, F., Ventura, M., Almeida, S., Pinto, P., de Abreu, T. T., Rodrigues, L. V., Seixas, S., Bárbara, C., Azkargorta, M., Elortza, F., Semedo, J., Field, J. K., Mota, L., & Matthiesen, R. (2017). Bronchoalveolar Lavage Proteomics in Patients with Suspected Lung Cancer. *Scientific Reports*, 7, 42190. <https://doi.org/10.1038/srep42190>
- Castranova, V., Rabovsky, J., Tucker, J. H., & Miles, P. R. (1988). The alveolar type II epithelial cell: A multifunctional pneumocyte. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 93(3), 472–483. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(88\)90051-8](https://doi.org/10.1016/0041-008X(88)90051-8)
- Cerón-Pisa, N., Iglesias, A., Shafiek, H., Martín-Medina, A., Esteva-Socias, M., Muncunill, J., Fleischer, A., Verdú, J., Cosío, B. G., & Sauleda, J. (2022). Hsa-Mir-320c, Hsa-Mir-200c-3p, and Hsa-Mir-449c-5p as Potential Specific miRNA Biomarkers of COPD: A Pilot Study. *Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology*, 29(2), 143–156. <https://doi.org/10.3390/pathophysiology29020013>
- Chen, P., Huang, S., Yu, Q., Chao, K., Wang, Y., Zhou, G., Zhuang, X., Zeng, Z., Chen, M., & Zhang, S. (2022). Serum exosomal microRNA-144-3p: a promising biomarker for monitoring Crohn's disease. *Gastroenterology Report*, 10, goab056. <https://doi.org/10.1093/gastro/goab056>
- Chen, Y., Zhao, X., Sun, J., Su, W., Zhang, L., Li, Y., Liu, Y., Zhang, L., Lu, Y., Shan, H., & Liang, H. (2019). YAP1/Twist promotes fibroblast activation and lung fibrosis that conferred by miR-15a loss in IPF. *Cell Death and Differentiation*, 26(9), 1832–1844. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0250-0>
- Cho, J.-H., Gelinis, R., Wang, K., Etheridge, A., Piper, M. G., Batte, K., Dakhallah, D., Price, J., Bornman, D., Zhang, S., Marsh, C., & Galas, D. (2011). Systems biology of interstitial lung diseases: integration of mRNA and microRNA expression changes. *BMC Medical Genomics*, 4, 8. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-4-8>

- Corvol, H., Flamein, F., Epaud, R., Clement, A., & Guillot, L. (2009a). Lung alveolar epithelium and interstitial lung disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(8–9), 1643–1651. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.02.009>
- Corvol, H., Flamein, F., Epaud, R., Clement, A., & Guillot, L. (2009b). Lung alveolar epithelium and interstitial lung disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(8), 1643–1651. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.02.009>
- Craig, V. J., Zhang, L., Hagood, J. S., & Owen, C. A. (2015). Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 53(5), 585–600. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0020TR>
- Dees, C., Chakraborty, D., & Distler, J. H. W. (2021). Cellular and molecular mechanisms in fibrosis. *Experimental Dermatology*, 30(1), 121–131. <https://doi.org/10.1111/exd.14193>
- Derynck, R., & Budi, E. H. (2019). Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Science Signaling*, 12(570). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aav5183>
- Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., & Gabbiani, G. (1993). Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *Journal of Cell Biology*, 122(1), 103–111. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.1.103>
- Ding, N.-H., Li, J. J., & Sun, L.-Q. (2013). Molecular mechanisms and treatment of radiation-induced lung fibrosis. *Current Drug Targets*, 14(11), 1347–1356. <https://doi.org/10.2174/13894501113149990198>
- Dirol, H., Toyly, A., Ogus, A. C., Cilli, A., Ozbudak, O., Clark, O. A., & Ozdemir, T. (2022). Alterations in plasma miR-21, miR-590, miR-192 and miR-215 in idiopathic pulmonary fibrosis and their clinical importance. *Molecular Biology Reports*, 49(3), 2237–2244. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-07045-x>
- Dobaczewski, M., Bujak, M., Li, N., Gonzalez-Quesada, C., Mendoza, L. H., Wang, X. F., & Frangogiannis, N. G. (2010). Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction. *Circulation Research*, 107(3), 418–428. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.216101>
- Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D., & Wang, K. (2011). Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutation Research*, 717(1–2), 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.004>

- Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2–3), 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>
- Fukuda, Y., Ishizaki, M., Kudoh, S., Kitaichi, M., & Yamanaka, N. (1998). Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 78(6), 687–698.
- Furusawa, H., Cardwell, J. H., Okamoto, T., Walts, A. D., Konigsberg, I. R., Kurche, J. S., Bang, T. J., Schwarz, M. I., Brown, K. K., Kropski, J. A., Rojas, M., Cool, C. D., Lee, J. S., Wolters, P. J., Yang, I. V., & Schwartz, D. A. (2020). Chronic Hypersensitivity Pneumonitis, an Interstitial Lung Disease with Distinct Molecular Signatures. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 202(10), 1430–1444. <https://doi.org/10.1164/rccm.202001-0134OC>
- Gabbiani, G. (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *Journal of Pathology*, 200(4), 500–503. <https://doi.org/10.1002/path.1427>
- Gebert, L. F. R., & MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(1), 21–37. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>
- Golec, M., Kamdar, M., & Barteit, S. (2023). Comprehensive Ontology of Fibroproliferative Diseases: Protocol for a Semantic Technology Study. *JMIR Research Protocols*, 12, e48645. <https://doi.org/10.2196/48645>
- Gu, L., Zhu, Y. J., Yang, X., Guo, Z. J., Xu, W. B., & Tian, X. L. (2007). Effect of TGF- β /Smad signaling pathway on lung myofibroblast differentiation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28(3), 382–391. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00468.x>
- Guillamat-Prats, R. (2021). The role of MSC in wound healing, scarring and regeneration. *Cells*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/cells10071729>
- Guiot, J., Moermans, C., Henket, M., Corhay, J.-L., & Louis, R. (2017). Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung*, 195(3), 273–280. <https://doi.org/10.1007/s00408-017-9993-5>
- Guler, S. A., & Corte, T. J. (2021). Interstitial Lung Disease in 2020: A History of Progress. *Clinics in Chest Medicine*, 42(2), 229–239. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2021.03.001>

- Guz, M., Rivero-Müller, A., Okoń, E., Stenzel-Bembenek, A., Polberg, K., Słomka, M., & Stepulak, A. (2014). MicroRNAs-role in lung cancer. *Disease Markers*, 2014, 218169. <https://doi.org/10.1155/2014/218169>
- Györfi, A. H., Matei, A.-E., & Distler, J. H. W. (2018). Targeting TGF- β signaling for the treatment of fibrosis. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 68–69, 8–27. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.12.016>
- Hagimoto, N., Kuwano, K., Inoshima, I., Yoshimi, M., Nakamura, N., Fujita, M., Maeyama, T., & Hara, N. (2002). TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(12), 6470–6478. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.12.6470>
- Hamai, K., Iwamoto, H., Ishikawa, N., Horimasu, Y., Masuda, T., Miyamoto, S., Nakashima, T., Ohshimo, S., Fujitaka, K., Hamada, H., Hattori, N., & Kohno, N. (2016). Comparative Study of Circulating MMP-7, CCL18, KL-6, SP-A, and SP-D as Disease Markers of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Disease Markers*, 2016, 4759040. <https://doi.org/10.1155/2016/4759040>
- Hamblin, M., Prosch, H., & Vašáková, M. (2022). Diagnosis, course and management of hypersensitivity pneumonitis. *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society*, 31(163). <https://doi.org/10.1183/16000617.0169-2021>
- Hata, A., & Chen, Y.-G. (2016). TGF- β Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022061>
- Henderson, N. C., Rieder, F., & Wynn, T. A. (2020). Fibrosis: from mechanisms to medicines. *Nature*, 587(7835), 555–566. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2938-9>
- Henderson, W. R. J., Chi, E. Y., Ye, X., Nguyen, C., Tien, Y., Zhou, B., Borok, Z., Knight, D. A., & Kahn, M. (2010). Inhibition of Wnt/beta-catenin/CREB binding protein (CBP) signaling reverses pulmonary fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14309–14314. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001520107>
- Hennessey, P. T., Sanford, T., Choudhary, A., Mydlarz, W. W., Brown, D., Adai, A. T., Ochs, M. F., Ahrendt, S. A., Mambo, E., & Califano, J. A. (2012). Serum microrna biomarkers for detection of non-small cell lung cancer. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032307>
- Heukels, P., Moor, C. C., von der Thüsen, J. H., Wijsenbeek, M. S., & Kool, M. (2019). Inflammation and immunity in IPF pathogenesis and treatment. *Respiratory Medicine*, 147, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.12.015>

- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G., & Chaponnier, C. (2001). Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Molecular Biology of the Cell*, 12(9), 2730–2741. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.9.2730>
- Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M.-L., & Gabbiani, G. (2007). The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins. *The American Journal of Pathology*, 170(6), 1807–1816. <https://doi.org/https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070112>
- Hirasawa, Y., Kohno, N., Yokoyama, A., Inoue, Y., Abe, M., & Hiwada, K. (1997). KL-6, a human MUC1 mucin, is chemotactic for human fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 17(4), 501–507. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.17.4.2253>
- Honda, E., Yoshida, K., & Munakata, H. (2010). Transforming growth factor-beta upregulates the expression of integrin and related proteins in MRC-5 human myofibroblasts. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 220(4), 319–327. <https://doi.org/10.1620/tjem.220.319>
- Horowitz, J. C., Lee, D. Y., Waghray, M., Keshamouni, V. G., Thomas, P. E., Zhang, H., Cui, Z., & Thannickal, V. J. (2004). Activation of the pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway by transforming growth factor-beta1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 1359–1367. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306248200>
- Hu, B., Wu, Z., & Phan, S. H. (2003). Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 29(3 Pt 1), 397–404. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0063OC>
- Hu, H.-H., Chen, D.-Q., Wang, Y.-N., Feng, Y.-L., Cao, G., Vaziri, N. D., & Zhao, Y.-Y. (2018). New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis. *Chemico-Biological Interactions*, 292, 76–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.008>
- Huang, Y., Xie, Y., Abel, P. W., Wei, P., Plowman, J., Toews, M. L., Strah, H., Siddique, A., Bailey, K. L., & Tu, Y. (2020). TGF- β 1-induced miR-424 promotes pulmonary myofibroblast differentiation by targeting Slit2 protein expression. *Biochemical Pharmacology*, 180, 114172. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114172>
- Huleihel, L., Ben-Yehudah, A., Milosevic, J., Yu, G., Pandit, K., Sakamoto, K., Yousef, H., LeJeune, M., Coon, T. A., Redinger, C. J., Chensny, L., Manor, E., Schatten, G., & Kaminski, N. (2014). Let-7d microRNA affects mesenchymal phenotypic properties of lung fibroblasts. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and*

Molecular Physiology, 306(6), L534-42.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00149.2013>

Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., & Struhl, K. (2009). An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell*, 139(4), 693–706.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.014>

Jinta, T., Miyazaki, Y., Kishi, M., Akashi, T., Takemura, T., Inase, N., & Yoshizawa, Y. (2010). The Pathogenesis of Chronic Hypersensitivity Pneumonitis in Common With Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Expression of Apoptotic Markers. *American Journal of Clinical Pathology*, 134(4), 613–620.
<https://doi.org/10.1309/AJCPK8RPQX7TQRQC>

Jung, H. J., & Suh, Y. (2014). Circulating miRNAs in Ageing and Ageing-Related Diseases. *Journal of Genetics and Genomics*, 41(9), 465–472.
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2014.07.003>

Jung, M., Schaefer, A., Steiner, I., Kempkensteffen, C., Stephan, C., Erbersdobler, A., & Jung, K. (2010). Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. *Clinical Chemistry*, 56(6), 998–1006.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.141580>

Kalchier-Dekel, O., Galvin, J. R., Burke, A. P., Atamas, S. P., & Todd, N. W. (2018). Interstitial Lung Disease and Pulmonary Fibrosis: A Practical Approach for General Medicine Physicians with Focus on the Medical History. *Journal of Clinical Medicine*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/jcm7120476>

Kallenberg, C. G. M., Schilizzi, B. M., Beaumont, F., Leij, L. De, Poppema, S., & The, T. H. (1987). Expression of class II major histocompatibility complex antigens on alveolar epithelium in interstitial lung disease: Relevance to pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Pathology*, 40(7), 725–733.
<https://doi.org/10.1136/jcp.40.7.725>

Kasai, H., Allen, J. T., Mason, R. M., Kamimura, T., & Zhang, Z. (2005). TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respiratory Research*, 6(1), 56. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-56>

Kelly, M., Kolb, M., Bonniaud, P., & Gauldie, J. (2003). Re-evaluation of fibrogenic cytokines in lung fibrosis. *Current Pharmaceutical Design*, 9(1), 39–49.
<https://doi.org/10.2174/1381612033392341>

Kendall, R. T., & Feghali-Bostwick, C. A. (2014). Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators. *Frontiers in Pharmacology*, 5 MAY(May), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00123>

- Keogh, B. A., & Crystal, R. G. (1982). Alveolitis: the key to the interstitial lung disorders. *Thorax*, 37(1), 1–10. <https://doi.org/10.1136/thx.37.1.1>
- Khalil, N., & Greenberg, A. H. (1991). The role of TGF-beta in pulmonary fibrosis. *Ciba Foundation Symposium*, 157, 111–194. <https://doi.org/10.1002/9780470514061.ch13>
- Kim, J., Kim, W. T., & Kim, W.-J. (2020). Advances in urinary biomarker discovery in urological research. *Investigative and Clinical Urology*, 61(Suppl 1), S8–S22. <https://doi.org/10.4111/icu.2020.61.S1.S8>
- King, T. E. J., Pardo, A., & Selman, M. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet (London, England)*, 378(9807), 1949–1961. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60052-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60052-4)
- Kishore, A., Borucka, J., Petrakova, J., & Petrek, M. (2014). Novel Insights into miRNA in Lung and Heart Inflammatory Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2014, 259131. <https://doi.org/10.1155/2014/259131>
- Kobayashi, J., & Kitamura, S. (1995). KL-6: a serum marker for interstitial pneumonia. *Chest*, 108(2), 311–315. <https://doi.org/10.1378/chest.108.2.311>
- Korpai, M., Lee, E. S., Hu, G., & Kang, Y. (2008). The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *Journal of Biological Chemistry*, 283(22), 14910–14914.
- Krein, P. M., & Winston, B. W. (2002). Roles for insulin-like growth factor I and transforming growth factor-beta in fibrotic lung disease. *Chest*, 122(6 Suppl), 289S–293S. https://doi.org/10.1378/chest.122.6_suppl.289s
- Kreuter, M., Ladner, U. M., Costabel, U., Jonigk, D., & Heussel, C. P. (2021). The Diagnosis and Treatment of Pulmonary Fibrosis. *Deutsches Arzteblatt International*, 118(Forthcoming), 152–162. <https://doi.org/10.3238/arztebl.m2021.0018>
- Kumar, M., Ahmad, T., Sharma, A., Mabalirajan, U., Kulshreshtha, A., Agrawal, A., & Ghosh, B. (2011). Let-7 microRNA-mediated regulation of IL-13 and allergic airway inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(5), 1010–1077. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.04.034>
- Kumar, S., Vijayan, M., Bhatti, J. S., & Reddy, P. H. (2017). MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 146, 47–94. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.12.013>

- Kurowska-Stolarska, M., Hasoo, M. K., Welsh, D. J., Stewart, L., McIntyre, D., Morton, B. E., Johnstone, S., Miller, A. M., Asquith, D. L., Millar, N. L., Millar, A. B., Feghali-Bostwick, C. A., Hirani, N., Crick, P. J., Wang, Y., Griffiths, W. J., McInnes, I. B., & McSharry, C. (2017). The role of microRNA-155/liver X receptor pathway in experimental and idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *139*(6), 1946–1956. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.021>
- Kuse, N., Kamio, K., Azuma, A., Matsuda, K., Inomata, M., Usuki, J., Morinaga, A., Tanaka, T., Kashiwada, T., Atsumi, K., Hayashi, H., Saito, Y., Seike, M., & Gemma, A. (2020). Exosome-Derived microRNA-22 Ameliorates Pulmonary Fibrosis by Regulating Fibroblast-to-Myofibroblast Differentiation in Vitro and in Vivo. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku Zasshi*, *87*(3), 118–128. https://doi.org/10.1272/jnms.JNMS.2020_87-302
- Lacedonia, D., Scioscia, G., Soccio, P., Conese, M., Catucci, L., Palladino, G. P., Simone, F., Quarato, C. M. I., Di Gioia, S., Rana, R., Sollitto, F., & Foschino-Barbaro, M. P. (2021). Downregulation of exosomal let-7d and miR-16 in idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulmonary Medicine*, *21*(1), 188. <https://doi.org/10.1186/s12890-021-01550-2>
- Lasky, J. A., Ortiz, L. A., Tonthat, B., Hoyle, G. W., Corti, M., Athas, G., Lungarella, G., Brody, A., & Friedman, M. (1998). Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *The American Journal of Physiology*, *275*(2), L365-71. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.275.2.L365>
- Lee, C. G., Cho, S. J., Kang, M. J., Chapoval, S. P., Lee, P. J., Noble, P. W., Yehualaeshet, T., Lu, B., Flavell, R. A., Milbrandt, J., Homer, R. J., & Elias, J. A. (2004). Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor beta1-induced pulmonary fibrosis. *The Journal of Experimental Medicine*, *200*(3), 377–389. <https://doi.org/10.1084/jem.20040104>
- Lee, H., Groot, M., Pinilla-Vera, M., Fredenburgh, L. E., & Jin, Y. (2019). Identification of miRNA-rich vesicles in bronchoalveolar lavage fluid: Insights into the function and heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, *294*, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.008>
- Lee, H., Han, S., Kwon, C. S., & Lee, D. (2016). Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein & Cell*, *7*(2), 100–113. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0212-y>

- Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., & Thompson, E. W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: New insights in signaling, development, and disease. *Journal of Cell Biology*, 172(7), 973–981. <https://doi.org/10.1083/jcb.200601018>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Lei, G. S., Kline, H. L., Lee, C. H., Wilkes, D. S., & Zhang, C. (2016). Regulation of Collagen V Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition by miR-185 and miR-186 during Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Pathology*, 186(9), 2310–2316. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.04.015>
- Ley, B., Brown, K. K., & Collard, H. R. (2014). Molecular biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 307(9), L681-91. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00014.2014>
- Ley, B., Collard, H. R., & King, T. E. J. (2011). Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(4), 431–440. <https://doi.org/10.1164/rccm.201006-0894CI>
- Li, P., Zhao, G.-Q., Chen, T.-F., Chang, J.-X., Wang, H.-Q., Chen, S.-S., & Zhang, G.-J. (2013). Serum miR-21 and miR-155 expression in idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of Asthma : Official Journal of the Association for the Care of Asthma*, 50(9), 960–964. <https://doi.org/10.3109/02770903.2013.822080>
- Li, R., Wang, Y., Song, X., Sun, W., Zhang, J., Liu, Y., Li, H., Meng, C., Zhang, J., Zheng, Q., & Lv, C. (2018). Potential regulatory role of circular RNA in idiopathic pulmonary fibrosis. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(6), 3256–3268. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3892>
- Liang, H., Liu, S., Chen, Y., Bai, X., Liu, L., Dong, Y., Hu, M., Su, X., Chen, Y., Huangfu, L., Li, X., Gu, Y., & Shan, H. (2016). miR-26a suppresses EMT by disrupting the Lin28B/let-7d axis: potential cross-talks among miRNAs in IPF. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 94(6), 655–665. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1381-8>
- Liang, H., Xu, C., Pan, Z., Zhang, Y., Xu, Z., Chen, Y., Li, T., Li, X., Liu, Y., Huangfu, L., Lu, Y., Zhang, Z., Yang, B., Gitau, S., Lu, Y., Shan, H., & Du, Z. (2014). The antifibrotic effects and mechanisms of microRNA-26a action in

- idiopathic pulmonary fibrosis. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 22(6), 1122–1133. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.42>
- Lino Cardenas, C. L., Henaoui, I. S., Courcot, E., Roderburg, C., Cauffiez, C., Aubert, S., Copin, M.-C., Wallaert, B., Glowacki, F., Dewaeles, E., Milosevic, J., Maurizio, J., Tedrow, J., Marcet, B., Lo-Guidice, J.-M., Kaminski, N., Barbry, P., Luedde, T., Perrais, M., ... Pottier, N. (2013). miR-199a-5p Is upregulated during fibrogenic response to tissue injury and mediates TGFbeta-induced lung fibroblast activation by targeting caveolin-1. *PLoS Genetics*, 9(2), e1003291. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003291>
- Lino Cardenas, C. L., Kaminski, N., & Kass, D. J. (2013). Micromanaging microRNAs: Using murine models to study microRNAs in lung fibrosis. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 10(3), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2012.11.003>
- Liu, B., Jiang, T., Hu, X., Liu, Z., Zhao, L., Liu, H., Liu, Z., & Ma, L. (2018). Downregulation of microRNA-30a in bronchoalveolar lavage fluid from idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Molecular Medicine Reports*, 18(6), 5799–5806. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9565>
- Liu, G., Friggeri, A., Yang, Y., Milosevic, J., Ding, Q., Thannickal, V. J., Kaminski, N., & Abraham, E. (2010). miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *Journal of Experimental Medicine*, 207(8), 1589–1597. <https://doi.org/10.1084/jem.20100035>
- Liu, Z., Yan, J., Tong, L., Liu, S., & Zhang, Y. (2022). The role of exosomes from BALF in lung disease. *Journal of Cellular Physiology*, 237(1), 161–168. <https://doi.org/10.1002/jcp.30553>
- Long, H., Wang, X., Chen, Y., Wang, L., Zhao, M., & Lu, Q. (2018). Dysregulation of microRNAs in autoimmune diseases: Pathogenesis, biomarkers and potential therapeutic targets. *Cancer Letters*, 428, 90–103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.04.016>
- Lytle, J. R., Yario, T. A., & Steitz, J. A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(23), 9667–9672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703820104>
- Marques, T. M., & Gama-Carvalho, M. (2022). Network Approaches to Study Endogenous RNA Competition and Its Impact on Tissue-Specific microRNA Functions. *Biomolecules*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/biom12020332>
- Matsuura, K., Aizawa, N., Enomoto, H., Nishiguchi, S., Toyoda, H., Kumada, T., Iio, E., Ito, K., Ogawa, S., Isogawa, M., Alter, H. J., & Tanaka, Y. (2018). Circulating let-7 Levels in Serum Correlate With the Severity of Hepatic Fibrosis in Chronic

- Hepatitis C. *Open Forum Infectious Diseases*, 5(11), ofy268.
<https://doi.org/10.1093/ofid/ofy268>
- Matsuyama, H., & Suzuki, H. I. (2019). Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010132>
- Maurer, B., Stanczyk, J., Jüngel, A., Akhmetshina, A., Trenkmann, M., Brock, M., Kowal-Bielecka, O., Gay, R. E., Michel, B. A., Distler, J. H. W., Gay, S., & Distler, O. (2010). MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatism*, 62(6), 1733–1743.
<https://doi.org/10.1002/art.27443>
- Mayr, C., Hemann, M. T., & Bartel, D. P. (2007). Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5818), 1576–1579. <https://doi.org/10.1126/science.1137999>
- McConkey, D. J., Choi, W., Marquis, L., Martin, F., Williams, M. B., Shah, J., Svatek, R., Das, A., Adam, L., Kamat, A., Siefker-Radtke, A., & Dinney, C. (2009). Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 28(3–4), 335–344.
<https://doi.org/10.1007/s10555-009-9194-7>
- McKeown, S., Richter, A. G., O’Kane, C., McAuley, D. F., & Thickett, D. R. (2009). MMP expression and abnormal lung permeability are important determinants of outcome in IPF. *The European Respiratory Journal*, 33(1), 77–84.
<https://doi.org/10.1183/09031936.00060708>
- Min, H., Fan, S., Song, S., Zhuang, Y., Li, H., Wu, Y., Cai, H., Yi, L., Dai, J., & Gao, Q. (2016). Plasma microRNAs are associated with acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Diagnostic Pathology*, 11(1), 135.
<https://doi.org/10.1186/s13000-016-0583-2>
- Minnis, P., Kane, R., Anglin, R., Walsh, S., Worrel, J., Khan, F., Lumsden, R. V, Whitty, S., & Keane, M. P. (2015). *Serum exosomes from IPF patients display a fibrotic miRNA profile that correlates to clinical measures of disease severity*. Eur Respiratory Soc.
- Morell, F., Roger, À., Reyes, L., Cruz, M. J., Murio, C., & Muñoz, X. (2008). Bird fancier’s lung: a series of 86 patients. *Medicine*, 87(2), 110–130.
<https://doi.org/10.1097/MD.0b013e31816d1dda>
- Mori, L., Bellini, A., Stacey, M. A., Schmidt, M., & Mattoli, S. (2005). Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Experimental Cell Research*, 304(1), 81–90.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.11.011>

- Morris, D. G. (2006). Pulmonary Fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Encyclopedia of Respiratory Medicine, Four-Volume Set*, 2, 557–564. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00334-3>
- Müller, N. L., & Coiby, T. V. (1997). Idiopathic interstitial pneumonias: high-resolution CT and histologic findings. *Radiographics: A Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 17(4), 1016–1022. <https://doi.org/10.1148/radiographics.17.4.9225401>
- Muñoz-Félix, J. M., González-Núñez, M., & López-Novoa, J. M. (2013). ALK1-Smad1/5 signaling pathway in fibrosis development: friend or foe? *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 24(6), 523–537. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.08.002>
- Nangia-Makker, P., Hogan, V., Balan, V., & Raz, A. (2022). Chimeric galectin-3 and collagens: Biomarkers and potential therapeutic targets in fibroproliferative diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, 298(12), 102622. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102622>
- Niaz, S. (2018). The AGO proteins: an overview. *Biological Chemistry*, 399(6), 525–547. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0329>
- Nisticò, P., Bissell, M. J., & Radisky, D. C. (2012). Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011908>
- Nkyimbeng, T., Ruppert, C., Shiomi, T., Dahal, B., Lang, G., Seeger, W., Okada, Y., D'Armiento, J., & Günther, A. (2013). Pivotal role of matrix metalloproteinase 13 in extracellular matrix turnover in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*, 8(9), e73279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073279>
- Oak, S. R., Murray, L., Herath, A., Sleeman, M., Anderson, I., Joshi, A. D., Coelho, A. L., Flaherty, K. R., Toews, G. B., Knight, D., Martinez, F. J., & Hogaboam, C. M. (2011). A micro RNA processing defect in rapidly progressing idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*, 6(6), e21253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021253>
- O'Dea, E., & Hoffmann, A. (2009). NF-κB signaling. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, 1(1), 107–115. <https://doi.org/10.1002/wsbm.30>
- Oliveira, D. S., Araújo Filho, J. de A., Paiva, A. F. L., Ikari, E. S., Chate, R. C., & Nomura, C. H. (2018). Idiopathic interstitial pneumonias: review of the latest American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Radiologia Brasileira*, 51(5), 321–327. <https://doi.org/10.1590/0100-3984.2016.0134>

- O'Reilly, S. (2016). MicroRNAs in fibrosis: Opportunities and challenges. *Arthritis Research and Therapy*, 18(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-0929-x>
- Ortiz-zapater, E., Signes-costa, J., Montero, P., & Roger, I. (2022). Lung Fibrosis and Fibrosis in the Lungs: Is It All about Myofibroblasts? *Biomedicines*, 10(6), 1–20. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061423>
- Palleschi, A., Gaudio, G., Edefonti, V., Musso, V., Terrasi, A., Ambrogi, F., Franzini, S., Rosso, L., Tarsia, P., Morlacchi, L. C., Ferrero, S., Nosotti, M., & Vaira, V. (2020). Bronchoalveolar Lavage-microRNAs Are Potential Novel Biomarkers of Outcome After Lung Transplantation. *Transplantation Direct*, 6(5), e547. <https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000000994>
- Pandit, K. V., Corcoran, D., Yousef, H., Yarlagadda, M., Tzouveleki, A., Gibson, K. F., Konishi, K., Yousem, S. A., Singh, M., Handley, D., Richards, T., Selman, M., Watkins, S. C., Pardo, A., Ben-Yehudah, A., Bouros, D., Eickelberg, O., Ray, P., Benos, P. V., & Kaminski, N. (2010). Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(2), 220–229. <https://doi.org/10.1164/rccm.200911-1698OC>
- Pandit, K. V., Milosevic, J., & Kaminski, N. (2011). MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 157(4), 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.01.012>
- Pardali, E., Goumans, M.-J., & ten Dijke, P. (2010). Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends in Cell Biology*, 20(9), 556–567. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.06.006>
- Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G., Gomez-Puerto, M. C., & ten Dijke, P. (2017). TGF-β-induced endothelial-mesenchymal transition in fibrotic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10). <https://doi.org/10.3390/ijms18102157>
- Pardo, A., & Selman, M. (2002). Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 7, d1743-61. <https://doi.org/10.2741/pardo>
- Pardo, A., & Selman, M. (2021). The Interplay of the Genetic Architecture, Aging, and Environmental Factors in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 64(2), 163–172. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0373PS>
- Parsons, C. J., Takashima, M., & Rippe, R. A. (2007). Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 22(SUPPL. 1), 79–84. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04659.x>

- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., & Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, *408*(6808), 86–89. <https://doi.org/10.1038/35040556>
- Pattarayan, D., Thimmulappa, R. K., Ravikumar, V., & Rajasekaran, S. (2018). Diagnostic Potential of Extracellular MicroRNA in Respiratory Diseases. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, *54*(3), 480–492. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8589-9>
- Peng, L., Agogo, G. O., Guo, J., & Yan, M. (2019). Substance P and fibrotic diseases. *Neuropeptides*, *76*(June), 101941. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.101941>
- Phan, S. H. (2002). The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest*, *122*(6 Suppl), 286S–289S. https://doi.org/10.1378/chest.122.6_suppl.286s
- Phan, T. H. G., Paliogiannis, P., Nasrallah, G. K., Giordo, R., Eid, A. H., Fois, A. G., Zinellu, A., Mangoni, A. A., & Pintus, G. (2021). Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *78*(5), 2031–2057. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03693-7>
- Piersma, B., Bank, R. A., & Boersema, M. (2015). Signaling in Fibrosis: TGF- β , WNT, and YAP/TAZ Converge. *Frontiers in Medicine*, *2*, 59. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00059>
- Pottier, N., Maurin, T., Chevalier, B., Puisségur, M. P., Lebrigand, K., Robbe-Sermesant, K., Bertero, T., Cardenas, C. L. L., Courcot, E., Rios, G., Fourre, S., Lo-Guidice, J. M., Marcet, B., Cardinaud, B., Barbry, P., & Mari, B. (2009). Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: Implication in epithelial-mesenchymal interactions. *PLoS ONE*, *4*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006718>
- Raghu, G., Collard, H. R., Egan, J. J., Martinez, F. J., Behr, J., Brown, K. K., Colby, T. V., Cordier, J.-F., Flaherty, K. R., Lasky, J. A., Lynch, D. A., Ryu, J. H., Swigris, J. J., Wells, A. U., Ancochea, J., Bouros, D., Carvalho, C., Costabel, U., Ebina, M., ... Schünemann, H. J. (2011). An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *183*(6), 788–824. <https://doi.org/10.1164/rccm.2009-040GL>
- Raghu, G., Remy-Jardin, M., Myers, J. L., Richeldi, L., Ryerson, C. J., Lederer, D. J., Behr, J., Cottin, V., Danoff, S. K., Morell, F., Flaherty, K. R., Wells, A., Martinez, F. J., Azuma, A., Bice, T. J., Bouros, D., Brown, K. K., Collard, H. R., Duggal,

- A., ... Wilson, K. C. (2018). Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 198(5), e44–e68. <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1255ST>
- Raghu, G., Remy-Jardin, M., Ryerson, C. J., Myers, J. L., Kreuter, M., Vasakova, M., Bargagli, E., Chung, J. H., Collins, B. F., Bendstrup, E., Chami, H. A., Chua, A. T., Corte, T. J., Dalphin, J.-C., Danoff, S. K., Diaz-Mendoza, J., Duggal, A., Egashira, R., Ewing, T., ... Wilson, K. C. (2020). Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis in Adults. An Official ATS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 202(3), e36–e69. <https://doi.org/10.1164/rccm.202005-2032ST>
- Raghu, G., Weycker, D., Edelsberg, J., Bradford, W. Z., & Oster, G. (2006). Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(7), 810–816. <https://doi.org/10.1164/rccm.200602-163OC>
- Rahimi, R. A., & Leof, E. B. (2007). TGF- β signaling: A tale of two responses. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102(3), 593–608. <https://doi.org/10.1002/jcb.21501>
- Ramírez, G., Hagood, J. S., Sanders, Y., Ramírez, R., Becerril, C., Segura, L., Barrera, L., Selman, M., & Pardo, A. (2011). Absence of Thy-1 results in TGF- β induced MMP-9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 91(8), 1206–1218. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.80>
- Redente, E. F., Black, B. P., Backos, D. S., Bahadur, A. N., Humphries, S. M., Lynch, D. A., Tuder, R. M., Zemans, R. L., & Riches, D. W. H. (2021). Persistent, Progressive Pulmonary Fibrosis and Epithelial Remodeling in Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 64(6), 669–676. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0542MA>
- Rodríguez de Castro, F., Carrillo, T., Castillo, R., Blanco, C., Díaz, F., & Cuevas, M. (1993). Relationships Between Characteristics of Exposure to Pigeon Antigens: Clinical Manifestations and Humoral Immune Response. *Chest*, 103(4), 1059–1063. <https://doi.org/https://doi.org/10.1378/chest.103.4.1059>
- Rosas, I. O., Richards, T. J., Konishi, K., Zhang, Y., Gibson, K., Lokshin, A. E., Lindell, K. O., Cisneros, J., Macdonald, S. D., Pardo, A., Scirba, F., Dauber, J., Selman, M., Gochuico, B. R., & Kaminski, N. (2008). MMP1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Medicine*, 5(4), e93. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050093>
- Rosenbloom, J., Macarak, E., Piera-Velazquez, S., & Jimenez, S. A. (2017). *Human Fibrotic Diseases: Current Challenges in Fibrosis Research BT - Fibrosis:*

- Methods and Protocols* (L. Rittié, Ed.; pp. 1–23). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_1
- Roush, S., & Slack, F. J. (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends in Cell Biology*, *18*(10), 505–516. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.07.007>
- Ryu, J. H., Moua, T., Daniels, C. E., Hartman, T. E., Yi, E. S., Utz, J. P., & Limper, A. H. (2014). Idiopathic pulmonary fibrosis: evolving concepts. *Mayo Clinic Proceedings*, *89*(8), 1130–1142. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2014.03.016>
- Saito, A., Suzuki, H. I., Horie, M., Ohshima, M., Morishita, Y., Abiko, Y., & Nagase, T. (2013). An integrated expression profiling reveals target genes of TGF- β and TNF- α possibly mediated by microRNAs in lung cancer cells. *PloS One*, *8*(2), e56587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056587>
- Scaffidi, A. K., Petrovic, N., Moodley, Y. P., Fogel-Petrovic, M., Kroeger, K. M., Seeber, R. M., Eidne, K. A., Thompson, P. J., & Knight, D. A. (2004). α (v) β (3) Integrin interacts with the transforming growth factor beta (TGF β) type II receptor to potentiate the proliferative effects of TGF β 1 in living human lung fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(36), 37726–37733. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403010200>
- Schiller, M., Javelaud, D., & Mauviel, A. (2004). TGF- β -induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *Journal of Dermatological Science*, *35*(2), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2003.12.006>
- Schreier, T., Degen, E., & Baschong, W. (1993). Fibroblast migration and proliferation during in vitro wound healing. A quantitative comparison between various growth factors and a low molecular weight blood dialysate used in the clinic to normalize impaired wound healing. *Research in Experimental Medicine. Zeitschrift Fur Die Gesamte Experimentelle Medizin Einschliesslich Experimenteller Chirurgie*, *193*(4), 195–205. <https://doi.org/10.1007/BF02576227>
- Selman, M., King, T. E., & Pardo, A. (2001). Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Annals of Internal Medicine*, *134*(2), 136–151. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-2-200101160-00015>
- Selman, M., & Pardo, A. (2006). Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *3*(4), 364–372. <https://doi.org/10.1513/pats.200601-003TK>
- Selman, M., Pardo, A., & King, T. E. J. (2012). Hypersensitivity pneumonitis: insights in diagnosis and pathobiology. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *186*(4), 314–324. <https://doi.org/10.1164/rccm.201203-0513CI>

- Selman, M., Ruiz, V., Cabrera, S., Segura, L., Ramírez, R., Barrios, R., & Pardo, A. (2000). TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(3), L562-74. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.3.L562>
- Sgalla, G., Iovene, B., Calvello, M., Ori, M., Varone, F., & Richeldi, L. (2018). Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management. *Respiratory Research*, 19(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0730-2>
- Sokai, A., Handa, T., Tanizawa, K., Oga, T., Uno, K., Tsuruyama, T., Kubo, T., Ikezoe, K., Nakatsuka, Y., Tanimura, K., Muro, S., Hirai, T., Nagai, S., Chin, K., & Mishima, M. (2015). Matrix metalloproteinase-10: a novel biomarker for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 16, 120. <https://doi.org/10.1186/s12931-015-0280-9>
- Stainer, A., Faverio, P., Busnelli, S., Catalano, M., Della Zoppa, M., Marruchella, A., Pesci, A., & Luppi, F. (2021). Molecular Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: State of the Art and Future Directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126255>
- Strieter, R. M., & Mehrad, B. (2009a). New mechanisms of pulmonary fibrosis. *Chest*, 136(5), 1364–1370. <https://doi.org/10.1378/chest.09-0510>
- Strieter, R. M., & Mehrad, B. (2009b). New mechanisms of pulmonary fibrosis. *Chest*, 136(5), 1364–1370. <https://doi.org/10.1378/chest.09-0510>
- Suki, B., Stamenović, D., & Hubmayr, R. (2011). Lung parenchymal mechanics. *Comprehensive Physiology*, 1(3), 1317–1351. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100033>
- Sverzellati, N., Lynch, D. A., Hansell, D. M., Johkoh, T., King, T. E. J., & Travis, W. D. (2015). American Thoracic Society-European Respiratory Society Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias: Advances in Knowledge since 2002. *Radiographics: A Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 35(7), 1849–1871. <https://doi.org/10.1148/rg.2015140334>
- Tang, K., Zhao, J., Xie, J., & Wang, J. (2019). Decreased miR-29b expression is associated with airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 316(4), L621–L629. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00436.2018>
- Tatler, A. L., & Jenkins, G. (2012). TGF- β activation and lung fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(3), 130–136. <https://doi.org/10.1513/pats.201201-003AW>

- Teoh, S. L., & Das, S. (2022). MicroRNAs in Various Body Fluids and their Importance in Forensic Medicine. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 22(18), 2332–2343. <https://doi.org/10.2174/1389557522666220303141558>
- Thuault, S., Valcourt, U., Petersen, M., Manfioletti, G., Heldin, C. H., & Moustakas, A. (2006). Transforming growth factor- β employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Biology*, 174(2), 175–183. <https://doi.org/10.1083/jcb.200512110>
- Todd, N. W., Luzina, I. G., & Atamas, S. P. (2012). Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis and Tissue Repair*, 5(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-11>
- Travis, W. D., Costabel, U., Hansell, D. M., King, T. E. J., Lynch, D. A., Nicholson, A. G., Ryerson, C. J., Ryu, J. H., Selman, M., Wells, A. U., Behr, J., Bouros, D., Brown, K. K., Colby, T. V., Collard, H. R., Cordeiro, C. R., Cottin, V., Crestani, B., Drent, M., ... Valeyre, D. (2013). An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(6), 733–748. <https://doi.org/10.1164/rccm.201308-1483ST>
- Tsitoura, E., Wells, A. U., Karagiannis, K., Lasithiotaki, I., Vasarmidi, E., Bibaki, E., Koutoulaki, C., Sato, H., & Demetrios, A. (2016). *MiR-185 / AKT and miR-29a / Collagen 1a pathways are activated in IPF BAL cells*. 7(46).
- Tsitoura, E., Wells, A. U., Karagiannis, K., Lasithiotaki, I., Vasarmidi, E., Bibaki, E., Koutoulaki, C., Sato, H., Spandidos, D. A., Siafakas, N. M., Sourvinos, G., & Antoniou, K. M. (2016). MiR-185/AKT and miR-29a/collagen 1a pathways are activated in IPF BAL cells. *Oncotarget*, 7(46), 74569–74581. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12740>
- Tzouvelekis, A., & Kaminski, N. (2015). Epigenetics in idiopathic pulmonary fibrosis. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 93(2), 159–170. <https://doi.org/10.1139/bcb-2014-0126>
- Vanderbilt, J. N., Mager, E. M., Allen, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J., Gonzalez, R., & Dobbs, L. G. (2003). CXC chemokines and their receptors are expressed in type II cells and upregulated following lung injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 29(6), 661–668. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0227OC>
- Varga, J., & Abraham, D. (2007). Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 557–567. <https://doi.org/10.1172/JCI31139>

- Varone, F., Iovene, B., Sgalla, G., Calvello, M., Calabrese, A., Larici, A. R., & Richeldi, L. (2020). Fibrotic Hypersensitivity Pneumonitis: Diagnosis and Management. *Lung*, *198*(3), 429–440. <https://doi.org/10.1007/s00408-020-00360-3>
- Vasakova, M., Morell, F., Walsh, S., Leslie, K., & Raghu, G. (2017). Hypersensitivity Pneumonitis: Perspectives in Diagnosis and Management. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *196*(6), 680–689. <https://doi.org/10.1164/rccm.201611-2201PP>
- Vasakova, M., Selman, M., Morell, F., Sterclova, M., Molina-Molina, M., & Raghu, G. (2019). Hypersensitivity Pneumonitis: Current Concepts of Pathogenesis and Potential Targets for Treatment. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *200*(3), 301–308. <https://doi.org/10.1164/rccm.201903-0541PP>
- Vettori, S. (2012). Role of MicroRNAs in Fibrosis. *The Open Rheumatology Journal*, *6*(1), 130–139. <https://doi.org/10.2174/1874312901206010130>
- Volpe, B. T., Sulavik, S. B., Tran, P., & Apter, A. (1991). Hypersensitivity pneumonitis associated with a portable home humidifier. *Connecticut Medicine*, *55*(10), 571–573.
- Vuga, L. J., Ben-Yehudah, A., Kovkarova-Naumovski, E., Oriss, T., Gibson, K. F., Feghali-Bostwick, C., & Kaminski, N. (2009). WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *41*(5), 583–589. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0201OC>
- Wang, K., Ju, Q., Cao, J., Tang, W., & Zhang, J. (2017). Impact of serum SP-A and SP-D levels on comparison and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, *96*(23), e7083. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000007083>
- Wang, X., Cao, L., Wang, Y., Wang, X., Liu, N., & You, Y. (2012). Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review). *Oncology Letters*, *3*(5), 955–960. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.609>
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., Galas, D. J., & Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, *56*(11), 1733–1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
- Weiskirchen, R., Weiskirchen, S., & Tacke, F. (2019). Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Molecular Aspects of Medicine*, *65*(March), 2–15. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.06.003>

- Wells, A. U., & Hogaboam, C. M. (2007). Update in diffuse parenchymal lung disease 2006. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(7), 655–660. <https://doi.org/10.1164/rccm.200701-052UP>
- Willis, B. C., & Borok, Z. (2007). TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(3), L525-34. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00163.2007>
- Willis, B. C., Liebler, J. M., Luby-Phelps, K., Nicholson, A. G., Crandall, E. D., du Bois, R. M., & Borok, Z. (2005). Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 166(5), 1321–1332. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62351-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62351-6)
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11(3), 228–234. <https://doi.org/10.1038/ncb0309-228>
- Wollin, L., Distler, J. H. W., Redente, E. F., Riches, D. W. H., Stowasser, S., Schlenker-Herceg, R., Maher, T. M., & Kolb, M. (2019). Potential of nintedanib in treatment of progressive fibrosing interstitial lung diseases. *The European Respiratory Journal*, 54(3). <https://doi.org/10.1183/13993003.00161-2019>
- Wong, M. H., & Johnson, M. D. (2013). Differential response of primary alveolar type I and type II cells to LPS stimulation. *PloS One*, 8(1), e55545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055545>
- Wootton, S. C., Kim, D. S., Kondoh, Y., Chen, E., Lee, J. S., Song, J. W., Huh, J. W., Taniguchi, H., Chiu, C., Boushey, H., Lancaster, L. H., Wolters, P. J., DeRisi, J., Ganem, D., & Collard, H. R. (2011). Viral infection in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(12), 1698–1702. <https://doi.org/10.1164/rccm.201010-1752OC>
- Wynn, T. A. (2003). IL-13 effector functions. *Annual Review of Immunology*, 21, 425–456. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141142>
- Wynn, T. A. (2007, March 1). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 524–529. <https://doi.org/10.1172/JCI31487>
- Wynn, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. In *Journal of Pathology* (Vol. 214, Issue 2, pp. 199–210). <https://doi.org/10.1002/path.2277>
- Wynn, T. A. (2011). Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *Journal of Experimental Medicine*, 208(7), 1339–1350. <https://doi.org/10.1084/jem.20110551>

- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, 19(2), 156–172. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>
- Yan, H., & Bu, P. (2021). Non-coding RNA in cancer. *Essays in Biochemistry*, 65(4), 625–639. <https://doi.org/10.1042/EBC20200032>
- Yang, G., Yang, L., Wang, W., Wang, J., Wang, J., & Xu, Z. (2015). Discovery and validation of extracellular/circulating microRNAs during idiopathic pulmonary fibrosis disease progression. *Gene*, 562(1), 138–144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.02.065>
- Yang, S., Banerjee, S., de Freitas, A., Sanders, Y. Y., Ding, Q., Matalon, S., Thannickal, V. J., Abraham, E., & Liu, G. (2012). Participation of miR-200 in pulmonary fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 180(2), 484–493. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.10.005>
- Ye, Z., & Hu, Y. (2021). TGF- β 1: Gentlemanly orchestrator in idiopathic pulmonary fibrosis (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 48(1). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4965>
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 17(24), 3011–3016. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>
- Yu, L., Hébert, M. C., & Zhang, Y. E. (2002). TGF- β receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- β responses. *The EMBO Journal*, 21(14), 3749–3759. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf366>
- Zeisberg, E. M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A. L., McMullen, J. R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W. T., Roberts, A. B., Neilson, E. G., Sayegh, M. H., Izumo, S., & Kalluri, R. (2007). Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature Medicine*, 13(8), 952–961. <https://doi.org/10.1038/nm1613>
- Zhang, H., Song, M., Guo, J., Ma, J., Qiu, M., & Yang, Z. (2021). The function of non-coding RNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Open Medicine (Poland)*, 16(1), 481–490. <https://doi.org/10.1515/med-2021-0231>
- Zhang, H. Y., & Phan, S. H. (1999). Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor β (1). *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 21(6), 658–665. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.21.6.3720>
- Zhang, Q., Ye, H., Xiang, F., Song, L.-J., Zhou, L.-L., Cai, P.-C., Zhang, J.-C., Yu, F., Shi, H.-Z., Su, Y., Xin, J.-B., & Ma, W.-L. (2017). miR-18a-5p Inhibits Sub-pleural Pulmonary Fibrosis by Targeting TGF- β Receptor II. *Molecular Therapy*, 25(3), 728–738. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.12.017>

- Zhang, Y., Guo, J., Li, Y., Jiao, K., & Zhang, Y. (2019). let-7a suppresses liver fibrosis via TGF β /SMAD signaling transduction pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 17(5), 3935–3942. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7457>
- Zhang, Z., Sun, H., Dai, H., Walsh, R. M., Imakura, M., Schelter, J., Burchard, J., Dai, X., Chang, A. N., Diaz, R. L., Marszalek, J. R., Bartz, S. R., Carleton, M., Cleary, M. A., Linsley, P. S., & Grandori, C. (2009). MicroRNA miR-210 modulates cellular response to hypoxia through the MYC antagonist MNT. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(17), 2756–2768. <https://doi.org/10.4161/cc.8.17.9387>