



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EXPRESIÓN DE  
METALOPROTEINASAS  
ASOCIADAS A MEMBRANA EN  
FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**BIOL. JORGE ANTONIO GARCÍA  
ÁLVAREZ**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. ANNIE PARDO SEMO**

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradezco a las siguientes instituciones el apoyo brindado para la realización de este trabajo doctoral:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada (registro no. 158201).
- Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por el presupuesto del proyecto PAPIIT 2001-2003.
- Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) por la aportación del material biológico.
- Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.

Así como a los miembros del comité tutorial:

Dra. Annie Pardo Semo.  
Dra. Lourdes Massieu Trigo.  
Dra. Berta Espinoza Gutiérrez.  
Dr. Moisés Selman Lama.

## **Dedicatorias.**

A mi querida, mi amada, mi vida, mi esposa; Claudita te amo.

A mis sueños hechos realidad: Jaircito y mi pequeña Elisa, los amo.

A mi mamá, Georgina Alvarez, te quiero mucho.

A mis hermanos (Juan, Inés, Víctor y Beatriz) y a todos mis sobrinos (en especial a Rafa, Karen, Carlitos y Liz, los quiero mucho).

Todos son una parte muy importante de mi vida.

## **Agradecimientos.**

En ocasiones parece muy cursi el agradecer a medio mundo, pero es que ¡en verdad!, hay personas que por lo menos merecen una mención dentro de estos párrafos.

Quiero agradecer muy especialmente a la Dra. Annie Pardo y al Dr. Moisés Selman. Estos años aprendí muchísimo de ellos y les estoy muy agradecido por todo su apoyo y paciencia ¡Mil gracias!

A todos mis compañeros y amigos de Biología Molecular, Morfología y Fibrosis Pulmonar del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), en especial a: las M. en C. Carina Becerril y Martha Montaña, por su apoyo con los cultivos celulares; al Dr. José Cisneros, por su asesoría en western blot; al Dr. Víctor Ruíz y al Biol. Marco Checa por su ayuda en PCR en tiempo real, a mi amigo el Biol. Rafael Serrano (colega) por su apoyo en la obtención de biopsias y su amistad; a Lupita y a Erika por su ayuda con las preparaciones.

Que decir de mis amigos del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias, UNAM. Gracias a la M. en C. Remedios Ramírez por su ayuda en las inmunohistoquímicas; a la Biol. Sandra Cabrera por sus comentarios y buen humor (aunque a veces se le suba lo doctor); y al Dr. Alfonso Torre, a la M. en C. Isabel de la Cruz y a la Dra. Angélica González; a todos les agradezco su amistad, por hacer muy agradable nuestro ambiente de trabajo.

También a los miembros del jurado: Dr. Ruy Pérez, Dr. Luis Felipe Jiménez, Dr. Gerardo Vázquez, Dra. Bertha Espinoza, Dra. Lourdes Segura y en especial, a la Dra. Lourdes Massieu Trigo.

A la profesora Carlota Estrada Bernal, con quien comenzó la idea de realizar el doctorado con el programa que ella coordinó (Jóvenes hacia la investigación).

A Lilia Espinoza, quien es un ejemplo de paciencia, cordialidad y sobre todo de eficiencia, para toda la universidad.

A mis suegros, Socorro Neria e Ismael Alvarez, quienes han colaborado en gran medida para que mi familia salga adelante.

A la UNAM, por proporcionarme todo lo necesario para realizar mis sueños.

# **ÍNDICE**

## **I. RESUMEN.**

## **II. ABSTRACT.**

## **III. INTRODUCCIÓN.**

3.1 MATRIZ EXTRACELULAR.

3.2 METALOPROTEINASAS DE MATRIZ (MMPs).

3.2.1 Regulación de la actividad de las MMPs.

3.3 METALOPROTEINASAS ASOCIADAS A MEMBRANA (MT-MMPs).

3.3.1 Estructura.

3.3.2 Relación estructura-función.

3.3.3 Función.

3.3.4 Activación de la proMMP-2.

3.3.5 Proteólisis de otros sustratos.

3.4 INHIBIDORES TISULARES DE METALOPROTEINASAS (TIMPs).

3.4.1 Algunos efectos biológicos de los TIMPs.

3.5 FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA (FPI).

3.5.1 Las MMPs en FPI.

## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS.**

4.1 Población de estudio.

4.2 Obtención de fibroblastos.

4.3 Extracción de RNA y transcripción reversa.

4.4 PCR en tiempo real.

4.5 Western blot .

4.6 Zimografía de lavado bronquioalveolar.

4.7 Inmunohistoquímica.

## **V. RESULTADOS.**

- 5.1 Expresión de las MT-MMPs en pulmones normales y con FPI.
- 5.2 Inmunohistoquímica de las MT-MMPs.
- 5.3 Inmunolocalización de la MMP-2 y actividad gelatinolítica en LBA.
- 5.4 Expresión de las MT-MMPs por fibroblastos *in vitro*.
- 5.5 Expresión de los TIMPs en pulmones normales y con FPI.
- 5.6 Inmunohistoquímica para el TIMP-3.
- 5.7 Expresión de los TIMPs por fibroblastos *in vitro*.

## **VI. DISCUSIÓN.**

- 6.1 La MMP-2 en FPI.
- 6.2 Las MT-MMPs tipo I son expresadas en pulmón.
- 6.3 Las MT3- y MT5-MMP se localizan principalmente en células epiteliales.
- 6.4 El TIMP-3 se localiza en focos de fibroblastos en FPI.
- 6.5 El TIMP-3 y MT3-MMP co-localizan en focos de fibroblastos.
- 6.6 La MT3-MMP y el TIMP-3 se sobre-expresan por TGF- $\beta$  en fibroblastos de pulmón.
- 6.7 La sobre-expresión del TIMP-3 podría estar mediada por la vía de señalización de p38 MAPK.

## **VII. CONCLUSIÓN.**

## **VIII. APÉNDICE.**

## **IX. REFERENCIAS.**



## **Lista de abreviaturas utilizadas.**

- FPI: Fibrosis Pulmonar Idiopática
- MMPs: del inglés *Matrix Metalloproteinases* (Metaloproteinasas de Matriz)
- TIMPs: del inglés *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* (Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas)
- PCR: del inglés *Polimerase Chain Reaction* (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
- PCRtr: PCR en tiempo real
- LBA: Lavados Bronquioalveolares
- TGF- $\beta$ : del inglés *Transforming Growth Factor beta* (Factor de crecimiento transformante beta)
- IFN- $\gamma$ : Interferón gamma
- SB: Inhibidor de p38 MAPK SB203580
- PD: Inhibidor de MEK 1/2 PD98059
- MEC: Matriz Extracelular
- GPI: Glicosilfosfatidilinositol
- cDNA: del inglés *Complement Desoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico complementario)
- proMMP2: Metaloproteinasa de matriz-2 latente
- EST: del inglés *Expressed Sequence Tags*
- SI: Secuencia de Inserción
- KDa: Kilodaltones

TNF- $\alpha$ : del inglés *Tumor Necrosis Factor alfa* (Factor de necrosis tumoral alfa)

proTNF- $\alpha$ : TNF- $\alpha$  latente

ADAMs: del inglés *A Desintegrin Metaloproteinases*

cAMP: Adenosinmonofosfato cíclico

EPI: Enfermedades Pulmonares Intersticiales

INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

ATS: del inglés *American Toracic Society* (Sociedad Americana de Tórax)

ERS: del inglés *European Respiratory Society* (Sociedad europea respiratoria)

EDTA: Ácido Etilendiamintetraácetico

SFB: Suero Fetal Bovino

RT-PCR: del inglés *Reverse Transcriptase-PCR* (Transcripción Reversa-PCR)

RT-MMLV: del inglés *Reverse Transcriptase Moloney Murine Leukemia Virus*

RNA: del inglés *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

rRNA: del inglés *ribosomal RNA* (RNA ribosomal)

Ct: del inglés *threshold cycle* (Ciclo umbral)

ERK: del inglés *Extracellular signal-regulated kinases* (quinasas reguladas por señales extracelulares)

PVDF: Polivinilidín difluoruro

SDS-PAGE: Geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio

mRNA: del inglés *messenger RNA* (RNA mensajero)

VEGF: del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor* (Factor de crecimiento vascular endotelial)

JNK: del inglés *c-Jun N-terminal kinase* (cinasa con el extremo amino terminal semejante a c-Jun)

MAPK: del inglés *Mitogen Activated Protein Kinases* (Cinasas Activadas por Mitógenos)

TBRI: Receptor I de TGF- $\beta$

## I. RESUMEN

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) está caracterizada por proliferación de fibroblastos y acumulación de matriz extracelular. Algunas metaloproteinasas de matriz (MMPs) secretadas como la MMP-2, están muy sobre-reguladas en pulmones con FPI. Las MMPs asociadas a membrana (MT-MMPs) junto con algunos inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs), participan en la activación de la pro-MMP2, sin embargo, éstas no han sido analizadas en FPI. Las MT-MMPs con dominio transmembranal tipo I: las MT1-, MT2-, MT3- y MT5-MMP, así como los TIMPs 1, 2, 3 y 4, fueron analizadas por PCR en tiempo real e inmunohistoquímica en FPI y pulmones normales. La MMP-2 fue también inmunolocalizada y evaluada por zimografía de gelatina en fluidos de lavados bronquioalveolares (LBA). Adicionalmente, las MT-MMPs y los cuatro TIMPs fueron examinadas por PCR en tiempo real (PCRtr) en fibroblastos estimulados con factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) 1 e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). La MT1-MMP fue la que se expresó en mayor cantidad, seguida por la MT2- y la MT5-MMP, y una expresión moderada de MT3-MMP. Con respecto a su localización, las MT1- y MT2-MMP fueron encontradas en células epiteliales alveolares; la MT3-MMP en fibroblastos, dentro de focos de fibroblastos y células epiteliales alveolares, y la MT5-MMP en células epiteliales bronquiolares basales y en áreas de metaplasia escamosa. La MMP-2 fue localizada en células epiteliales bronquiolares basales y fibroblastos, y la

enzima activa, se observó incrementada en fluidos de LBA. El TIMP-3 fue localizado en lámina elástica, células endoteliales y fibroblastos ubicados dentro de los sitios denominados focos de fibroblastos. En fibroblastos de pulmón, TGF- $\beta$ 1 induce una sobre-regulación muy fuerte en la MT3-MMP y el TIMP-3 tanto a nivel de gene como de proteína. Este efecto fue bloqueado por genisteína, un inhibidor de proteínas cinasas de tirosina y parcialmente reprimido por SB203580 un inhibidor de la p38 MAPK. El IFN- $\gamma$  no tuvo ningún efecto. Las MT-MMP tipo I son expresadas en FPI, en los mismos tipos celulares que MMP2; en su mayoría por diferentes tipos de células epiteliales, las cuales son un componente clave en la remodelación aberrante del micro-ambiente pulmonar. De manera interesante, la MT3-MMP y TIMP-3 que fueron encontradas en focos de fibroblastos, también se encontraron sobre-reguladas *in vitro* por TGF- $\beta$ 1, un potente mediador pro-fibrótico.

## II. ABSTRACT

The Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is characterized by fibroblast proliferation and extracellular matrix accumulation. Some secreted matrix metalloproteinases (MMPs) as the MMP-2 are highly up-regulated in IPF lungs. The Membrane Type MMPs (MT-MMPs) together with some Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs), participate in the activation of the pro-MMP2. However, they have not been examined in IPF. Type I transmembrane MT-MMPs, MT1 -, MT2 -, MT3 - and MT5-MMP, as well TIMPs 1, 2, 3 and 4, were analyzed by real-time PCR and immunohistochemistry in IPF and normal lungs. The MMP2 was also immunolocalized and evaluated by gelatin zymography in bronchoalveolar lavage (BAL). Additionally, the MT-MMPs and the four TIMPs were examined by real time-PCR in lung fibroblasts stimulated with Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )1 and Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). MT1-MMP, was the most highly expressed followed by MT2 - and MT5-MMP, and a moderate expression of MT3-MMP. Regarding their localization, MT1 - and MT2-MMP were found in alveolar epithelial cells, MT3-MMP in fibroblasts from fibroblastic foci and alveolar epithelial cells and the MT5-MMP in basal bronchiolar epithelial cells and in areas of squamous metaplasia. MMP2 was localized in alveolar and basal bronchiolar epithelial cells and fibroblasts, and increased active enzyme was observed in BAL fluids. TIMP-3 was observed in elastic lamina, endothelial cells and fibroblasts which were present in the fibroblastic foci. In lung fibroblasts, TGF- $\beta$ 1 induced a strong upregulation of

MT3-MMP and TIMP-3, both at the gene and protein level. This effect was blocked by genistein, a protein tyrosin kinases inhibitor and partially repressed by SB203580 a p38 MAPK inhibitor. IFN- $\gamma$  had no effect. Type I MT-MMP are expressed in IPF, in the same cell types as MMP2. Mostly by different types of epithelial cells a pivotal component in the aberrant remodeling of the lung microenvironment. Interestingly MT3-MMP and TIMP-3 were found in fibroblastic foci and they were upregulated in vitro by TGF- $\beta$ 1 a potent profibrotic mediator.

### **III. INTRODUCCIÓN.**

#### **3.1 MATRIZ EXTRACELULAR.**

La matriz extracelular (MEC) determina la histoarquitectura específica de cada órgano e interactúa con las células dándoles andamiaje mecánico y a la vez ejerciendo un efecto determinante sobre diversas funciones celulares como por ejemplo la proliferación, la diferenciación, la migración y la muerte celular.

La MEC está conformada por una gran variedad de moléculas las cuales interaccionan entre sí generando una estructura tridimensional a la cual las células se adhieren, ya sea por receptores específicos o por ligandos. Las macromoléculas que constituyen la MEC incluyen, entre otras, a la familia de las colágenas que son las responsables de la resistencia mecánica de los tejidos conjuntivos, la elastina que le confiere cualidades de flexibilidad y elasticidad, proteínas de adhesión como fibronectinas y lamininas, y los proteoglicanos que son esenciales para la adhesividad (1).

La MEC no es estática, por el contrario, existe una remodelación constante de la misma, lo cual implica tanto la síntesis de las moléculas de matriz, como la degradación por proteasas específicas como las metaloproteasas de matriz (MMPs) (2-3). Esta degradación de la MEC es un importante evento en el desarrollo, morfogénesis y reparación tisular y está finamente regulada en estos procesos fisiológicos. Por el contrario, una remodelación



desequilibrada de la MEC se ha asociado con diferentes procesos patológicos.

El conocimiento relacionado con el número y tipo de moléculas que constituyen la matriz y las funciones que desempeñan en condiciones fisiológicas, así como su papel en algunas enfermedades hereditarias o adquiridas ha aumentado en los últimos años. Actualmente se conoce que la artritis reumatoide, la cirrosis hepática, la fibrosis pulmonar, la invasividad de algunos cánceres, el daño pulmonar agudo, y la aterosclerosis entre otras, representan condiciones patológicas en las cuales existen alteraciones tanto celulares como de diferentes moléculas de la MEC (3).

### **3.2 METALOPROTEASAS DE MATRIZ (MMPs).**

Las proteasas se clasifican con base a los siguientes tres criterios: 1) tipo de reacción que catalizan, 2) naturaleza química del sitio catalítico y 3) relación evolutiva con respecto a su estructura. Además dependiendo de su sitio de acción se dividen en dos grandes grupos: exopeptidasas y endopeptidasas.

Las endopeptidasas se caracterizan porque su acción catalítica es sobre enlaces peptídicos en regiones internas de la cadena polipeptídica, lejos de los grupos amino o carboxilo terminal. Dependiendo de los grupos funcionales del sitio activo las endopeptidasas se subdividen en proteasas de serina, de aspartato, de cisteína y metaloproteasas.

Adicionalmente, tomando en consideración los dominios estructurales, las proteasas se clasifican en diferentes familias, y se subdividen en “clanes” agrupando a las proteasas que han divergido de un ancestro común (4).

La familia de las MMPs comprenden 25 diferentes miembros, que en el caso de los humanos están representados por 24 productos génicos y 23 enzimas (Tabla 1). Las MMPs son enzimas secretadas o que están ancladas a la superficie celular, de esta manera su actividad catalítica queda confinada a la superficie celular o al espacio extracelular. Para ser clasificada como una MMP, una proteína necesita tener al menos dos dominios conservados:

- *pro-dominio*: típicamente de 80 aminoácidos y con una secuencia consenso PRCXXPD (donde X denota cualquier aminoácido). La excepción a la regla es la MMP-23, en la cual el residuo de cisteína está ubicado en una secuencia de aminoácidos distinta.
- *Dominio catalítico*: tiene aproximadamente 170 aminoácidos y contiene un sitio activo,  $Zn^{2+}$ , que se une a tres histidinas conservadas en la secuencia HEXXHXXGXXHS/TXXXXXM, también contiene una metionina conservada en el lado carboxilo del sitio de unión al zinc. En el estado inactivo, el residuo conservado de cisteína en el pro-dominio provee el cuarto sitio de coordinación para el ión zinc, y la ruptura de este puente es necesaria para la actividad de la enzima.

TABLA 1

<b>Clasificación</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Otros nombres</b>	<b>Sustratos</b>
MMP-1	Colagenasa 1	Colagenasa intersticial	Colágenas fibrilares tipo I y II
MMP-2	Gelatinasa A	Gelatinasa de 72 kDa	CCL7, CXCL12
MMP-3	Estromelisinina 1	Transina 1	E-cadherina, laminina, colágena tipo IV, TGF- $\beta$ latente
MMP-7	Matrilisinina 1	PUMP	Pro- $\alpha$ -defensinas, ligando FAS, pro TNF- $\alpha$ , Sindecán 1, E-cadherina, elastina
MMP-8	Colagenasa 2	Colagenasa de neutrófilos	CXCL5 de ratón
MMP-9	Gelatinasa B	Gelatinasa de 92 kDa	$\alpha$ 1-antiproteinasas, TGF- $\beta$ 1 latente, VEGF latente, Fibrina, Proteoglicano NG2
MMP-10	Estromelisinina 2	Transina 2	No determinado
MMP-11	Estromelisinina 3		No determinado
MMP-12	Metaloelastasa		TNF- $\alpha$ latente
MMP-13	Colagenasa 3	Colagenasa de rata	Colágenas fibrilares tipo I y II.
MMP-14	MT1-MMP		proMMP-2, colágenas fibrilares, fibrina, sindecán 1, subunidad $\alpha$ 2 de laminina 5
MMP-15	MT2-MMP		Fibrina
MMP-16	MT3-MMP		Fibrina y sindecán 1
MMP-17	MT4-MMP		No determinado
MMP-18	Colagenasa 4*		No determinado
MMP-19			No determinado
MMP-20	Enamelisinina		Amelogenina
MMP-21			No determinado
MMP-22			No determinado
MMP-23	CA-MMP		No determinado
MMP-24	MT5-MMP		No determinado
MMP-25	MT6-MMP	Leucolisina	No determinado
MMP-26	Matrilisinina 2		No determinado
MMP-27			No determinado
MMP-28	Epilisinina		No determinado

Clasificación de las MMPs. Dentro de esta tabla no se encuentran MMP-4, MMP-5 o MMP-6, las cuales se clonaron en otras especies y fueron redundantes en humano (en realidad, estas eran MMP-2 ó MMP-3). \*Colágenasa 4 fue aislada de *Xenopus* y su homólogo en mamíferos no se ha encontrado.

Además de estos dominios, existen otros más específicos:

- *Dominio tipo hemopexina*: Este dominio se encuentra hacia el carboxilo terminal (aproximadamente 210 aminoácidos). En el caso de las colagenasas, éste dominio es indispensable para el corte de la triple hélice de las colágenas intersticiales.
- *Sitio de activación por furinas*: La MMP11, las MT-MMPs, la *Xenopus* MMP y la MMP-23 tienen una secuencia RX/RKR en el extremo carboxilo terminal del propéptido que se asocia con el procesamiento intracelular de estas proenzimas por convertasas de tipo furina.
- *Dominio de unión a gelatina*: Este dominio contiene tres módulos tipo fibronectina (también conocidos como módulos fibronectina tipo II) y están presentes en el dominio catalítico tanto de MMP-2 como de MMP-9.
- *Dominios transmembranales*: los cuales tienen la función de unir a las MT-MMPs a la membrana celular. Existen tres tipos: dominio transmembranal tipo I, tipo II y dominio de unión por glicosilfosftidilinositol (GPI) que se explicarán mas adelante.
- *Dominio “conjunto de cisteína” y tipo inmunoglobulina-C2*: ambos se encuentran en la MMP-23. El primero se encuentra en el dominio catalítico y consiste de dos cisteínas que se encuentran dentro de la

- secuencia **CLVSAVHHC** y que al parecer forman un puente disulfuro; el dominio tipo inmunoglobulina se encuentra en el extremo carboxilo terminal, con la ausencia del dominio tipo hemopexina. En ambos casos se desconoce la función, aunque se postula que sirven para darle especificidad a la enzima en cuanto a afinidad a ciertos sustratos y susceptibilidad hacia algunos inhibidores (figura 1).

La presencia de estos dominios y la afinidad por sustratos, ha dado pie a la siguiente clasificación de la familia de las MMPs:

*Matrilisinas:* Poseen los dominios básicos de las MMPs (pro-dominio y dominio catalítico). La Matrilisina-1 (MMP-7) y la Matrilisina-2 (MMP-26), también llamada endometasa, se encuentran en este subgrupo. Además de degradar componentes de la MEC, la Matrilisina-1 procesa moléculas de superficie celular como las Pro- $\alpha$ -defensinas, el Ligando de FAS, el pro-TNF- $\alpha$  y la E-cadherina (5-6).

*Colagenasas:* Se encuentran en este grupo cuatro miembros, la colagenasa-1 (MMP-1), la colagenasa-2 (MMP-8), la colagenasa-3 (MMP-13) y la colagenasa-4 (MMP-18, encontrada en *Xenopus*). La característica principal de estas enzimas es su capacidad de cortar colágenas intersticiales I, II y III en un sitio específico del amino terminal (a tres cuartas partes del carboxilo terminal) (7-8). También tienen la capacidad de procesar a otras moléculas tanto de la MEC como de sitios ajenos a ella.

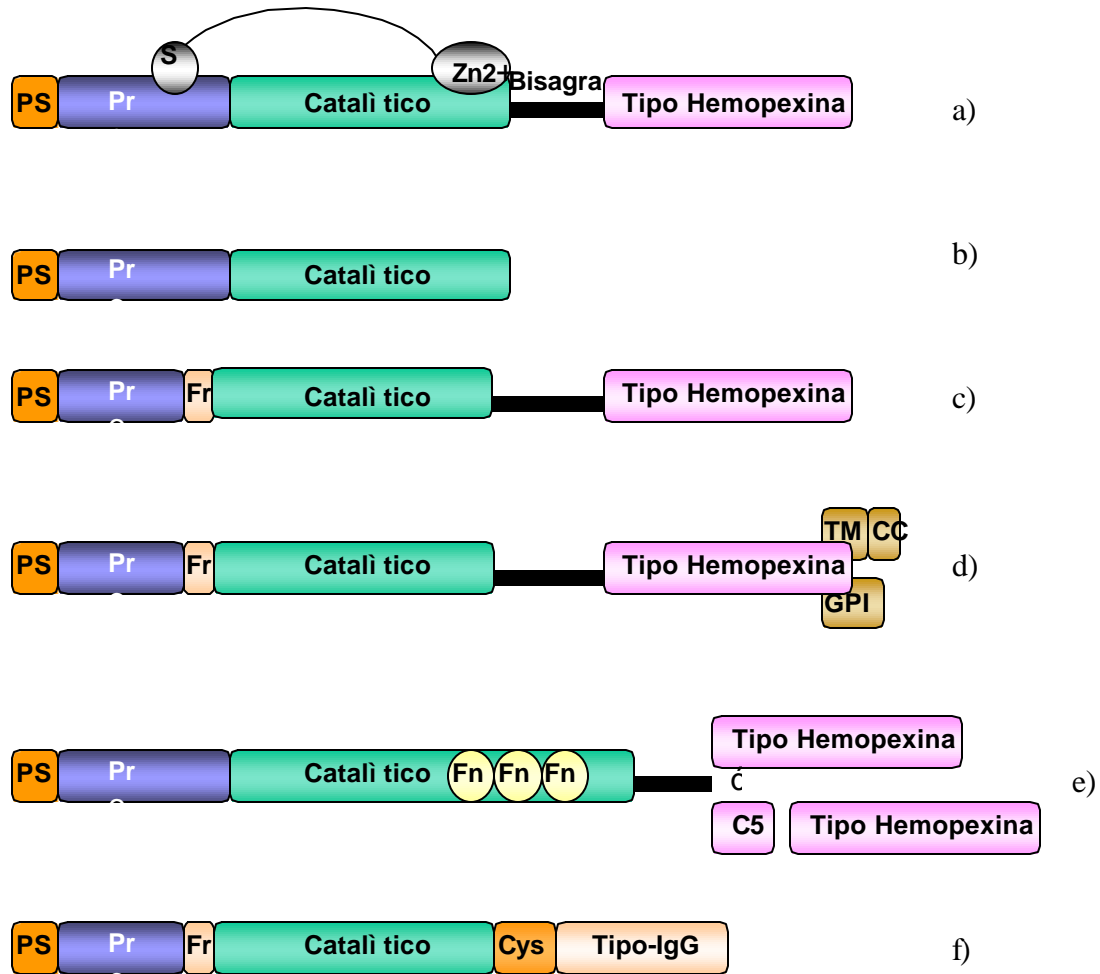


Figura 1. Estructura de los dominios de las MMPs. PS, péptido señal; Pr, propéptido; Fr, dominio tipo Furina; TM, dominio transmembranal; CC, cola citoplásmica; GPI, unión a membrana por glicosilfosfatidilinositol; C5, dominio semejante a colágena tipo V; Fn, dominio semejante a fibronectina; Cys, dominio "conjunto de cisterna"; Tipo-IgG, dominio semejante a Inmunoglobulina G; S, grupo tiol (el cual forma el sitio de coordinación con el zinc [Zn<sup>2+</sup>] para que la enzima se mantenga inactiva). Al grupo a) pertenecen las MMPs 1, 3, 8, 10, 12, 13, 18, 19, 20, 22 y 27; b) MMPs 7 y 26; c) MMPs 11 y 28; d) TM: MMPs 14, 15, 16 y 24, y GPI: MMPs 17 y 25; e) MMPs 2 y 9; f) MMP-23.

*Gelatinasas:* La Gelatinasa A (MMP-2) y la Gelatinasa B (MMP-9) son los miembros de este subgrupo. Se les llama de esta manera debido a su capacidad para procesar a la colágena desnaturalizada (gelatina). Estas enzimas tienen tres inserciones de dominios fibronectina tipo II en el dominio catalítico, los cuales se unen a gelatina, colágena y laminina (9). La MMP-2 digiere colágenas tipo I, II y III aunque con baja afinidad, mientras que la MMP-9 no es capaz de hacerlo (10-11), ambas digieren colágena tipo IV característica de membranas basales. Aunque el ratón *knockout* de la MMP-2 se desarrolla sin anomalías aparentes, las mutaciones en la MMP-2 humana, que dan como resultado la ausencia de la enzima activa, está ligada a una forma autosómica recesiva de osteolisis multicéntrica, una alteración genética rara que causa destrucción y reabsorción de los huesos afectados (12), lo cual sugiere que MMP-2 en humanos es importante para la osteogénesis.

*Estromelisin:* Tanto la estromelisin 1 (MMP-3) como la estromelisin-2 (MMP-10) tienen especificidad similar de sustratos. Ambas procesan componentes de la MEC, pero la MMP-3 tiene la capacidad de activar las proenzimas de algunas MMPs, por ejemplo su acción sobre la MMP-1 parcialmente procesada es crítica para la generación de la enzima totalmente activa (13). La estromelisin-3 (MMP-11) tiene una estructura y afinidad a sustratos diferentes de los otros dos miembros y por ello se le agrupa frecuentemente en un grupo denominado "otras MMPs".

*Metaloproteinasas asociadas a membrana (MT-MMPs):* Son seis los miembros que pertenecen a este subgrupo; cuatro son proteínas transmembranales tipo I (MMP-14, MMP-15, MMP-16 y MMP-24) y dos son proteínas ancladas por glicosilfosfatidilinositol (-GPI; MMP-17 y MMP-25). Con la excepción de la MT4-MMP, todas son capaces de activar a la proMMP-2. También tienen la capacidad de degradar componentes de la MEC y la MT1-MMP tiene actividad colagenolítica sobre colágenas tipo I, II y III (14). Mas adelante se hará una revisión mayor sobre esta subfamilia de MMPs.

*Otras MMPs:* Siete MMPs no han podido ser clasificadas en alguno de los subgrupos anteriores. Estas enzimas incluyen a la metaloelastasa (MMP-12) ampliamente expresada en macrófagos (15) esencial en la migración de los mismos (16). La MMP-19 que fue clonada en cDNA de hígado (17), y como un autoantígeno derivado de células-T de pacientes con artritis reumatoide (18). La enamelisina (MMP-20), que digiere amelogenina y que está localizada principalmente en el esmalte de los dientes recién formados. La enfermedad amelogénesis imperfecta es una alteración genética causada por formación defectuosa del esmalte, y es debida a mutaciones en sitios de corte de MMP-20 (19). La MMP-22 fue clonada inicialmente de fibroblastos de pollo (20), y un homólogo humano fue identificado en la base de secuencias EST. La función de esta enzima es desconocida. La MMP-23 también llamada CA-MMP es expresada principalmente en tejidos reproductivos (21). Esta enzima carece del interruptor de cisteína en el



prodominio, también carece de dominio tipo hemopexina; en contraparte, tiene un dominio rico en cisteína y un dominio tipo inmunoglobulina. Se ha propuesto a esta enzima como una proteína de membrana tipo II con la parte transmembranal en la parte amino terminal del propéptido. Debido a que tiene un sitio de reconocimiento tipo furina en el propéptido, es procesada en el aparato de Golgi y liberada como una enzima activa en el espacio extracelular (22). El último miembro que se añadió a la familia de las MMPs es la epilisina o MMP-28, expresada principalmente en queratinocitos (23-24). Los patrones de expresión en piel dañada e intacta sugieren que la MMP-28 puede funcionar en la hemostasis tisular y en cicatrización (23-25).

### **3.2.1 Regulación de la actividad de las MMPs.**

La actividad catalítica de las MMPs es regulada en cuatro diferentes niveles: a) expresión génica, b) compartimentalización (acumulación pericelular de enzimas), c) activación de la pro-enzima y d) inactivación ó inhibición; la actividad también es dependiente de la disponibilidad y afinidad por el sustrato.

La mayoría de las MMPs se expresan en niveles no detectables en condiciones basales normales y son inducibles por diversos factores de crecimiento, quimiocinas y/o citocinas. La transcripción de cada MMP se regula independientemente y cada tipo celular tiene un fenotipo proteolítico en respuesta a estímulos variados. La misma MMP puede ser

transcripcionalmente inducida o reprimida por diferentes agentes dependiendo del tipo celular o de las condiciones normales o patológicas como en el caso de células tumorales o células epiteliales en procesos aberrantes como la FPI. En este contexto, se puede señalar que la expresión de las MMPs es célula y tejido específica, y temporalmente variable (26).

La compartimentalización (donde y como una MMP es liberada y retenida) es igualmente un mecanismo importante para regular la especificidad de la proteólisis tanto como la afinidad de la interacción enzima-sustrato. Un concepto importante es que las células no liberan proteasas indiscriminadamente. Las MMPs solubles son susceptibles de anclarse a la membrana, manteniendo una concentración alta de enzima localmente y dirigiendo su actividad catalítica hacia sustratos específicos en el espacio pericelular. Como ejemplos se encuentran la unión de la MMP-2 a  $\alpha_v\beta_3$ -integrina (27), la MMP-1 a  $\alpha_2\beta_1$ -integrina (27-28), la MMP-9 al CD44 (29) y la MMP-7 a los proteoglicanos de superficie (30-31).

Otro aspecto importante de regulación incluye la activación de zimógenos. Las MMPs que se activan extracelularmente, se mantienen en estado latente por la interacción entre el grupo tiol del residuo de cisteína en el prodominio y el ión zinc del dominio catalítico y pasan al estado activo mediante la ruptura de esta interacción, la cual puede realizarse por proteólisis del prodominio ó por modificación del grupo tiol de la cisteína. Por otro lado, hay MMPs que se activan intracelularmente por acción sobre una secuencia

blanco para convertidas de pro-enzimas o furinas. El mecanismo de activación más descrito para las MMPs por una vía diferente de las furinas es la activación de la proMMP-2 por la MT1-MMP activa.

### **3.3 METALOPROTEINASAS ASOCIADAS A MEMBRANA (MT-MMPs).**

Las MT-MMPs son una subfamilia de las MMPs como ya se había mencionado anteriormente; desde la clonación del primer miembro (MT1-MMP) en 1994, se han identificado cinco miembros adicionales (MT2-, MT3-, MT4-, MT5- y MT6-MMP) (32-39). Las MT1-, MT2-, MT3- y MT4-MMP fueron clonadas utilizando iniciadores *degenerados* diseñados hacia dominios bien caracterizados de MMPs. Las otras fueron clonadas en base al examen de secuencias EST (del inglés *Expressed Sequence Tags*) con homología tipo MMP ó de datos recopilados de proyectos de secuenciación genómica. Las MT-MMP se expresan de manera diferencial en muchos tejidos y en general, se han utilizado los siguientes criterios para identificarlas y definir las:

- a) homología en secuencia y estructura con la MT1-MMP, b) localización en la membrana celular, c) activación específica de la proMMP-2 *in vitro* y d) distinción específica por el TIMP-2. Aunque algunas de las MT-MMPs no reúnen todos los criterios mencionados y tienen algunas características adicionales, estos criterios ayudan a determinar a esta subfamilia de las MMPs.

### 3.3.1 Estructura

Estructuralmente, las MT-MMPs son similares a las MMPs en sus dominios básicos: tienen secuencia señal, un dominio propeptídico, un dominio catalítico con su sitio de unión al zinc y un dominio tipo hemopexina. Además de estos dominios, las MT-MMPs poseen tres secuencias de inserción (SI-1, SI-2 y SI-3); la primera (SI-1) es el *sitio de activación por furinas* el cual es casi exclusivo de este grupo y se encuentra en el carboxilo terminal del dominio propeptídico y el amino terminal del dominio catalítico (Figura 1). Este sitio puede ser activado proteolíticamente por convertasas tipo furina u otras convertasas de proproteínas (40). La SI-2 está localizada en el dominio catalítico y difiere entre las MT-MMPs. La SI-3 es la que contiene los dominios transmembranal y citoplásmico y también difiere entre las MT-MMPs. Una distinción adicional entre las MT-MMPs es que MT4- y MT6-MMP han mostrado anclarse a la membrana por GPI, mientras que las otras tienen su dominio transmembranal y su cola citoplásmica (41-42). En adelante, estas secuencias las denominaré motivos.

### 3.3.2 Relación estructura-función.

*Motivo SI-1.* Este motivo puede desempeñar un papel en la activación de las MT-MMPs. Parece que la MT1-MMP puede ser activada intra o extracelular vía una ruta convertasa dependiente ó independiente (40, 43). El mecanismo de activación de MT1-MMP puede ser específico para cada tipo celular (40). Algunos reportes corroboran que el motivo SI-1 es

necesario para el procesamiento de MT1-MMP (44) y la activación de proMMP-2, mientras que otros reportes indican procesamiento independiente de furinas y activación de MT1-MMP en la membrana de manera extracelular (40, 43, 45-46). Existe además una secuencia de cinco aminoácidos que se encuentra en el dominio propeptídico hacia el amino terminal que puede ser esencial para la función de la enzima (46). La evidencia de Cao y colaboradores demostró que esta secuencia cercana al motivo S1-1 puede funcionar manteniendo la conformación de la proteína, la cual funcionaría como una chaperona molecular (43). Utilizando células COS-1 y comparando células silvestres con mutantes con ausencia del propeptido, o la fracción de cinco aminoácidos cercanos al motivo S1-1 de la MT1-MMP, se obtuvo evidencia de que el prodominio es requerido para la activación y localización de la enzima. Al realizar co-transfección del prodominio con cDNA de MT1-MMP sin el prodominio, se observó reconstitución de la función, pero no al 100% del *silvestre* (medido por activación de proMMP-2).

*Motivo IS-2.* Este motivo puede desempeñar un papel muy importante en la activación de proMMP-2 por las MT-MMPs. La activación de proMMP-2 por MT1-MMP activa ocurre en la superficie de la célula y, como se menciona anteriormente, la activación de proMMP-2 ha sido utilizada para caracterizar a las otras MT-MMPs. Parece que, mientras la MT2-MMP asociada a las células de ratón activa a la proMMP-2, la MT2-MMP humana no lo hace. Paradójicamente, la MT2-MMP humana, soluble y recombinante, ha

mostrado activar proMMP-2 así como degradar componentes de la matriz (47-48). La sustitución de dos aminoácidos dentro del motivo SI-2 de la secuencia de humano con la secuencia de ratón, restaura la activación de proMMP-2 mediada por la unión a membrana celular en una quimera ratón/humano (49). Utilizando esta proteína quimérica de ratón/humano, se demostró que el requisito de aminoácidos necesario para la activación de proMMP-2, reside entre el residuo 155 y el 271 de la MT2-MMP. Basados en estos estudios, Miyamori y colaboradores (49), sugieren que el motivo SI-2 puede tener un potencial papel en la activación en la superficie celular de MT2-MMP.

*Motivo SI-3.* Abarca la parte transmembranal y la cola citoplásmica y es requerido para localización celular en "invadopodios" (estructuras que se forman como invaginaciones de la membrana celular) (50), aunque un reporte sugiere que la valina carboxilo terminal, en el carboxilo terminal citoplásmico es necesaria para el tráfico correcto (51). En otro reporte utilizaron mutantes de la MT1-MMP carentes del carboxilo terminal y concluyeron que la valina y los cinco aminoácidos adyacentes no intervienen en la localización; sin embargo, el corte adicional de 10 a 11 aminoácidos de la cola citoplásmica afecta la localización de MT1-MMP a la membrana (52). Existen tres sitios potenciales de fosforilación dentro de la cola citoplásmica de la MT1-MMP, localizados en Thr567, Tyr573 y Ser577. La Ser577 fue incluida en mutantes con pérdidas y no tuvo efecto sobre la localización de la MT1-MMP; sin embargo, los otros sitios fueron incluidos en las mutantes y

estos sí afectaron la localización de la MT1-MMP a la membrana plasmática (53). Posiblemente en el futuro, se obtendrán experimentos que analicen el papel de la cola citoplásmica en procesos de señalización. El análisis de la secuencia de aminoácidos muestra que las MT4- y MT6-MMP difieren en el motivo SI-3. Además, se ha demostrado que ambas enzimas se adhieren a la membrana plasmática mediante anclaje por GPI (41-42).

### **3.3.3 Función.**

El desarrollo del ratón *knockout* de la MT1-MMP ha ayudado a elucidar el papel potencial de esta enzima durante el desarrollo, morfogénesis tisular y angiogénesis. Los ratones deficientes en MT1-MMP mueren a las tres semanas de edad cuando se crían en una cepa consanguínea ó entre 50 y 90 días utilizando una cepa no-consanguínea (53-54). El ratón muestra severas anomalías en el desarrollo esquelético y ausencia de respuesta angiogénica a la aplicación del bFGF en ensayos de angiogénesis corneal. Además, es deficiente en la activación de la proMMP-2 (54). Existe evidencia adicional en las funciones que involucran a la MT1-MMP en procesos de neovascularización (55-56).

Por otro lado, el ratón *knockout* de la MT5-MMP nace sin anomalías morfológicas evidentes y sin defectos histológicos aparentes en el sistema nervioso. Sin embargo, el ratón MT5-MMP *-/-* no desarrolla dolor neuropático y la ausencia de dicho dolor es ocasionado por un defecto en el sistema nervioso. Este estudio fue realizado, comparando ratones silvestres

con *knockout*. A ambos, se les realizó la ligación del nervio *siático*, lo cual es denominado como *allodynia mecánica*. Posterior a dicho estímulo, sucedió lo siguiente: a) en el ratón silvestre se indujo la reorganización estructural de las fibras nerviosas en la espina dorsal, gracias a la plasticidad de las neuronas dañadas y b) en el ratón MT5-MMP *-/-* no sucede dicha reorganización; por esta razón, los autores sugieren que la MT5-MMP desempeña un papel importante en la progresión de esta patología, posiblemente participando en la plasticidad neuronal (57).

#### **3.3.4 Activación de proMMP-2.**

Mucho es el trabajo que se ha realizado en relación a la activación de la proMMP-2 por la MT1-MMP desde que se clonó este receptor de la MMP-2. La proMMP-2 se ha detectado en la superficie celular teniendo interacción con el TIMP-2 unido a la MT1-MMP. Los modelos describen que la proMMP-2 se ha unido en una proximidad cercana a TIMP-2 libre y MT1-MMP activa, y es activada mediante un proceso de dos pasos (Figura 2). Imai y colaboradores demostraron que la MT1-MMP es secretada en complejo con TIMP-2 (58), y también mostraron por primera vez que la MT1-MMP tiene actividad gelatinolítica por sí misma. A partir de estos estudios se realizaron una serie de investigaciones encaminadas a comprender mejor este mecanismo y su interacción con el complejo MT1-MMP/TIMP-2. Se demostró que el carboxilo terminal del TIMP-2 une al



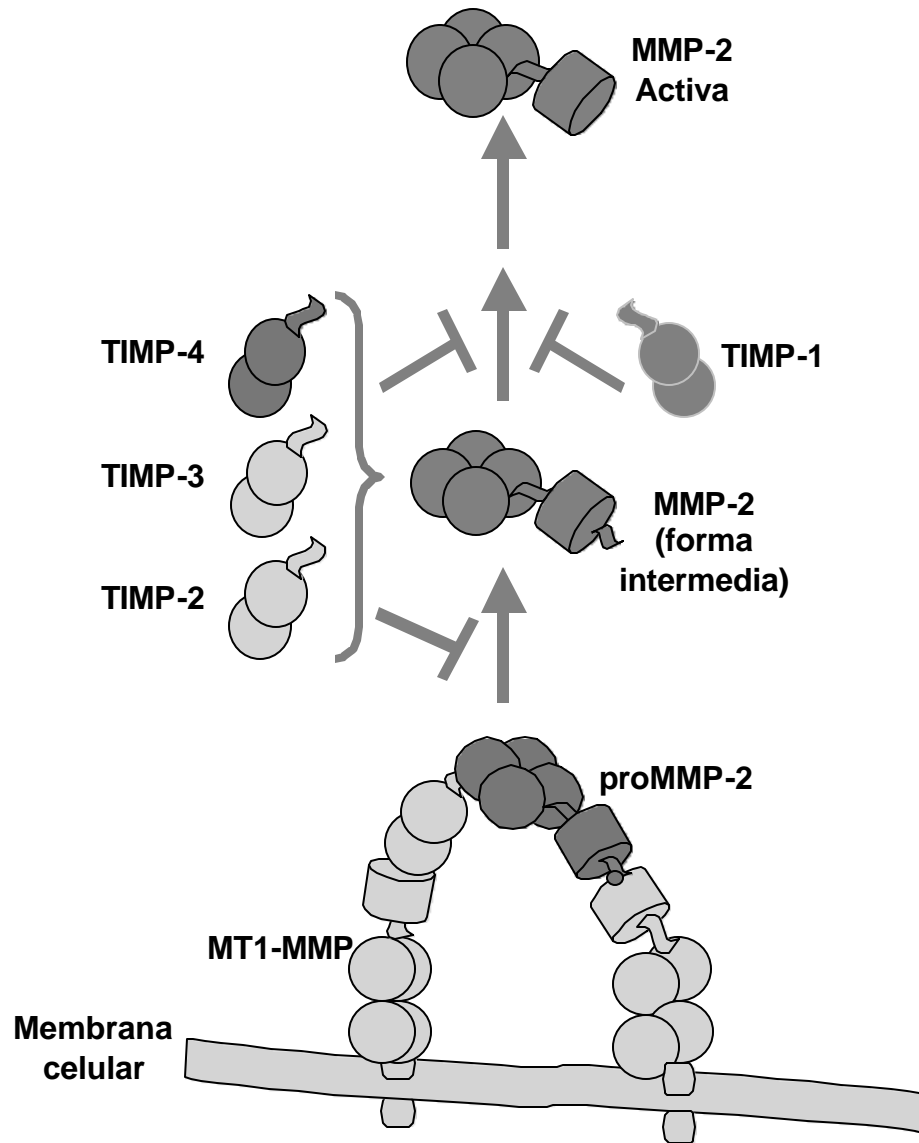


Figura 2. Modelo de activación de proMMP2. Este proceso se realiza por la formación de un complejo trimolecular formado por MT1-MMP, TIMP-2 y proMMP-2. El extremo N-terminal de MT1-MMP interactúa con el N-terminal de TIMP-2, formando un "receptor", sobre el cual proMMP-2 se une. ProMMP-2 es inicialmente cortada a su forma intermedia por una MT1-MMP activa que se encuentra adyacente. El segundo estado de procesamiento que resulta en la forma completamente activa, involucra un evento autocatalítico.

dominio tipo hemopexina de la MMP-2 (59), mientras que el TIMP-2 se une al dominio catalítico de la MT1-MMP (60). Otros experimentos utilizando mutantes de cDNA y líneas celulares derivadas de ratones TIMP-2 *-/-*, mostraron que la activación de la proMMP-2 por la MT1-MMP requiere TIMP-2 *in vivo* e *in vitro* (61-62). La ausencia del TIMP-2 da como resultado un procesamiento rápido de la MT1-MMP a una forma inactiva de 44 kDa (63), la cual se acumula en la superficie celular como un producto de degradación (59). Por lo tanto, el TIMP-2 también regula la cantidad de la MT1-MMP activa sobre la superficie celular (63).

Se ha demostrado que la MT1-MMP unida al TIMP-2 en complejo resulta en decremento en el recambio autocatalítico intermolecular de la MT1-MMP activa (57 kDa) y resulta en acumulación de la forma activa en la superficie celular (61). El TIMP-2 se une a la superficie celular, donde se internaliza y se degrada, y esto es dependiente de la MT1-MMP (64). Aunque las mutantes de la MT1-MMP sin el carboxilo terminal pueden llegar a activar a la proMMP-2 (65), el dominio transmembranal con la cola citoplásmica es necesario para su localización en la membrana (50, 52). Una vez que la MT1-MMP se une al TIMP-2 y activa la MMP-2, la MT1-MMP es autocatalíticamente procesada a una forma inactiva de 44 kDa (64).

### **3.3.5 Proteolisis de otros sustratos.**

Las MT1-, MT2- y MT3-MMP muestran actividad proteolítica *in vitro* sobre un amplio rango de moléculas incluyendo a la fibronectina, la

vitronectina, la laminina, la tenascina, los proteoglicanos, las colágenas y otras moléculas de MEC (47, 58, 65, 66). Además de la activación de proMMP-2, en estudios realizados con recombinantes sin el dominio transmembranal, se observó el procesamiento de la colagenasa 3. La importancia de este hallazgo es que las MT-MMPs pueden ser capaces de mediar la activación de varias MMPs, lo cual podría ser de suma importancia ya que esto organizaría una degradación de la MEC circundante sin la necesidad de la MMP-2. La MT4-MMP es única por su incapacidad para activar a la MMP-2. Esta es más susceptible a la inhibición por el TIMP-1 que por el TIMP-2. La incapacidad de activar la MMP-2 no se debe a ausencia de actividad catalítica (67). Los sustratos proteolíticos para la MT4-MMP también difieren comparándola con las otras MT-MMPs. La MT4-MMP tiene actividad hacia fibrinógeno, fibrina y TNF- $\alpha$  recombinante (61, 67). La idea de que la MT4-MMP puede tener actividad de convertasa de TNF- $\alpha$  es apoyada por datos de células co-transfectadas con la MT4-MMP y el proTNF- $\alpha$ , en las cuales fue mostrado que la MT4-MMP promueve el corte de TNF- $\alpha$ .

### **3.4 INHIBIDORES TISULARES DE METALOPROTEINASAS (TIMPs).**

Un nivel adicional de regulación de las MMPs es la inhibición de la enzima activa por inhibidores tisulares llamados TIMPs (del inglés *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*). Los TIMPs son inhibidores específicos que se unen a las MMPs en estequiometría 1:1. Los miembros identificados en

vertebrados son 4 y su expresión es regulada durante el desarrollo y la remodelación tisular (68). Los TIMPs tienen pesos moleculares que van de 21 a 30 kDa y son glicosilados de manera variable. Tienen seis puentes disulfuro y contienen tres asas en su dominio amino terminal y un subdominio C con tres asas que interactúan entre sí. El plegamiento en el dominio amino terminal como una unidad separada permite la inhibición de MMPs (69), pero además el subdominio C interacciona con el dominio catalítico de algunas MMPs y con el dominio tipo hemopexina de la MMP-2 y la MMP-9 (68). Los TIMPs son proteínas secretadas pero pueden localizarse en la superficie celular en asociación con proteínas unidas a membrana; por ejemplo, el TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 pueden unirse a la MT1-MMP. Únicamente el TIMP-3 es captado por la MEC, ya que se une a proteoglicanos que contienen heparan-sulfato y posiblemente a proteoglicanos que contienen condroitín-sulfato (70). Los TIMPs, además de inhibir MMPs, son capaces de inhibir algunos miembros de la familia de las ADAMs (A Disintegrin Metalloproteinases); el TIMP-3 inhibe ADAM-12 y ADAM-17 y las enzimas que degradan agregano ADAM-TS4 y ADAM-TS5, y el TIMP-1 inhibe ADAM-10 (71-73).

#### **3.4.1 Algunos efectos biológicos de TIMPs.**

El TIMP-1 se une a la superficie celular de células de cáncer de mama MCF-7 (74) y es traslocado al núcleo, aunque no se ha identificado que función ejerce ahí. Previamente había sido demostrada la acumulación

de TIMP-1 en el núcleo de fibroblastos gingivales en la fase S del ciclo celular (75).

Se cree que el TIMP-2 actúa a través de receptores específicos con alta afinidad que se encuentran ligados a rutas de señalización de proteínas G y cAMP (76). Cuando TIMP-2 se encuentra reducido y alquilado, es mitogénico; una mutante con un residuo alanina adicional en el amino terminal, reducida y alquilada, provoca que TIMP-2 no pueda inhibir MMPs, pero promueve crecimiento en fibroblastos, lo cual implica un papel diferente del de la inhibición (77).

Los TIMPs también tienen efectos divergentes sobre la muerte celular programada. En líneas celulares del linfoma de Burkitt, la elevada expresión del TIMP-1 correlaciona con la expresión incrementada de marcadores de sobrevivencia, y el TIMP-1 confiere resistencia a apoptosis (de forma dependiente e independiente del ligando de Fas)(78). Por el contrario, el TIMP-2 puede promover apoptosis *in vivo* en un modelo de cáncer colorectal, pero protege a las células de melanoma B16 de apoptosis (79-80). Altos niveles del TIMP-3 promueven apoptosis en muchos tipos celulares *in vivo* e *in vitro* y este efecto está asociado con la modulación de un receptor de muerte (81-86). No es claro si la apoptosis inducida por TIMP-3 tiene algún papel fisiológico. En el desarrollo normal existen altos niveles de expresión del TIMP-3 y ocurren en células deciduales uterinas durante la implantación del embrión; esto ha sido ligado a la sobrevivencia de estas células diferenciadas (87). El TIMP-4 también puede

participar en el proceso apoptótico en fibroblastos de corazón transformados, pero inhibe apoptosis en células de cáncer de mama humano *in vitro*, tumores de mama *in vivo*; cuando el TIMP-4 se sobreexpresa puede participar como un promotor tumoral. Como se puede observar, los TIMPs tienen efectos biológicos diferentes y en ocasiones opuestos. Esto complica su uso futuro en algún tipo de terapia y por ello es importante estudiarlos, para comprender dichos efectos.

### **3.5 FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA (FPI).**

La fibrosis pulmonar es la ruta final común para un diverso conjunto de desordenes pulmonares conocidos como enfermedades pulmonares intersticiales (EPI). Algunas de estas enfermedades son de etiología conocida como es la exposición a partículas orgánicas o inorgánicas (neumonitis por hipersensibilidad y asbestosis, respectivamente), las inducidas por drogas o las asociadas a enfermedades colágeno vasculares como la artritis reumatoide (88). Sin embargo cerca de la mitad de las EPI son de etiología desconocida y son clasificadas en la actualidad como neumonías intersticiales idiopáticas (89). De estas enfermedades, una de las mas comunes y quizá la mas agresiva es la Fibrosis Pulmonar Idiopática (88), la cual es una alteración pulmonar crónica, progresiva y, generalmente letal, de etiología desconocida.

Los pacientes con FPI tienen generalmente entre 50 y 70 años en el momento del diagnóstico. Dos tercios de ellos son mayores de 60 años y

según las estadísticas, los hombres tienen el doble de susceptibilidad de contraer la enfermedad que las mujeres. Se caracteriza por un daño inicial en el epitelio alveolar, activación y proliferación de fibroblastos y acumulación de la MEC, dando como resultado una distorsión irreversible de la arquitectura pulmonar, imposibilitando el proceso respiratorio (90).

Selman, y Pardo han propuesto que la FPI es una enfermedad epitelial-fibroblástica, es decir, una alteración fibroproliferativa, precedida por activación de células epiteliales alveolares (88, 90). Ellos sugieren que los sitios primarios de daño son los llamados focos de fibroblastos (regiones de proliferación de fibroblastos). Estos pequeños agregados de fibroblastos/miofibroblastos proliferativos constituyen sitios microscópicos múltiples, de constante daño y activación epitelial alveolar, con fibrosis envolvente. En otras palabras, ellos postulan que en FPI, un daño y activación inicial de células epiteliales induce proliferación y migración de fibroblastos, además de cambios fenotípicos en fibroblastos (a miofibroblastos). Posteriormente, los miofibroblastos pueden provocar ruptura de membranas basales y apoptosis de células epiteliales alveolares, perpetuando el daño e impidiendo una re-epitelización apropiada. El resultado final es el depósito excesivo de la MEC con la destrucción de unidades alveolo-capilares y la formación de pequeñas áreas de fibrosis, a las que en conjunto se les denomina “panal de abeja” (88, 90).

### **3.5.1 MMPs en FPI.**

El papel que desempeñan las MMPs en la FPI ha sido estudiado ampliamente en nuestro laboratorio (91-93).

Se ha sugerido que las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9) desempeñan un papel importante en la degradación de membranas basales ya que son capaces de degradar diferentes componentes de la misma, principalmente colágena tipo IV. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que en FPI, las gelatinasas son sintetizadas por miofibroblastos subepiteliales, coincidiendo en algunas áreas con membrana basal alveolar desnuda. Estos hallazgos sugieren que los miofibroblastos desempeñan un papel en la degradación de la membrana basal, facilitando su migración en los espacios alveolares (90, 91).

Los mayores activadores fisiológicos de la pro-MMP2 son los miembros de las metaloproteinasas transmembranales de tipo I a través de interacciones complejas con los TIMPs. En este contexto es importante recalcar que por análisis de microarreglos se ha demostrado que la MMP-2 está fuertemente sobre regulada pulmones de FPI y la forma activa está generalmente aumentada en los fluidos de lavado bronquioalveolar [92-93].

En virtud de que la activación de la gelatinasa A requiere la participación de las MT-MMPs y de los TIMPs para su activación, el objetivo de este trabajo fue analizar la expresión y localización de las cuatro metaloproteasas de membrana tipo I: MT1-, MT2-, MT3-, y MT5-MMP que son capaces de activar la proMMP2 y asociar su localización con la de la MMP-2. En el



mismo sentido se analizó la expresión y localización de los cuatro TIMPs. Adicionalmente, se analizó si estas MT-MMPs y los TIMPs están diferentemente regulados en fibroblastos pulmonares tanto en condiciones basales como al ser estimulados con el factor de crecimiento transformante beta (TGF  $\beta$ ), un potente mediador profibrógeno y con interferon gama (IFN  $\gamma$ ), un mediador antifibrógeno (94).

## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **4.1 Población de estudio.**

Las biopsias de pacientes de FPI se obtuvieron en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y el proyecto fue aprobado por su comité ético con consentimiento escrito de los pacientes. El diagnóstico de IPF se basó en el consenso de la Sociedad Americana de Torax y de la Sociedad Europea Respiratoria (ATS/ERS) confirmada por biopsia pulmonar a cielo abierto (95). Las muestras de pulmón *normal* (controles) se obtuvieron de biopsias de pulmón de pacientes, a los que se realizó una lobectomía para la remoción de tumores pulmonares primarios. El fragmento pulmonar que se utilizó para la obtención de fibroblastos fue tomado de tejido sin evidencia histológica de enfermedad y considerado como normal. Adicionalmente se adquirieron 2 muestras de RNA de pulmón normal (Ambion, Austin TX; Stratagene, La Jolla CA).

### **4.2 Obtención de fibroblastos.**

Los fibroblastos de pulmón fibrótico (FPI) y de pulmón normal se aislaron por tratamiento enzimático con Tripsina-EDTA (Tripsina-EDTA [1X] 0.5 g de tripsina porcina y 0.2 g EDTA, SIGMA) a 37°C, 20 min (106). Posteriormente los fibroblastos se sembraron en cajas Falcon (COSTAR Cambridge MA) de 25 cm<sup>2</sup> con medio F-12K (Invitrogene,

Carlsbad CA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (10% SFB), 100  $\mu$ /ml de penicilina, y 100 mg/ml de estreptomicina. Los fibroblastos (pasajes 5 a 8) se plaquearon en cajas de 9.6 cm<sup>2</sup> de superficie (COSTAR Cambridge MA), en medio F-12K/ 10% SFB y cuando alcanzaron confluencia se cultivaron con medio libre de suero por 24 horas y se estimularon con TGF- $\beta$ 1 a una concentración de 5 ng/ml ó 1000 U/ml de Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Adicionalmente, los fibroblastos estimulados con TGF- $\beta$ 1 fueron pre-tratados con varios inhibidores: genisteina (50  $\mu$ M) (inhibidor de protein cinasas), SB203580 (10  $\mu$ M) (inhibidor de p38 MAPK) y PD98059 (40  $\mu$ M) (inhibidor de MEK-1/2) (Calbiochem-Novabiochem, San Diego CA) .

#### **4.3 Extracción de RNA y transcripción reversa.**

El RNA fue extraído de biopsias y de células de pulmón por la técnica de TRIzol Reagent (Invitrogene, Carlsbad CA), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. El RNA total extraído de biopsias y fibroblastos humanos fue utilizado para RT-PCR (Advantage RT-for-PCR kit, BD Biosciences, Palo Alto CA). Un microgramo de RNA total fue transcrito de manera reversa en las siguientes condiciones: hexámeros al azar, 20 pmol; buffer de reacción 5X, 1x (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>); mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.5 mM cada uno; inhibidor de RNAsas, 1 U/ $\mu$ l; transcriptasa reversa MMLV, 200 U/ $\mu$ g de RNA. El cDNA fue sintetizado a 42°C por 1 hora e

incubado posteriormente a 94°C durante 5 minutos. Cabe mencionar que todas las muestras de RNA fueron pre-tratadas con DNAsa I, grado de amplificación antes de iniciar el protocolo de transcripción reversa, y de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogene, Carlsbad CA). El cDNA se guardó a – 20 °C hasta su uso en PCR.

#### **4.4 PCR en tiempo real.**

Para las reacciones de PCR, se diseñaron iniciadores específicos y sondas fluorogénicas para las MT-MMPs 1-6 y los cuatro TIMPs, usando el software Primer Express 1.0 (PE Applied Biosystems) y sintetizados por PE Applied Biosystems. Como control contra amplificación de DNA genómico, los primers fueron diseñados en una región cercana a la unión intrón/exón. El gene para RNA 18s se utilizó como un control endógeno, para ajustar las diferencias en la cantidad de RNA total en cada muestra; Los primers y la sonda de rRNA 18s fueron adquiridos de PE Applied Biosystems. Las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando el termociclador ABI Prism 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystem), utilizando el protocolo del proveedor. Cada reacción fue realizada en 25 µl y conteniendo el equivalente de 5 ng de RNA transcrito de manera reversa (1 ng de RNA para análisis de 18s), 50% de TaqMan 2x PCR Master Mix (PE Applied Biosystems), 100 nM de los primers sense y antisense y 200 nM de sonda. Las condiciones para la reacción de PCR

fueron de 2 min. a 50°C, 10 min. a 95°C y posteriormente 40 ciclos, cada uno de 15 seg. a 95°C y 1 min. a 60°C.

Para determinar los niveles relativos de RNA en las muestras, se prepararon curvas estándar para la reacción de PCR utilizando el cDNA de una de las muestras y diluyendo de manera serial 2 veces, cubriendo un rango equivalente a 20-0.625 ng de RNA (para análisis del 18s, el rango fue de 4 a 0.125 ng). Conociendo la secuencia y la longitud del RNA sintetizado, el peso molecular de cada RNA se calculó y se determinó el número de moléculas sintetizadas. Se prepararon diluciones seriales de diez veces de cDNA cubriendo un rango de concentraciones equivalentes desde  $10^{10}$  copias de RNA a el equivalente de  $10^1$  copias de RNA. Estas diluciones fueron sujetas a PCR en tiempo real. Durante cada ciclo de PCR, la sonda fluorogénica fue digerida por la actividad endonucleasa de la polimerasa, generando una señal fluorescente; la cantidad de fluorescencia fue proporcional a la cantidad de cDNA amplificado. El ABI Prism 7700 mide los cambios de fluorescencia ciclo a ciclo en cada muestra y genera un perfil cinético de la amplificación de DNA en 40 ciclos de reacción de PCR. El número de ciclos (llamado ciclo umbral o Ct) en el cual la amplificación entra a la fase exponencial, fue determinado y este número fue utilizado como un indicador de la cantidad de RNA blanco en cada tejido; así, un valor de Ct bajo, indica una alta cantidad de RNA inicial. Se prepararon las curvas estándar relativas para Ct *versus* el inverso de RNA y se determinaron los niveles relativos de RNA inicial en cada muestra.

#### **4.5 Western blot.**

Los medios condicionados de fibroblastos y fibroblastos lisados sin estimular y estimulados con el TGF- $\beta$  así como de los inhibidores señalados con anterioridad se usaron para la determinación de los TIMPs y las MT-MMPs respectivamente. Para la p38 y las ERK 1 y 2, los fibroblastos en medio libre de suero se estimularon con el TGF- $\beta$  a diferentes intervalos de tiempo (0, 15, 30, 60 min, 3, 6 y 24 horas); al término del estímulo, se descartó el medio condicionado y se añadieron 50  $\mu$ l de buffer (PhosphoSafe Extraction Reagent, Novagen WI USA), raspando el pozo. Un total de 30  $\mu$ g de proteína por muestra fueron sometidos a electroforesis (ERK 1-2, p38 y MT3-MMP) en gel de poliacrilamida de 1.5 mm de espesor al 12% (para el TIMP-3 y las ERK 1-2) ó al 8.5% (para la MT3-MMP y la p38) en condiciones desnaturizantes a 120 volts. Los geles fueron transferidos a una membrana PVDF (Invitrogene, Carlsbad CA) en cámara húmeda (BIORAD) durante 1 hora 30 minutos a 60 volts. La membrana fue bloqueada en solución bloqueadora (leche descremada al 5%/TBS-T) por 2 horas y posteriormente se incubó con los anticuerpos correspondientes anti-TIMP-3, anti-MT3-MMP, anti-p38 (forma total ó fosforilada [Chemicon, Temecula CA]) ó anti ERK 1-2 (Forma total ó fosforilada [Calbiochem-Novabiochem, San Diego CA]), de acuerdo a las instrucciones del proveedor, durante toda la noche. Posteriormente, se lavó la membrana con amortiguador TBS-T, se incubó con un anticuerpo secundario anti-ratón (TIMP-3) ó anti-conejo (MT3-MMP, p38, ERK 1-2 [Chemicon, Temecula CA]) a una

concentración de 1:7500 y finalmente se hizo el revelado con el kit Chemilucifer (Chemicon, Temecula CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### **4.6 Zimografía de lavado bronquioalveolar (LBA).**

El LBA fue realizado utilizando un broncoscopio de fibra óptica y flexible, en pacientes o individuos control, bajo anestesia local. Alícuotas de los sobrenadantes de LBA conteniendo 10 µg de proteína fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 8.5% conteniendo 1 mg/ml de gelatina y heparina en una concentración final de 0.3 mg/ml. Después de la electroforesis, los geles se colocaron en una solución de Tritón X-100 (dos veces por 15 minutos), se lavaron abundantemente con agua y se incubaron toda la noche a 37°C en glicina 100 mM pH 8.0, con CaCl<sub>2</sub> 10 mM y ZnCl<sub>2</sub> 50 mM. Los geles se tñieron con azul de Coomassie R-250 al 1% en isopropanol al 25% y ácido acético y se destñieron en una solución de ácido acético al 7.5% y metanol al 5%. Las zonas de actividad enzimática se observaron como bandas claras contra un fondo azul.

#### **4.7 Inmunohistoquímica.**

Secciones de tejido fueron desparafinadas, rehidratadas y bloqueadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.45% en metanol por 30 minutos seguido por

suero normal diluido 1:100 en PBS por 20 minutos. Antes de la reacción inmune, se realizó la recuperación del antígeno con amortiguador de citratos 0.1M pH 6.0.

Los anticuerpos fueron obtenidos de Calbiochem (San Diego, California) para la MT1-MMP, la MT2-MMP; Chemicon (Temecula CA) para la MT3-MMP y Triple Point Biologics (Portland, OR) para la MT5-MMP, y fueron aplicados e incubados a 4°C toda la noche. Un anticuerpo anti-inmunoglobulina acoplado con biotina fue colocado antes del anticuerpo conjugado estreptavidina-peroxidasa (Biogenex, San Ramón, CA) y fue utilizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El sustrato utilizado fue 3-amino-9-etilcarbazol (Biogenex) en amortiguador de acetato conteniendo 0.05% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina. El anticuerpo primario fue reemplazado por suero no inmune en algunas laminillas como control negativo.



## **V. Resultados**

### **5.1 Expresión de MT-MMPs en pulmones normales y con FPI.**

Se analizó por PCRtr, el nivel de la expresión de las cuatro MT-MMPs de tipo I, en tejidos de pacientes con FPI y en muestras de RNA comercial obtenidas de pulmón humano. Se consideró el ciclo umbral (Ct) para clasificar el nivel de la expresión génica como muy alta ( $Ct \leq 25$ ), alta ( $Ct = 26-30$ ), moderada ( $Ct = 31-35$ ), baja ( $Ct = 36-39$ ) o no detectada ( $Ct = 40$ ) [95]. Mediante este análisis, se encontró que la MT-MMP más altamente expresada tanto en los pulmones control y con FPI fue la MT1-MMP, seguida por una alta expresión de MT2- y MT5-MMP, y una moderada expresión de MT3- MMP. Los niveles de las enzimas no mostraron diferencias significativas entre pulmones control y patológicos (Figura 3).

### **5.2 Inmunohistoquímica de MT-MMPs**

La localización celular de MT1-, MT2-, MT3-, y MT5-MMP se examinó por inmunohistoquímica. Como se ilustra en la figura 4, la MT1- y la MT2-MMP se localizaron primariamente en células del epitelio alveolar hiperplástico e hipertrófico (páneos A y B). Adicionalmente la MT1-MMP se observó también en células endoteliales. La proteína MT3-MMP inmunoreactiva se encontró fundamentalmente expresada en

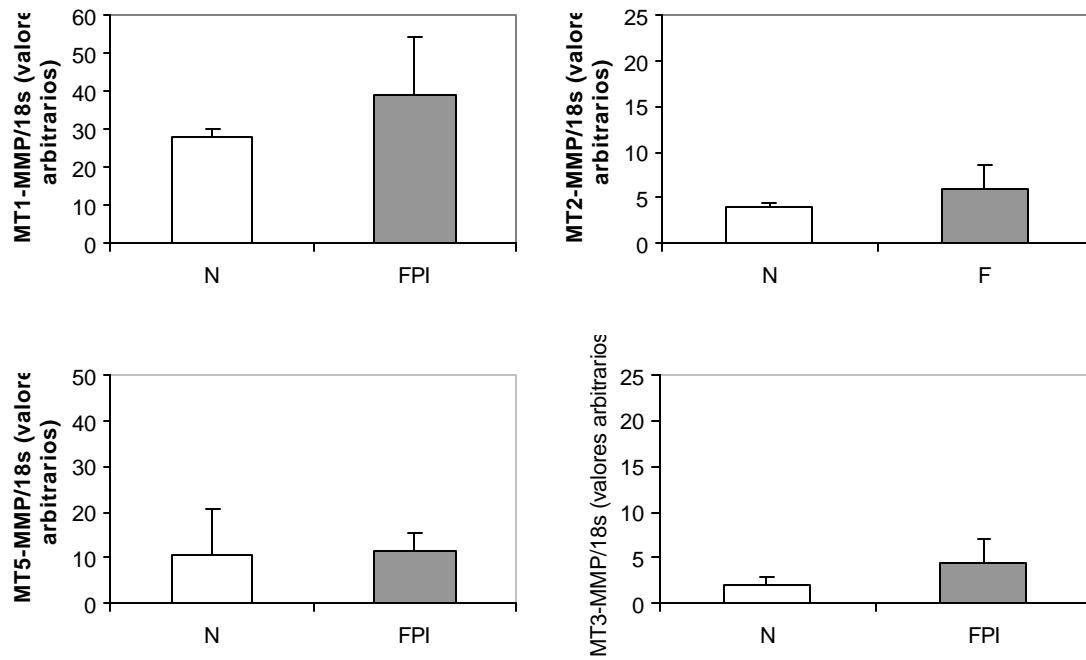


Figura 3. Nivel de expresión de MT1-, MT2, MT3- y MT5-MMP determinado por PCR en tiempo real, en pulmones normales y fibróticos. Los valores de las ordenadas son niveles relativos de la expresión génica comparados con gene constitutivo de rRNA 18s. Los valores son arbitrarios y no pueden ser comparados entre diferentes genes. Cada barra representa la media  $\pm$  su desviación estándar de 2 pulmones normales y 4 con FPI.

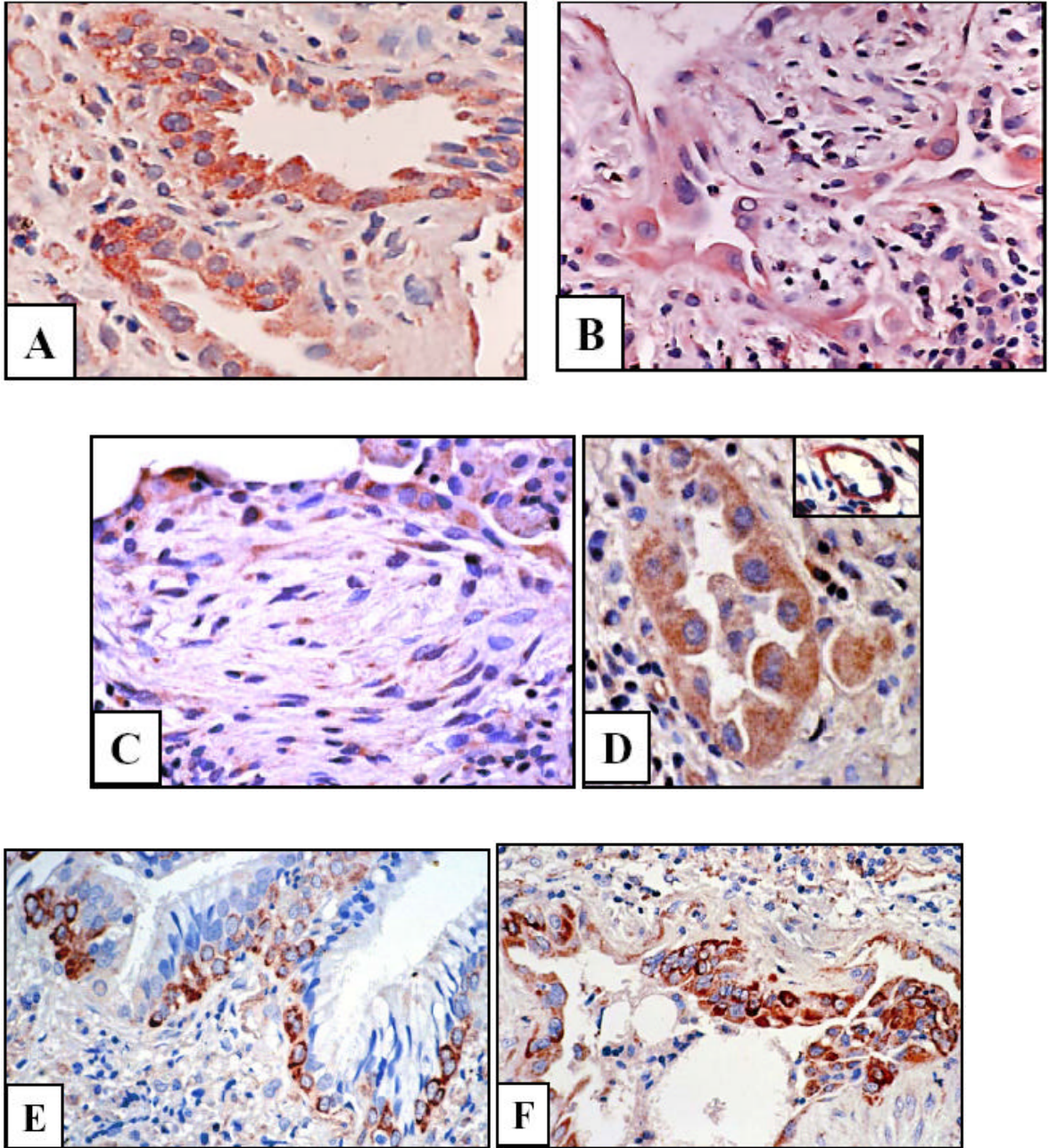


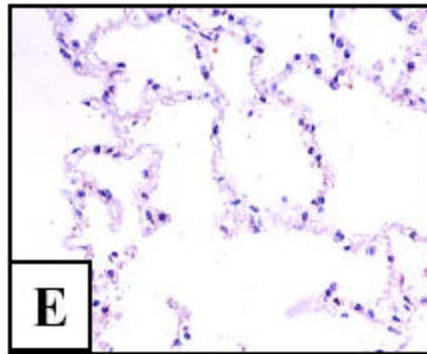
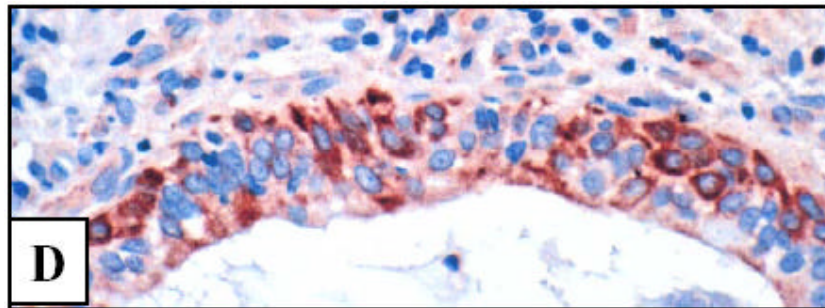
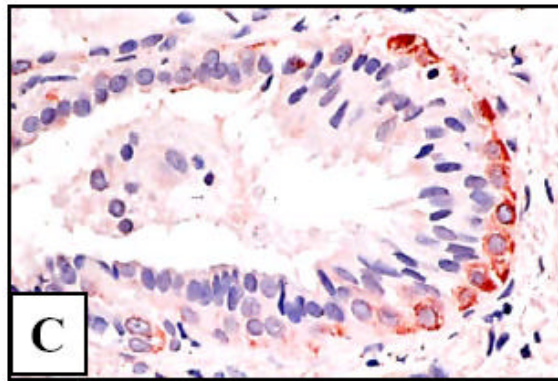
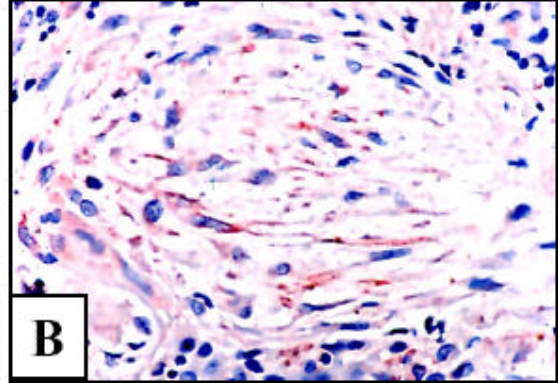
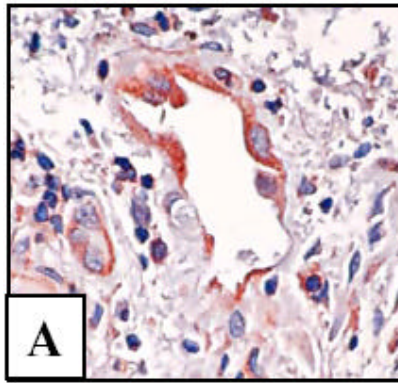
Figura 4: Localización de MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP y MT5-MMP en pulmones con FPI. Las proteínas inmunoreactivas fueron reveladas con 3-amino-9-etil-carbazol y las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina. Paneles A y B: intensa tinción epitelial de MT1-MMP y MT2-MMP en pulmones con FPI (magnificación original, 40X). Panel C: Tejido con FPI mostrando tinción en epitelio alveolar y fibroblastos

de MT3-MMP (40X). Panel D: neumocitos tipo 2 hiperplásicos, fuertemente teñidos con anticuerpo anti-MT3-MMP (40X). Recuadro: células endoteliales positivas. Paneles E and F: pulmones con FPI analizados para MT5-MMP. Células epiteliales bronquiolares basales (E) y células epiteliales alveolares (F) muestran una tinción intensa (40X).

fibroblastos de focos fibroblásticos y en células alveolares epiteliales que se encuentran sobre estos focos (panel c). También se observó en neumocitos tipo II (panel D) y Algunas células endoteliales de pequeños capilares (recuadro D). La MT5-MMP inmunorreactiva se detectó primariamente en células epiteliales bronquiolares basales (panel E), y en algunas áreas que sugieren metaplasia descamativa temprana (panel F). En los epitelios de pulmón normal las MT-MMPs fueron apenas detectables como se ejemplifica para la MT1-MMP en el panel G.

### **5.3 Inmunolocalización de MMP2 y actividad gelatinolítica en LBA.**

Como las MT-MMPs transmembranales tipo I pueden activar la pro-MMP-2 se procedió a inmunolocalizarla en las secciones de pulmones de FPI donde estas MT-MMPs fueron positivas. Como se muestra en la figura 5 la MMP-2 inmunoreactiva se encontró en las células del epitelio alveolar (panel A), en focos de fibroblastos (panel B), y en células epiteliales bronquiolares (paneles C y D). Los pulmones normales fueron generalmente negativos (panel E), aunque ocasionalmente algunos macrófagos alveolares se tiñeron. Para evaluar la actividad gelatinolítica de MMP-2 en LBA de los pacientes con FPI y de sujetos normales, alícuotas del fluido de LBA fueron analizadas por zimografía usando gelatina como sustrato (Figura 5F). Como se observa, las muestras de LBA normal muestran poca actividad en las bandas que corresponden a la actividad de proMMP-2 y proMMP-9, mientras



**F**

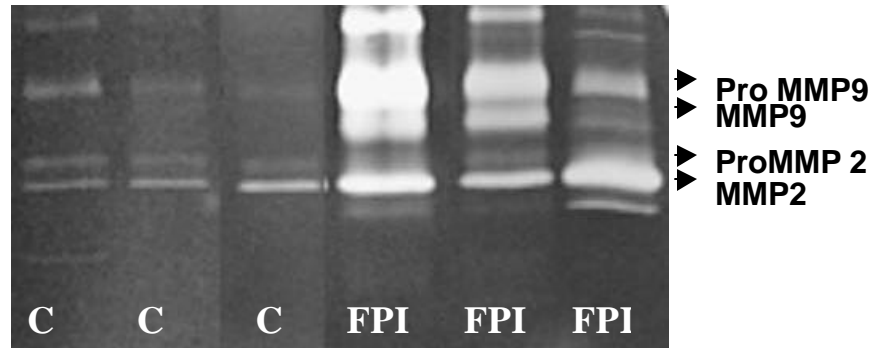


Figura 5: Localización y actividad de MMP2 en pulmones con FPI. MMP2 inmunorreactiva fue observada en células epiteliales alveolares (panel A), en fibroblastos ubicados en los denominados focos de fibroblastos (panel B), y células epiteliales (paneles C y D). Panel E: Pulmones normales fueron generalmente negativos. Panel F: zimograma mostrando la actividad gelatinolítica en lavados bronquioalveolares de pacientes con FPI y controles. Las bandas con actividad intensa de MMP-2 y MMP-9 son observadas en FPI.

que las muestras de FPI exhiben un claro incremento de la actividad de proMMP-2 y proMMP-9, así como la forma activada de ambas enzimas (Figura 5F).

#### **5.4 Expresión de MT-MMPs por fibroblastos *in vitro*.**

Se examinaron los niveles de expresión de las 4 MT-MMPs tipo I por PCR en tiempo real (PCRtr) en líneas primarias de fibroblastos de pulmón normal y de fibroblastos de pulmón con FPI.

Usando el ciclo umbral para clasificar la expresión de las MT-MMPs observamos que la expresión de la MT1-MMP fue *muy alta*; mientras que las de MT2-, MT3- y MT5- fueron *altas*. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de las MT-MMPs entre fibroblastos derivados de pulmón normal o de pulmones con FPI.

Posteriormente se analizó el efecto del TGF- $\beta$ 1, un mediador pro-fibrótico y de IFN- $\gamma$  sobre la expresión de las MT-MMPs. Como se muestra en la Figura 6 tanto en fibroblastos derivados de pulmón normal como en los de FPI la MT3-MMP fue altamente sobre-regulada por el TGF- $\beta$ 1. El estímulo con el IFN- $\gamma$  no mostró ningún efecto sobre la expresión de las MT-MMPs.

Como algunas de las acciones biológicas del TGF- $\beta$ 1 son mediadas por la activación de rutas de señalización de las MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases), se decidió evaluar el papel potencial de éstas en la inducción de MT3-MMP por TGF- $\beta$ 1, analizando el efecto de este factor sobre la



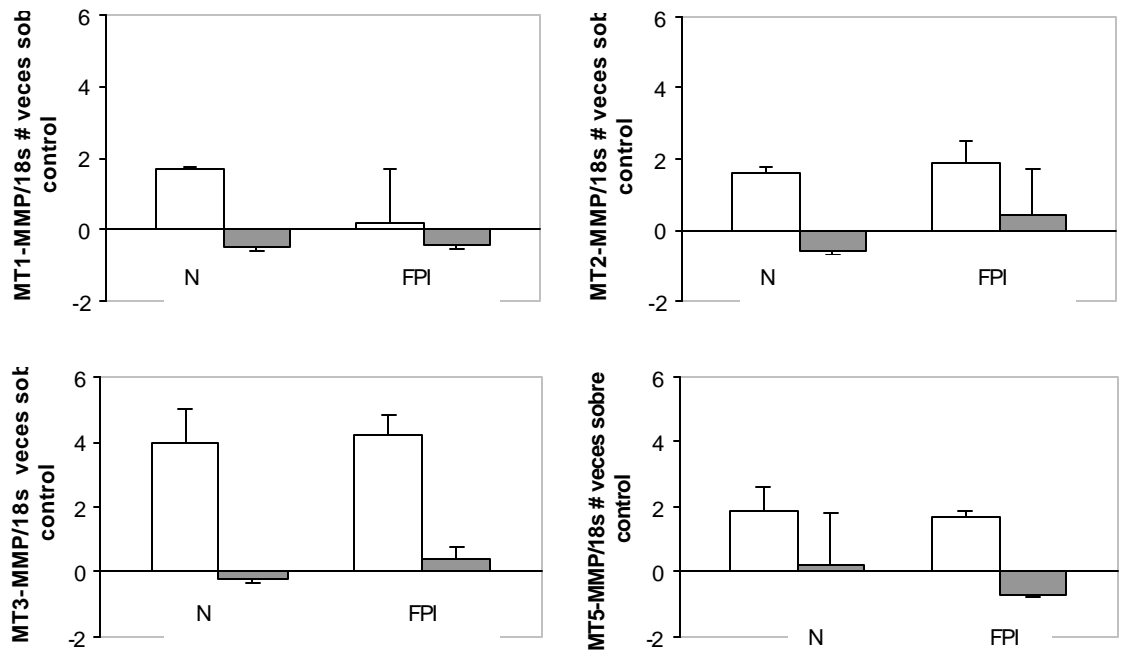
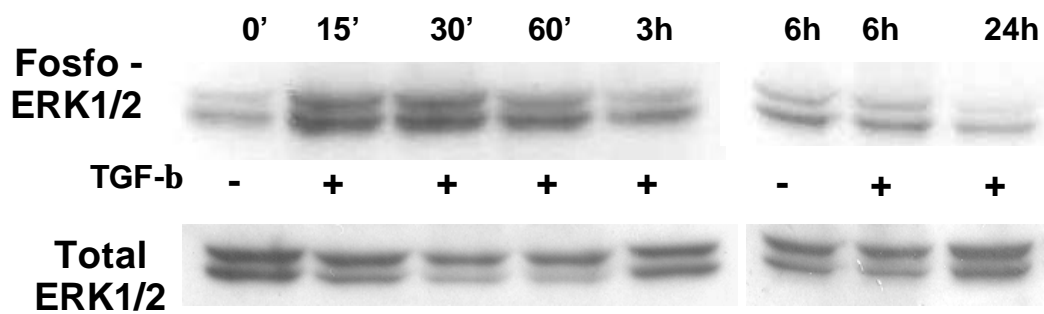
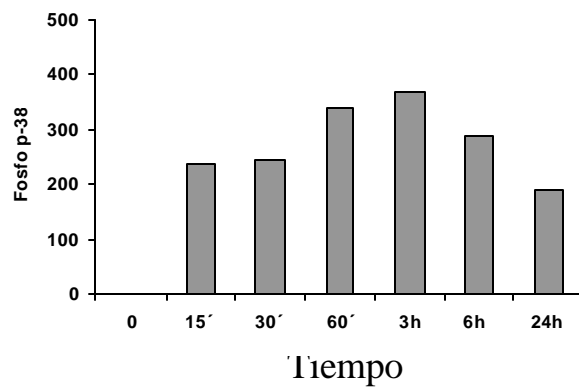
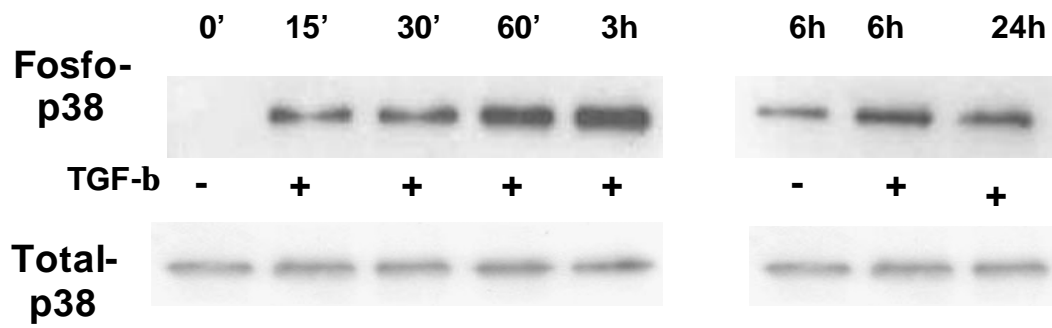


Figura 6. Efecto de TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  en la expresión de los genes de las MT-MMPs tipo I por fibroblastos. Las células fueron tratadas con TGF- $\beta$  (5 ng/ml, barras blancas) e IFN- $\gamma$  (1000 U/ml, barras oscuras) y la expresión de las MT1-, MT2-, MT3- y MT5-MMPs fue determinada por PCR en tiempo real. Las barras representan la media de la desviación estándar de dos experimentos independientes realizados en 3 cultivos primarios normales y dos fibróticos. Los resultados son expresados como el número de veces que se incrementa la expresión en comparación con las células sin tratar.



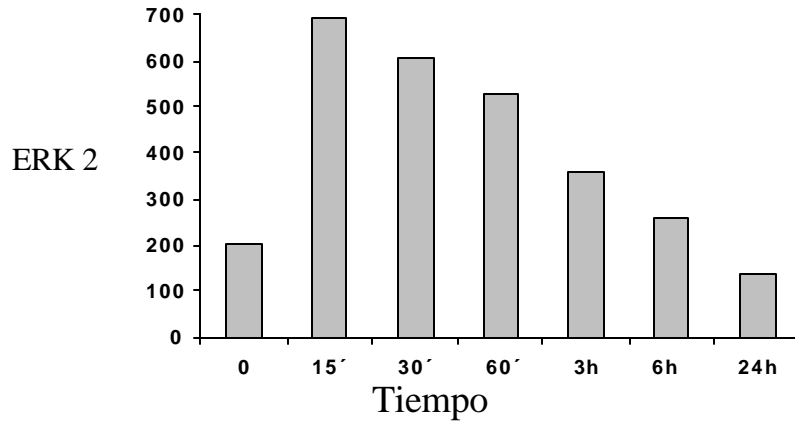


Figura 7. Fibroblastos de pulmón humano normal fueron incubados con TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) desde 15 minutos a 24 horas. Un resultado representativo de dos experimentos es ilustrado. Los paneles superiores muestran la fosforilación de la p38 MAPK así como p38 contenida en total en los extractos celulares, y esto fue determinado por western blot. El panel inferior muestra la fosforilación de ERK 1/2 MAPK y las ERK 1/2 de extractos celulares en total. Las gráficas muestran la cuantificación densitométrica de la fosforilación tanto de p38 como de ERK 2 en diferentes tiempos. Cada barra representa el valor promedio obtenido de dos experimentos independientes.

fosforilación de la p38 y las ERK. Como se muestra en la figura 7, se comprueba que el TGF- $\beta$ 1 incrementa la fosforilación de la p38 MAPK y lo hace a los 15 minutos de estímulo y permanece fosforilada hasta las 24 horas. No se observaron cambios en la cantidad total de la p38 MAPK. Después del estímulo con TGF- $\beta$ 1, la fosforilación de las ERK 1/2 se incrementó desde los 15 hasta los 60 minutos, declinando posteriormente. No fueron observados cambios en la proteína total de las ERK 1/2. Tanto en los fibroblastos de pulmón normal como en los de FPI la acción del TGF- $\beta$ 1 fue inhibida por genisteína (inhibidor de cinasas de tirosina), parcialmente bloqueada por el SB203580 (inhibidor de p38 MAPK), mientras que el PD98059 (inhibidor de MKK1/2) no tuvo ningún efecto (Figura 8 panel superior).

El efecto del TGF- $\beta$ 1 se corroboró a nivel proteína. Como se ilustra en la figura 8 panel inferior el análisis por western blot de los lisados de fibroblastos no estimulados muestran la presencia de una forma de bajo peso molecular (~25-30 kDa) de la MT3-MMP. Esta forma truncada aumentó en los fibroblastos estimulados con el TGF- $\beta$ . Adicionalmente, en los fibroblastos estimulados con el TGF- $\beta$  se observaron formas de mas alto peso molecular (~50-65 kDa) que probablemente corresponden a la enzima completa.

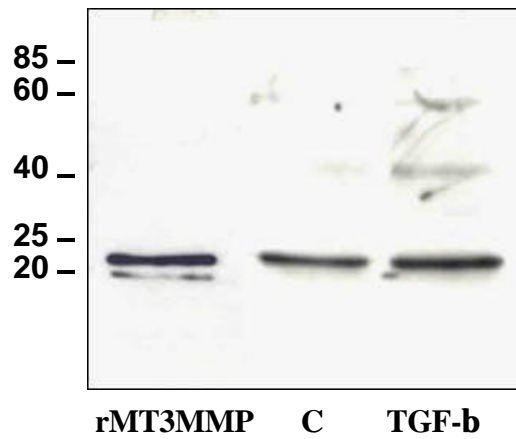
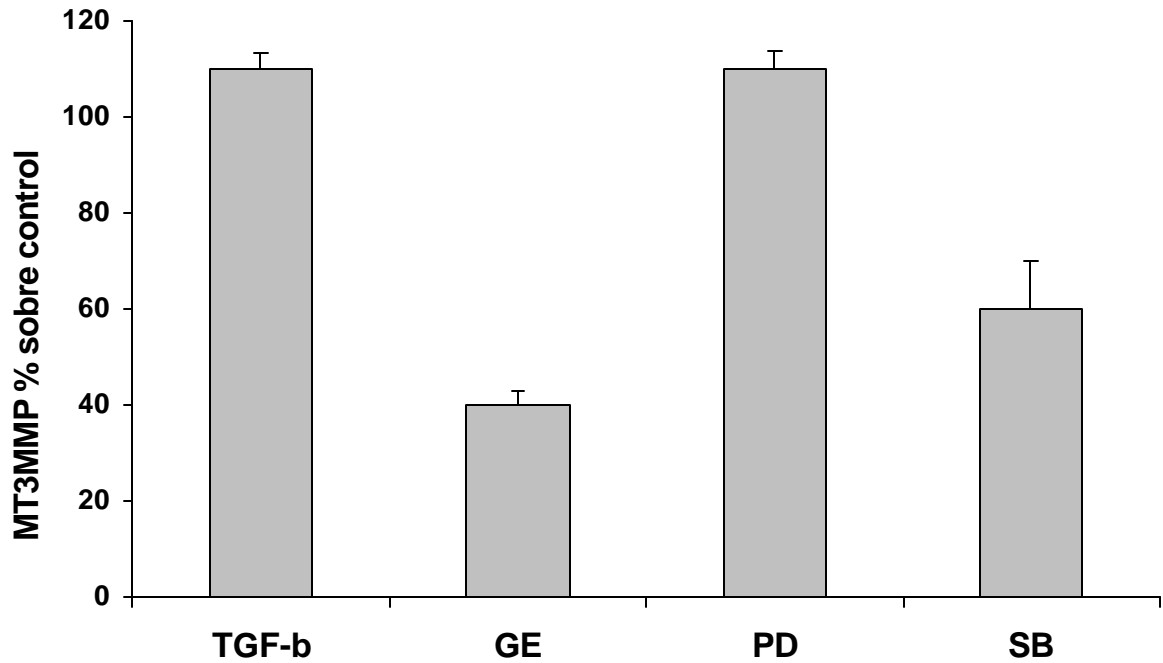


Figura 8. Efecto del TGF- $\beta$  en la expresión del gene y de la proteína de la MT3-MMP por fibroblastos. Panel superior: Las células fueron tratadas con 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 solo o después del pre-tratamiento con los inhibidores Genisteina (GE; 50  $\mu$ M); inhibidor de MEK, PD98059 (PD; 40  $\mu$ M); SB203580, inhibidor de p38 MAPK, (SB; 10  $\mu$ M). Las barras representan la media  $\pm$  de la desviación estándar de dos

experimentos independientes en tres cultivos primarios de células normales. Los resultados son expresados como un porcentaje del incremento con respecto a las células sin tratamiento. Panel inferior: Western blot que muestra un incremento de la MT3-MMP inmunorreactiva en lisados celulares obtenidos de fibroblastos no estimulados (C) y estimulados con TGF- $\beta$ . El primer carril muestra una fracción recombinante del dominio catalítico de la MT3-MMP. Los pesos moleculares se indican a la izquierda.

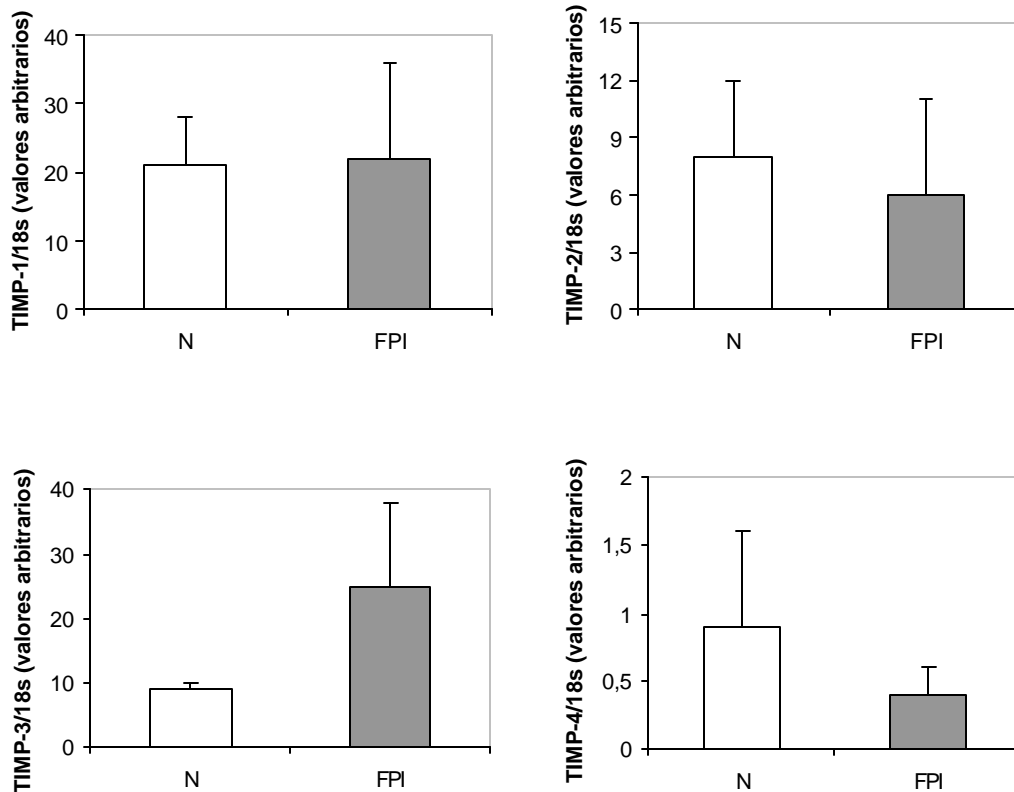


Figura 9. Nivel de expresión de los TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 determinado por PCR en tiempo real, en pulmones normales y fibróticos. Los valores de las ordenadas son niveles relativos de la expresión génica comparados con el gen constitutivo de rRNA 18s. Los valores son arbitrarios y no pueden ser comparados entre diferentes genes. Cada barra representa la media  $\pm$  su desviación estándar de 2 pulmones normales y 4 con FPI.

### **5.5 Expresión de TIMPs en pulmones normales y con FPI.**

Utilizando la misma metodología de PCRtr para los TIMPs, se encontró que TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3 mostraron muy altos niveles de expresión, seguidos de TIMP-4 con un nivel de expresión moderado. Cuando comparamos el nivel de TIMP-3 en pulmones normales y fibróticos, se muestra una tendencia al incremento en las muestras patológicas (figura 9).

### **5.6 Inmunohistoquímica para el TIMP-3**

Debido a que el TIMP-3 muestra una tendencia al incremento en pulmones con FPI, se decidió evaluar su localización en pulmón por la técnica de inmunohistoquímica. El TIMP-3 inmunorreactivo fue revelado en fibroblastos presentes en focos de fibroblastos así como en algunas células endoteliales. También fue detectado en la MEC, principalmente en lámina elástica alrededor de vasos de diferente calibre. El TIMP-3 no fue detectado en pulmones normales como se muestra en la figura 10.

### **5.7 Expresión de los TIMPs por fibroblastos in vitro.**

Al encontrar la presencia del TIMP-3 en fibroblastos de pulmón, se realizó un análisis para determinar el nivel de expresión de este



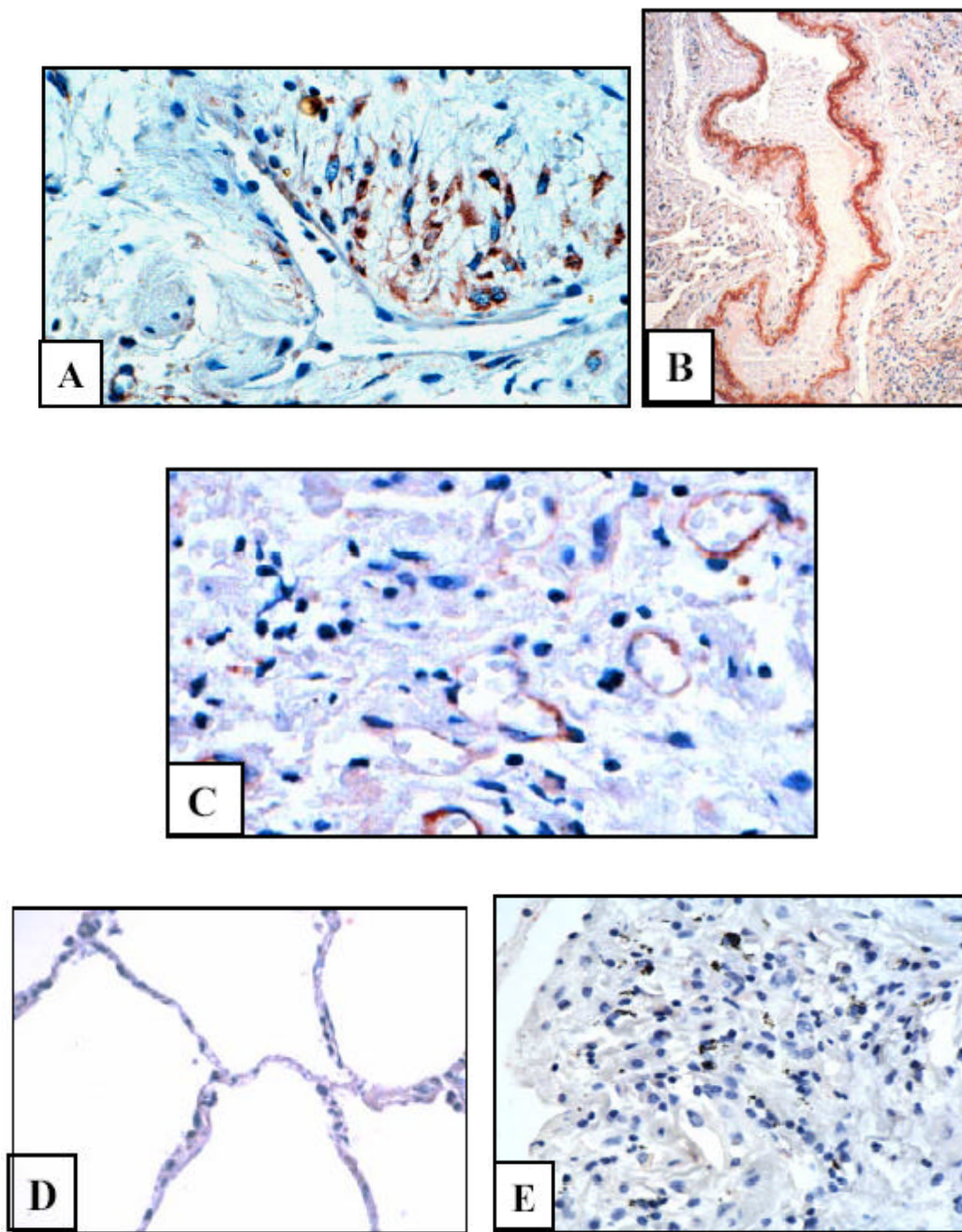


Figura 10. Localización del TIMP-3 en pulmones con FPI y controles. El TIMP-3 inmunorreactivo fue revelado con 3-amino-9-etil-carbazol y las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina. Panel A: Fibroblastos positivos en focos de fibroblastos. Panel B: lámina elástica. Panel C: células endoteliales de capilares. Panel D:

Pulmón control que no muestra tinción. Panel E: sección de control negativo de pulmón con FPI en el cual el anticuerpo primario fue omitido (40X).

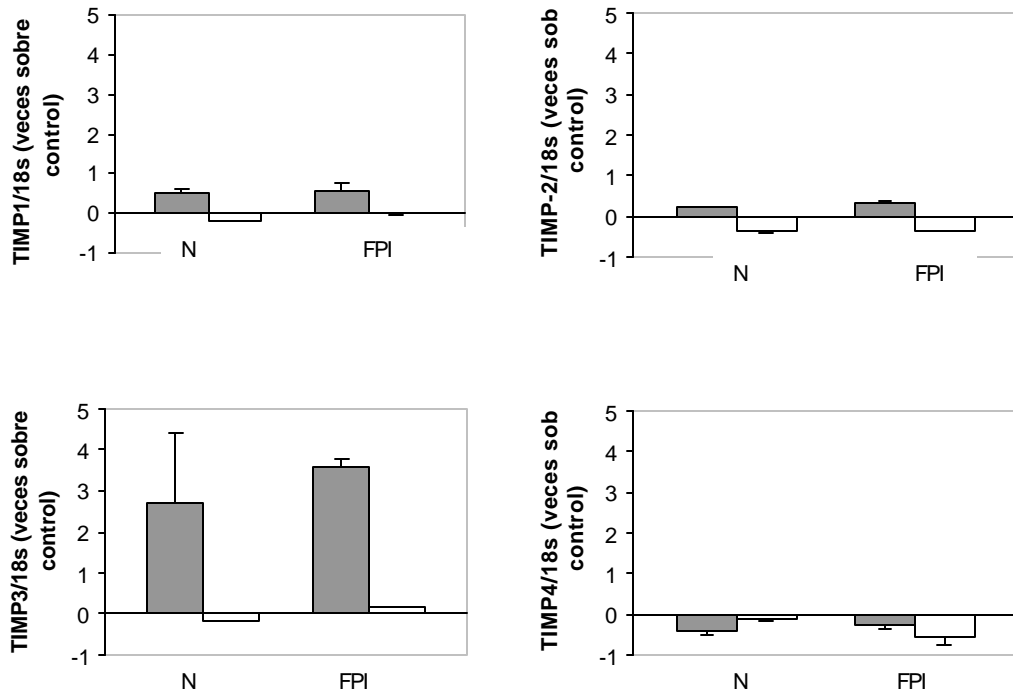


Figura 11. Efecto del TGF- $\beta$  y el IFN- $\gamma$  en la expresión de los genes de los TIMPs por fibroblastos. Las células fueron tratadas con TGF- $\beta$  (5 ng/ml, barras blancas) e IFN- $\gamma$  (1000 U/ml, barras oscuras) y la expresión de los TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 fue determinada por PCR en tiempo real. Las barras representan la media  $\pm$  la desviación estándar de dos experimentos independientes realizados en 3 cultivos primarios normales y dos fibróticos. Los resultados son expresados como el número de veces que se incrementa la expresión en comparación con las células sin tratar.

inhibidor en cultivos primarios. PCRtr reveló muy alta expresión de los TIMP-1, -2 y -3 en fibroblastos de pulmón, mientras que TIMP-4 tuvo unamoderada expresión. No fueron encontradas diferencias entre las líneas de cultivos primarios normales y las fibróticos. Cuando se evaluó la regulación de los TIMPs por TGF- $\beta$ 1 (figura 11), éste incrementó consistentemente la expresión de TIMP-3 (aproximadamente 4 veces tanto en líneas de pulmón normal y fibrótico). Este efecto no fue observado con los otros TIMPs. En un experimento curso-temporal, los fibroblastos tratados con TGF- $\beta$ 1 resultaron en una sobre-regulación tiempo -dependiente del mRNA TIMP-3, la cual inició a las 3 horas y la más alta expresión fue a las 12 horas (figura 12a). No se observaron diferencias al estimular con IFN- $\gamma$ .

El inhibidor de cinasas de tirosina, genisteína, elimina el efecto de sobre-expresión de TIMP-3 por TGF- $\beta$ 1, mientras que el inhibidor de la MAPK p38, SB203580, lo inhibe parcialmente. El inhibidor de la vía de MEK, PD98059 no tuvo efecto (Figura 12a).

Para indagar si el mRNA fue traducido en su correspondiente proteína al igual que MT3-MMP, se realizó un análisis por Western blot realizado con medio condicionado después de 24 horas de estimulación con TGF- $\beta$ 1. El anticuerpo contra TIMP-3 reveló 2 bandas como en la proteína recombinante que se utilizó como control (figura 12b). Una densitometría de dicho western, muestra que el resultado es muy semejante a lo observado a nivel de mRNA (figura 12c).

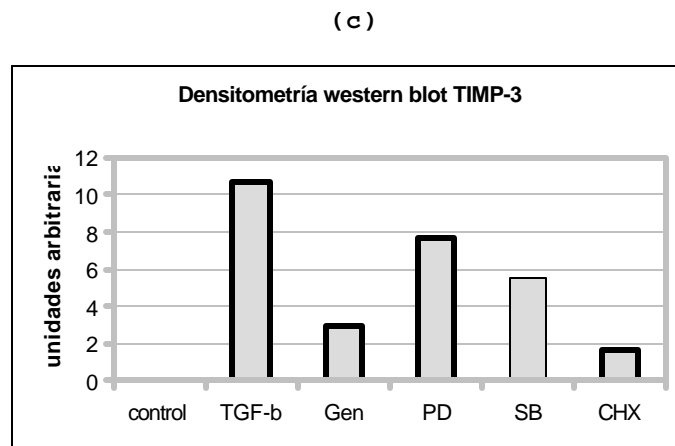
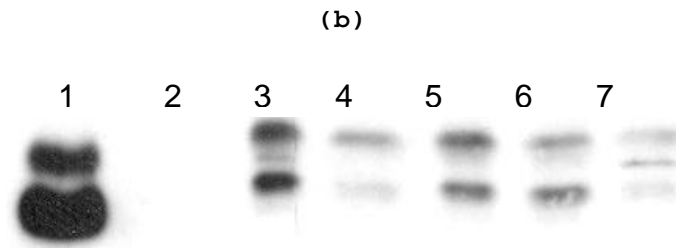
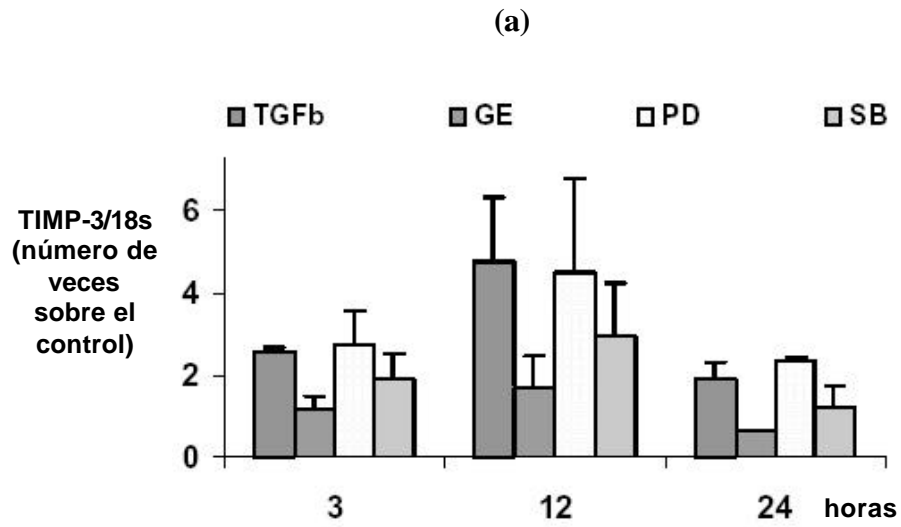


Figura 12. (a) Curso temporal que muestra el efecto de TGF- $\beta$  solo o después del pre-tratamiento con los inhibidores Genisteina (50  $\mu$ M, GE); inhibidor de MEK, PD98059 (40  $\mu$ M, PD); inhibidor de p38 MAPK, SB203580 (10  $\mu$ M, SB). Las barras representan la media  $\pm$  de la

desviación estándar de dos experimentos independientes en tres cultivos primarios de células normales. Los resultados son expresados como un porcentaje del incremento con respecto a las células sin tratamiento. b) Western blot que muestra un incremento del TIMP-3 inmunorreactiva en medios condicionados de fibroblastos no estimulados (2) y estimulados con TGF- $\beta$  (3); Las células fueron tratadas con 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 después del pre-tratamiento con los inhibidores Genisteina (4); inhibidor de MEK, PD98059 (5); inhibidor de p38 MAPK, SB203580 (6) y por último cicloheximida (7). El primer carril muestra una proteína recombinante del TIMP-3. (c) densitometría de la membrana mostrada, los valores son unidades arbitrarias.



## **VI. DISCUSIÓN.**

### **6.1 MMP-2 en FPI.**

La FPI es una enfermedad crónica y progresiva caracterizada por una remodelación tisular aberrante en la cual, las evidencias sugieren que las MMPs y los TIMPs pueden desempeñar un papel importante (26, 92-99). La MMP-2 generalmente se incrementa en pulmones con FPI, lo cual confirmamos en este estudio. Así, los fluidos de LBA de pacientes con FPI muestran un notable incremento de la proMMP-2, así como de la enzima activa al comparar con los controles.

De manera importante, como todas las MMPs, la MMP-2 es sintetizada como un zimógeno y los principales activadores fisiológicos de esta proenzima son los miembros de la subfamilia de las MT-MMPs. La MMP-2 es activada en la superficie celular a través de un mecanismo que involucra a las MT-MMPs tipo I y TIMPs específicos (100-101). Es importante mencionar que además de su función como activadores de la pro-MMP-2, las MT-MMPs constituyen un grupo de MMP unidas a membrana que son mediadores centrales de eventos de superficie celular a través de la conversión proteolítica de las proteínas en el medio extracelular.

### **6.2 Las MT-MMPs tipo I son expresadas en pulmón.**

Estas enzimas son sobre-expresadas en casi todos los tipos de cánceres estudiados en humanos y su expresión ha sido asociada con



parámetros malignos. Consistente con su alta expresión en tumores, se ha demostrado que las MT-MMPs son críticas al promover migración celular, invasión y angiogénesis (100-102). Con la excepción de la MMP-14 (MT1-MMP) que fue evaluada previamente por inmunohistoquímica, las otras MT-MMPs no habían sido examinadas en FPI (26, 92). En el presente estudio se analizó la expresión de las cuatro MT-MMPs tipo I y los cuatro TIMPs en tejido pulmonar normal y en tejido pulmonar con FPI. Además, también se analizó su expresión en fibroblastos de pulmón y su regulación transcripcional por el TGF- $\beta$ 1, un fuerte factor profibrótico e IFN- $\gamma$ , un mediador antifibrogénico. Nuestros resultados indican que la MT1-MMP fue la MT-MMP mayormente expresada en pulmones y en fibroblastos humanos. No se notaron diferencias entre pulmones normales y pulmones con FPI por PCRtr; la MT2- y MT5-MMP muestran un nivel de expresión alto, mientras que la MT3-MMP presenta moderada expresión. En contraste a los miembros secretados de la familia de las MMPs, los mRNAs de las seis MT-MMPs son detectables en muchos tejidos (103). Aunque no se encontraron diferencias en los niveles de expresión génica entre pulmones normales y con FPI, las cuatro MT-MMPs tipo I fueron claramente identificadas en pulmones con FPI por la técnica de inmunohistoquímica, mientras que no se detectaron en pulmones normales. Poco es conocido sobre la regulación post-transcripcional en estas enzimas, pero considerando que son enzimas unidas a membrana, se ha propuesto que la regulación es realizada por procesos de corte autocatalítico y no-autocatalítico del ectodominio, además

de internalización, lo cual determinaría el nivel de la enzima madura sobre la superficie (104-105).

### **6.3 MT3- y MT5-MMP se localizan principalmente en células epiteliales.**

En FPI, las cuatro MT-MMPs tipo I fueron localizadas en células epiteliales, tanto en el epitelio plano como en hiperplásico. Las células epiteliales dañadas/activadas realizan un papel clave en la patogénesis por FPI, debido a que sintetizan muchas de las citocinas y factores de crecimiento responsables para la migración de fibroblastos y su activación y diferenciación a miofibroblastos (94). De manera interesante, la MT5-MMP fue detectada en células epiteliales bronquiolares basales (progenitoras) y en algunas áreas mostrando metaplasia escamosa temprana.

Además de estar en células epiteliales alveolares, la MT3-MMP fue encontrada en fibroblastos, dentro de los llamados focos de fibroblastos y en células endoteliales. Se ha reportado que la MT3-MMP (MMP16) se incrementa en varias condiciones patológicas, incluyendo crecimiento de tumores primarios y metastásicos, artritis reumatoide y células de músculo liso vascular después de daño (106-108). La expresión de MT3-MMP en estas células se incrementa después del tratamiento con factor de crecimiento derivado de plaquetas o fibronectina. De manera adicional, se ha propuesto que MT3-MMP tiene un papel importante en la inducción de angiogénesis en células endoteliales de tejido endometrial (109). Sin

embargo, una de las funciones mejor establecidas para las MT-MMPs tipo I, es su capacidad de activar a la proMMP-2 (36,110). En este contexto, es importante el hallazgo de que la MMP-2 estuvo presente de igual manera, en células epiteliales alveolares y basales bronquiolares y que coincida con la localización de las MT-MMPs tipo I en pulmones fibróticos.

Estudios realizados con la MT3-MMP sin dominio transmembranal ha mostrado que la enzima truncada corta una variedad de componentes de la MEC, incluyendo colágena tipo III (108). Un importante mecanismo para controlar la actividad de las MT-MMPs en el espacio pericelular es mediado por la acción de los TIMPs. Sin embargo, contrario a las MMPs solubles, las cuales son casi igualmente inhibidas por todos los TIMPs (100-101), las MT-MMPs son altamente selectivas en sus interacciones con estos inhibidores. Por ejemplo, las MT-MMPs tipo I son pobremente inhibidas por el TIMP-1 pero son inhibidas eficientemente por TIMP-2, -3 y -4. El papel de los TIMPs en la activación de la proMMP-2, varía dependiendo de la MT-MMP (111). Así, los TIMPs no solo actúan inhibiendo la catálisis, sino que también tienen profundos efectos en el recambio de MT-MMPs (procesamiento e internalización), lo cual eventualmente regula la concentración de MT-MMPs maduras sobre la superficie celular.

#### **6.4 TIMP-3 se localiza en focos de fibroblastos en FPI.**

En cuanto a los TIMPs, el TIMP-3 junto con el TIMP-1 tuvo un nivel de expresión muy alto en pulmones seguido por el TIMP-2. Sin embargo, la expresión del TIMP-3 muestra una tendencia a incrementarse en FPI comparado con pulmones normales, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, probablemente porque el número de muestras es pequeño. Aunque en un estudio previo, utilizando PCR convencional, se encontró que los TIMPs estaban incrementados en fibroblastos de FPI comparados con los obtenidos de pulmones normales (112), en este estudio no se pudo confirmar este hallazgo. Esta discrepancia puede deberse a que ahora se utilizó un método cuantitativo. En este estudio mostramos por primera vez que el TIMP-3 está localizado en fibroblastos, presentes en los focos de fibroblastos de pulmón con FPI así como en células endoteliales. Como se mencionó anteriormente, los focos de fibroblastos/miofibroblastos son considerados como sitios activos de fibrogénesis durante el desarrollo de la FPI, pero las razones por las que esto resulta en un depósito aberrante e irreversible de la MEC se desconoce. La expresión de inhibidores potentes de MMPs como el TIMP-3, sugiere que este inhibidor pueda estar implicado en un microambiente poco degradativo, lo cual caracteriza a estos focos. Como evidencia de un papel pro-fibrótico para el TIMP-3, se ha observado que los ratones “knockout” de este inhibidor muestran alargamiento espontáneo de los espacios aéreos en

el pulmón y que los animales de edad avanzada muestran una cantidad reducida de colágena en pulmón (113).

### **6.5 El TIMP-3 y la MT3-MMP co-localizan en focos de fibroblastos.**

De manera interesante, se encontró que el TIMP-3 y la MT3-MMP se localizan en pulmones con FPI en fibroblastos de focos de fibroblastos/miofibroblastos y en células endoteliales; los focos de fibroblastos son considerados sitios activos de fibrogénesis, lo cual sugiere que pudieran estar cercanamente relacionados en FPI. También es interesante que, el TIMP-3 es un potente inhibidor de angiogénesis que bloquea la unión del Factor de Crecimiento vascular Endotelial (Vascular Endotelial Growth Factor, VEGF) a su receptor (receptor VEGF-2), propiedad que se ha observado ser independiente de su actividad inhibitoria de MMPs (114). Además de esto, recientemente se ha demostrado que los capilares están virtualmente ausentes en los focos de fibroblastos, sugiriendo que este proceso puede ser relevante para fibrogénesis (115-116). Así, la expresión del TIMP-3 angiostático por fibroblastos de estos focos de fibroblastos, como se demuestra en este estudio podría desempeñar un papel en la ausencia de capilares , lo cual caracteriza a estos focos. El TIMP-3 también fue encontrado unido a la MEC, primariamente a la lámina elástica alrededor de los vasos. El TIMP-3 se encuentra asociado con la MEC por medio de glicosaminoglicanos

sulfatados, especialmente heparan sulfato (117). Quizá debido a su proximidad a la membrana, se ha reportado que TIMP-3 puede inhibir más eficientemente a proteasas asociadas a membrana, incluyendo MT-MMPs (118) y miembros de las ADAMs (A Disintegrin Metalloproteinases) (119), incluyendo la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa (TACE; ADAM 17). En el caso específico de las MT-MMPs, estudios de cinética de inhibición muestran que el TIMP-3 es un inhibidor de alta afinidad para la MT3-MMP cuando se compara con la MT1-MMP; actualmente ha sido propuesto que de los miembros de la familia de los TIMPs, el TIMP-3 es el candidato con más posibilidades para inhibir MT3-MMP bajo condiciones fisiológicas (118).

#### **6.6 La MT3-MMP y el TIMP-3 se sobre-expresan por acción del TGF- $\beta$ en fibroblastos de pulmón.**

Observando que los fibroblastos de pulmón presentaron una alta expresión de la MT3-MMP, con respecto al tejido que muestra una moderada expresión, este dato sugiere que las células que elaboran principalmente esta enzima son justamente los fibroblastos. Como el TGF- $\beta$ 1 es un mediador de fibrogénesis crítico en FPI, se analizó su efecto sobre la expresión de MT-MMPs y TIMPs en fibroblastos de pulmón. Así, los fibroblastos de pulmón estimulados con el TGF- $\beta$ 1 revelaron incremento en la expresión tanto de la MT3-MMP como del TIMP-3. Esto no ha sido

descrito en la literatura, solo existe el antecedente de que células epiteliales de pulmón (en particular neumocitos tipo II de humano y una línea celular llamada A549), sobre-expresan al TIMP-3 bajo el estímulo de TGF- $\beta$  (120), lo cual fue corroborado en este estudio (datos no mostrados) para la línea A549. Tanto en células epiteliales como en los fibroblastos analizados, existe un nivel de expresión alto en células sin ningún estímulo, por lo que estos datos nos indican que TGF- $\beta$  puede desempeñar un papel relevante en la regulación de la MT3-MMP y el TIMP-3 en pulmón, sabiendo que este factor de crecimiento ejerce un papel fundamental en la fibrosis. Además, tanto para el TIMP-3 como para la MT3-MMP se encontró en los fibroblastos que la expresión de ambos fue consistente y significativamente sobre-regulada por TGF- $\beta$ 1 tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína. Resultados similares han sido reportados en condrocitos (121) donde TGF- $\beta$ 1 también incrementa la expresión del gene de TIMP-3. El grado de similitud en la inhibición por cicloheximida para TIMP-3, tanto a nivel de mRNA como de proteína, sugiere que la inhibición ejerce su efecto a niveles pre-traduccionales (figura 12b, carril 7).

### **6.7 La sobre-expresión de TIMP-3 por TGF- $\beta$ podría estar mediada por la vía de señalización de p38 MAPK.**

El conocimiento detallado de los genes blanco de TGF- $\beta$  y los mecanismos de señalización molecular involucrados en la inducción de dichos genes es

de profundo interés, ya que la alteración de alguna vía de señalización podría revertir la patología y en un futuro se emplearía como una terapia. Está documentado que TGF- $\beta$  puede activar diferentes vías de señalización, entre las cuales se encuentran las diferentes cascadas MAPK ( del inglés Mitogen-Activated Protein Kinases). Estas proteínas que son susceptibles de fosforilarse se clasifican en cuatro grupos: 1) ERK (extracellular signal-regulated kinases), 2) p38MAPK, 3) JNK (c-Jun N-terminal kinase) y 4) Big MAPK, también conocida como ERK5. Los mecanismos de activación de estas vías por TGF- $\beta$  están pobremente caracterizados. La genisteína es un inhibidor de la fosforilación de receptores con actividad sobre los residuos de Tyr. Para investigar una posible regulación diferencial de TGF- $\beta$ 1 sobre la inducción de la MT3-MMP y el TIMP-3 se utilizó a la genisteína, lo cual resultó en supresión de la expresión alcanzada con el TGF- $\beta$ , indicando que cinasas de tirosina se encuentran implicadas en este proceso. No es claro si el efecto primario de la genisteína es sobre p38 MAPK (porque la fosforilación del residuo Tyr en el motivo Thr-Gly-Tyr del asa de activación de p38, pudiera encontrarse asociada con la inhibición), o sobre otras enzimas que pudieran regular la activación de p38 MAPK por encontrarse directamente río arriba de esta; aunque los resultados obtenidos muestran que el bloqueo específico de p38 por SB203580 es crítico en la regulación del gene del TIMP-3, el hecho de encontrar una actividad parcial de fosfo-p38 en el pre-tratamiento con la genisteína (datos no mostrados) pudiera indicar que la afinidad de este fármaco es menor hacia p38 (en el caso de



que está fuera uno de sus blancos) ó que existen dos vías para fosforilar dicha enzima; se necesitan estudios adicionales para comprobar esta hipótesis. Como ya se comentó, SB203580 que es el inhibidor específico de la MAPK p38, inhibe el efecto del TGF- $\beta$ ; la activación de esta vía es realizada por varias MAPKKK (del inglés Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase); TAK-1 (de sus siglas en inglés TGF- $\beta$  activated kinase-1) podría activar a p38 a través de MKK-3/MKK6. La relación del TGF- $\beta$  con la vía de p38 es fuertemente apoyada por la fosforilación que ocurre en esta última, al estimular a las células con esta citosina. Por otro lado, PD98059 que es un inhibidor de MKK-1/2, que participa en la vía metabólica de ERK-1/2, no tuvo efecto alguno, y aunque el estímulo del TGF- $\beta$  provoca fosforilación de estas cinasas, los datos indican que esta vía no se encuentra involucrada en la sobre-expresión de los genes analizados. Así, estos datos sugieren que la inducción de la MT3-MMP y el TIMP-3 por TGF- $\beta$ 1 es mediada a través de la fosforilación en residuos Tyr y también sugieren que este efecto es mediado a través de la ruta de transducción de señales (al menos parcialmente) de la MAPK p38 y no por la ruta de las cinasas ERK 1/2. Además de estas vías, TGF- $\beta$  posee dos receptores (tipo I y tipo II) que son activados en residuos de ser y thr en sus dominios citoplásmicos, estos a su vez activan a las proteínas SMADs y esta vía puede activar o inhibir la señalización por este factor de crecimiento. Un experimento adicional (no mostrado), indica que la sobre-expresión del TIMP-3 por TGF- $\beta$  fue inhibida, al igual que con SB203580, por un fármaco

que bloquea la fosforilación del receptor I de TGF- $\beta$  (TBRI). Este dato sugiere fuertemente que existe una interacción entre la vía clásica de TGF- $\beta$  y la vía de p38. Será interesante examinar si la expresión de MT3-MMP es mediada también por dicha vía clásica y sus posibles interacciones, donde ciertos pasos involucran fosforilación de residuos Ser/Thr y Tyr (122-125).

## **VII. CONCLUSIÓN.**

Los resultados obtenidos confirman que existe expresión de las MT-MMPs tipo I y TIMPs en pulmones normales y fibróticos, y también en fibroblastos. Dicha expresión es diferencial y en fibroblastos, TGF- $\beta$  incrementa la expresión de MT3-MMP y TIMP-3. La presencia de estas moléculas en tejidos de pulmón con FPI sugiere que la MT3-MMP y el TIMP-3 participan en la remodelación tisular aberrante que caracteriza a la FPI y confirman que las células epiteliales regenerativas y los fibroblastos de los focos de fibroblastos están participando activamente en este proceso.

## **IX. REFERENCIAS.**

- 1.- Pardo A, Selman M. Matriz Extracelular en : Biología celular y molecular, págs: 515-540. Jiménez LF y Merchant H. eds. Prentice Hall, 2003.
- 2.- Aumalley M and Gayraud B (1998). Structure and biological activity of the extracellular matrix. **J Mol Med** 76: 253-65.
- 3.- Bosman FT and Stamenkovic I (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. **J Pathol** 200: 423-28.
- 4.- Rawlings N and Barret (1993). Evolutionary families of peptidases. **Biochem J** 290: 205-18.
- 5.- Uria JA and López-Otín C. (2000) Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. **Cancer Res** 60:4745– 51.
- 6.- Park HI, Ni J, Gerkema FE, Liu D, Belozarov VE, Sang QX. (2000) Identification and characterization of human endometase (matriz metalloproteinase-26) from endometrial tumor. **J Biol Chem** 275: 20540–44.

7.- Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, Van Wart H, Poole AR (1997). Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. **J Clin Invest** 99: 1534-45.

8.- Wu W, Billingham RC, Pidoux I, Antoniou J, Zukor D, Tanzer M, Poole AR (2002). Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13. **Arthritis Rheum** 46: 2087-94.

9.- Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G (1995). Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. **Biochem J** 309:299–306.

10.- Aimes RT and Quigley JP (1995). Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase: inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4 – and 1/4 -length fragments. **J Biol Chem** 270:5872–5876.

11.- Patterson ML, Atkinson SJ, Knäuper V, Murphy G (2001). Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. **FEBS Lett** 503: 158–162.

12.- Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA, Boumah CE, Kambouris M, Mayouf SA, Sheth KV, Eid WA, Dowling O, Harris J, Glucksman MJ, Bahabri S, Meyer BF, Desnick RJ (2001). Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. **Nat Genet** 28:261–265.

13.- Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H (1990). Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). **Biochemistry**. 29:10261–70.

14.- Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y (1997). Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. **J Biol Chem** 272: 2446–51.

15.- Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ (1993). Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. **J Biol Chem** 268:23824–29.

16.- Shipley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ, Shapiro SD (1996). Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. **PNAS** 93:3942–46.

17.- Péndas AM, Knäuper V, Puente XS, Llano E, Mattei MG, Apte S, Murphy G, López-Otín C (1997). Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. **J Biol Chem** 272: 4281–86.

18.- Kolb C, Mauch S, Peter HH, Krawinkel U, Sedlacek R 1997. The matrix metalloproteinase RAS1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid arthritis patient. **Immunol Lett** 57:83– 88.

19.- Li W, Gibson CW, Abrams WR, Andrews DW, DenBesten PK (2001). Reduced hydrolysis of amelogenin may result in X-linked amelogenesis imperfecta. **Matrix Biol** 19:755–760.

20.- Yang M and Kurkinen M (1998). Cloning and characterization of a novel matrix metalloproteinase (MMP), CMMP, from chicken embryo fibroblasts: CMMP, *Xenopus* XMMP, and human MMP19 have a conserved unique cysteine in the catalytic domain. **J Biol Chem** 273:17893–17900.

21.- Velasco G, Pendas AM, Fueyo A, Knäuper V, Murphy G, López-Otín C (1999). Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. **J Biol Chem** 274:4570–76.

22.- Pei D, Kang T, Qi H (2000). Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. **J Biol Chem** 275:33988–97.

23.- Marchenko GN and Strongin AY (2001). MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. **Gene** 265:87–93.

24.- Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC (2001). Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. **J Biol Chem** 276:10134–44.

25.- Saarialho-Kere U, Kerkela E, Jahkola T, Suomela S, Keski-Oja J, Lohi J (2002). Epilysin (MMP-28) expression is associated with cell proliferation during epithelial repair. **J Invest Dermatol** 119:14–21.

26.- Selman M, Pardo A. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of metallo-proteinases in Pulmonary Fibrosis. In: Linch JP, editor. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Marcel Decker, Inc; 2004. p 451-481.



27.- Brooks P C (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin  $\alpha_v\beta_3$ . **Cell** 85: 683–693.

28.- Dumin J A (2001). Procollagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the integrin  $\alpha_2\beta_1$  upon release from keratinocytes migrating on type I collagen. **J Biol Chem** 276: 29368–29374.

29.- Stricker T P (2001). Structural analysis of the  $\alpha_2$  integrin I domain/procollagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) interaction. **J Biol Chem** 276: 29375–29381.

30.- Yu Q and Stamenkovic I (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- $\beta$  and promotes tumor invasion and angiogenesis. **Genes Dev** 14: 163–76.

31.- Yu W H and Woessner J F Jr (2000). Heparan sulfate proteoglycans as extracellular docking molecules for matrilysin (matrix metalloproteinase 7). **J Biol Chem** 275: 4183–91.

32.- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. **Nature** 370: 61–65.

33.- Will H, Hinzmann B (1995). cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. **Europ J Biochem** 231: 602–608.

34.- Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M (1995). Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. **J Biol Chem** 270: 23013–20.

35.- Puente XS, Pendas AM, Llano E, Velasco G, Lopez-Otin C (1996). Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. **Cancer Res** 56: 944–49.

36.- Llano E, Pendas AM, Freije JP, Nakano A, Knauper V, Murphy G, Lopez-Otin C (1999). Identification and characterisation of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase A over-expressed in brain tumors. **Cancer Res** 59: 2570–76.

37.- Bernot A, Heilig R, Clepet C, Smaoui N, Da Silva C, Petit JL, Devaud C, Chiannilkulchai N, Fizames C, Samson D, Cruaud C, Caloustian C, Gyapay G, Delpech M, Weissenbach J (1998). A transcriptional map of the FMF region. **Genomics** 50: 147–60.

38.- Pei D (1999). Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage. **Cell Res** 9: 291–303.

39.- Velasco G, Cal S, Merlos-Suarez A, Ferrando AA, Alvarez S, Nakano A, Arribas J, Lopez-Otin C (2000): Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. **Cancer Res** 60: 877–82.

40.- Yana I and Weiss SJ (2000). Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. **Mol Biol Cell** 11: 2387–2401.

41.- Itoh Y, Kajita M, Kinoh H, Mori H, Okada A, Seiki M (1999). Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. **J Biol Chem** 274: 34260–66.

42.- Kojima S, Itoh Y, Matsumoto S, Masuho Y, Seiki M (2000). Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosylphosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP. **FEBS Lett** 480: 142–46.

43.- Cao J, Hymowitz M, Conner C, Bahou WF, Zucker S (2000). The propeptide domain of membrane type 1-matrix metalloproteinase acts as an intramolecular chaperone when expressed in trans with the mature sequence in COS1 cells. **J Biol Chem** 275: 29648–53.

44.- Imai K, Ohuchi E, Aoki T, Nomura H, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y (1996). Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2. **Cancer Res** 56: 2707–10.

45.- Cao J, Rehemtulla A, Bahou W, Zucker S (1996). Membrane type matrix metalloproteinase activates pro-gelatinase A with-out furin cleavage of the N-terminal domain. **J Biol Chem** 271: 30174–80.

46.- Sato T, Kondo T, Fujisawa T, Seiki M, Ito A (1999). Furin-independent pathway of membrane type 1-matrix metalloproteinase activation in rabbit dermal fibroblasts. **J Biol Chem** 274: 37280–84.

47.- D'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, Smith B, Timpl R, Zardi L, Murphy G (1997). Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 (MT1-MMP and MT2-MMP) exhibit a broad spectrum proteolytic capacity comparable to many matrix metalloproteinases. **Eur J Biochem** 250: 51–57.

48.- Butler GS, Will H, Atkinson SJ, Murphy G (1997). Membrane-type- 2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. **Eur J Biochem** 244: 653–57.

49.- Miyamori H, Takino T, Seiki M, Sato H (2000). Human membrane type-2 matrix metalloproteinase is defective in cell-associated activation of progelatinase A. **Biochem Biophys Res Commun** 267: 796–800.

50.- Nakahara H, Howard L, Thompson EW, Sato H, Seiki M, Yeh Y, Chen WT (1997). Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type-1 matrix metalloproteinase docking to invadopodia is required for cell invasion. **Proc Natl Acad Sci USA** 94: 7959–64.

51.- Urena JM, Merlos-Suarez A, Baselga J, Arribas J (1999). The cytoplasmic carboxy-terminal amino acid determines the subcellular localization of proTGF-(alpha) and membrane type matrix metalloprotease (MT1-MMP). **J Cell Sci** 112: 773–84.

52.- Lehti K, Valtanen H, Wickstrom S, Lohi J, Keski-Oja J (2000). Regulation of membrane-type-1 matrix metalloproteinase activity by its cytoplasmic domain. **J Biol Chem** 275: 15006–13.

53.- Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H (1999): MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. **Cell** 99: 81–92.

54.- Zhou Z, Apte SS, Soininen R, Cao R, Baaklini GY, Rauser RW, Wang J, Cao Y, Tryggvason K (2000): Impaired endo-chondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. **Proc Natl Acad Sci USA** 97: 4052–57.

55.- Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ (1998). Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. **Cell** 95: 365–77.

56.- Haas TL, Davis SJ, Madri JA (1998). Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. **J Biol Chem** 273: 3604–10.

57.- Komori K, Nonaka T, Okada A, Kinoh H, Hayashita-Kinoh H, Yoshida N, Yana I, Seiki M (2004). Absence of mechanical allodynia and AL- $\alpha$ 2- $\beta$ 1 sprouting after sciatic nerve injury in mice lacking membrane-type 5 matrix metalloproteinase. **FEBS Lett** 557: 125-128.

58.- Imai K, Ohuchi E, Aoki T, Nomura H, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y (1998). Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in as complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2. **Cancer Res** 56: 2707–10.

59.- Overall CM, Tam E, McQuibban GA, Morrison C, Wallon UM, Bigg HF, King AE, Roberts CR (2000). Domain interactions in the gelatinase A, TIMP-2, MT1-MMP activation complex. The ectodomain of the 44-kDa form of membrane type-1 matrix metalloproteinase does not modulate gelatinase A activation. **J Biol Chem** 275: 39497–506.

60.- Zucker S, Drews M, Conner C, Foda HD, DeClerck YA, Langley KE, Bahou WF, Docherty AJ, Cao J (1998). Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type-1 matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). **J Biol Chem** 273: 1216–22.

61.- Toth M, Bernardo MM, Gervasi DC, Soloway PD, Wang Z, Bigg HF, Overall CM, DeClerck YA, Tschesche H, Cher ML, Brown S, Mobashery S, Fridman R (2000). Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but

not with TIMP-4 to enhance the Membrane type 1 -MMP- dependent activation of proMMP-2. **J Biol Chem** 275: 41415–23.

62.- Wang Z, Juttermann R, Soloway PD (2000). TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 *in vivo*. **J Biol Chem** 275: 26411–15.

63.- Hernandez-Barrantes S, Toth M, Bernardo MM, Yurkova M, Gervasi DC, Raz Y, Sang QA, Fridman R (2000). Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase TIMP-2 regulates MT1-MMP processing and proMMP-2 activation. **J Biol Chem** 275: 12080–89.

64.- Maquoi E, Frankenne F, Baramova E, Munaut C, Sounni NE, Remacle A, Noel A, Murphy G, Foidart JM (2000). Membrane type 1 matrix metalloproteinase-associated degradation of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in human tumor cell lines. **J Biol Chem** 275: 11368–78.

65.- Pei D and Weiss SJ (1996). Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. **J Biol Chem** 271: 9135–40.



66.- Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y (1997). Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests inter-stitial collagens and other extracellular matrix macro-molecules. **J Biol Chem** 272: 2446–51.

67.- English WR, Puente XS, Freije JM, Knauper V, Amour A, Merryweather A, Lopez-Otin C, Murphy G (2000). Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate proMMP2. **J Biol Chem** 275: 14046–55.

68.- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochim Biophys Acta** 1477:267–83.

69.- Murphy G, Houbrechts A, Cockett MI, Williamson RA, O'Shea M, Docherty AJ (1991). The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. **Biochemistry** 30:8097–8102.

70.- Yu W H, Yu S, Meng Q, Brew K and Woessner J F Jr (2000). TIMP-3 binds to sulphated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. **J Biol Chem** 275: 31226-32.

71.- Amour A, Slocombe P M, Webster A, Butler M, Knight C G, Smith B J, Stephens P E, Shelley C, Hutton M, Knauper V (1998). TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. **FEBS Lett** 435: 39-44.

72.- Amour A, Knight C G, Webster A, Slocombe P M, Stephens P E, Knauper V, Docherty A J P and Murphy G (2000). The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. **FEBS Lett** 473: 275-79.

73.- Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H and Brew K (2001). TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). **J Biol Chem** 276: 12501-04.

74.- Ritter L M, Garfield S H and Thorgeirsson U P (1999). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) binds to the cell surface and translocates to the nucleus of human MCF-7 breast carcinoma cells. **Biochem Biophys Res Commun** 257: 494-499.

75.- Li H, Nishio K, Yamashita K, Hayakawa T and Hoshino T (1995). Cell cycle-dependent localization of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 immunoreactivity in cultured human gingival fibroblasts. **Nagoya J Med Sci** 58: 133-42.

76.- Corcoran M L and Stetler-Stevenson W G (1995). Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) stimulates fibroblast proliferation via a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-dependent mechanism. **J Biol Chem** 270: 13453-59.

77.- Wingfield P T, Sax J K, Stahl S J, Kaufman J, Palmer I, Chung V, Corcoran M L, Kleiner D E and Stetler-Stevenson W G (1999). Biophysical and functional characterization of full length recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) produced in *Escherichia coli*. **J Biol Chem** 274: 21362-68.

78.- Guedez L, Stetler-Stevenson W G, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A and Stetler-Stevenson M (1998). In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. **J Clin Invest** 102: 2002-10.

79.- Brand K, Baker A, Perez-Canto A, Possling A, Sacharjat M, Geheeb M and Arnold W (2000). Treatment of colorectal liver metastases by adenoviral transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 into the liver tissue. **Cancer Res** 60: 5723-5730.

80.- Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A, Onisto M, Santi L, Stetler-Stevenson W G and Albini A (1998). TIMP-2 over-

expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. **Int. J. Cancer** 75: 246-253.

81.- Ahonen M, Baker A H and Kahari V M (1998). Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasión and induces apoptosis in melanoma cells. **Cancer Res** 58: 2310-2315.

82.- Baker A H, Zaltsman A B, George S J and Newby A C (1998). Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1,-2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. **J Clin Invest** 101: 1478-87.

83.- Bond M, Murphy G, Bennett M R, Amour A, Knauper V, Newby A C and Baker A H (2000). Localization of the death domain of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 to the N terminus. Metalloproteinase inhibition is associated with proapoptotic phenotype. **J Biol Chem** 275: 41358-63.

84.- Smith M R, Kung H F, Durum S K, Colburn N H and Sun Y (1997). TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF-alpha receptors on the surface of human colon carcinoma cells. **Cytokine** 9: 770-80.

85.- Yang T-T and Hawkes S P (1992). Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89: 10676-80.

86.- Bond M, Murphy G, Bennett M R, Newby A C and Baker A H (2002). Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway. **J Biol Chem** 277: 13787-95.

87.- Alexander C M, Hansell E J, Behrendtsen O, Flannery M L, Kishnani N S, Hawkes S P and Werb Z (1996). Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. **Development** 122: 1723-36.

88.- Pardo A, Selman M. Molecular Mechanisms of Pulmonary Fibrosis. **Frontiers in Bioscience** 2002; 7:1689-1707

89.- Katzenstein AL, Myers JL (1998). Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. **Am J Respir Crit Care Med.** 157: 1301-1315.

90.- Selman M, King TE, Pardo A (2001). Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. **Ann Intern Med** 134:136-151.

91.- Selman M, Pardo A. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of metallo-proteinases in Pulmonary Fibrosis. J. P. Linch ed. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Marcel Decker, Inc. pp 451-481, 2004.

92.- 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 non-degradative lung microenvironment? **Am J Physiol** 279:L562-L574.

93.- Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, Lollini L, Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M, Heller RA. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. **Proc Natl Acad Sci USA** 99: 6292-6297, 2002.

94.- Selman M, Pardo A (2004). Idiopathic pulmonary fibrosis: misunderstanding between epithelial cells and fibroblasts? **Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis**; 21: 165-172.

95.- American Thoracic Society: Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS) and the European Respiratory Society (ERS). **Am J Respir Crit Care Med**. 2000; 161:646-664.

96.- Nuttall RK, Pennington CJ, Taplin J, Wheal A, Yong VW, Forsyth PA, Edwards DR (2003). Elevated membrane-type matrix metalloproteinases in gliomas revealed by profiling proteases and inhibitors in human cancer cells.

**Mol Cancer Res**; 1: 333-345.

97.- Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, Ferrans VJ, Travis WD (1996). Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. **Am J Pathol** 149:1241-1256.

98.- 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. **Lab Invest** 78:687-698.

99.- Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, Lollini L, Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M, Heller RA (2002). Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. **Proc Natl Acad Sci USA** 99:6292-6297.

100.- Zucker S, Pei D, Cao J, Lopez-Otin C (2003). Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). **Curr Top Dev Biol** 54:1-74.

101.- Hernández-Barrantes S, Bernardo M, Toth M, Fridman R (2002). Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases. **Semin Cancer Biol** 12:131-138.

102.- Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M, Lopez-Otin C, Shapiro S, Inada M, Krane S, Allen E, Chung D, Weiss SJ (2004). Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. **J Cell Biol** 167:769-781.

103.- Zucker S, Pei D, Cao J, Lopez-Otín C (2003). Membrane-type metalloproteinases (MT-MMP). **Curr Top Dev Biol**, 54: 1-74.

104.- Osenkowski P, Toth M, Fridman R (2004). Processing, shedding, and endocytosis of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). **J Cell Physiol** 200: 2-10.

105.- Remacle A, Murphy G, Roghi C (2003). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. **J Cell Science** 116: 3905-3916.

106.- Kahari VM, Saarialho-Kere U (1999). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. **Ann Med** 31:34-45.



107.- Pap T, Shigeyama Y, Kuchen S, Fernihough JK, Simmen B, Gay RE, Billingham M, Gay S (2000). Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** 43:1226–32.

108.- Shofuda K, Yasumitsu H, Nishihashi A, Miki K, Miyazaki K (1997). Expression of three membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in rat vascular smooth muscle cells and characterization of MT3-MMPs with and without transmembrane domain. **J Biol Chem** 272:9749–54.

109.- Plaisier M, Kapiteijn K, Koolwijk P, Fijten C, Hanemaaijer R, Grimbergen JM, Mulder-Stapel A, Quax PHA, Helmerhorst FM, Van Hinsbergh VWM (2004). Involvement of Membrane-Type Matrix Metalloproteinases (MT-MMPs) in capillary Tube Formation by Human Endometrial Microvascular Endothelial Cells: Role of MT3-MMP. **J Clin Endocrinol Metab** 89:5828-36.

110.- Hayashita-Kinoh H, Kinoh H, Okada A, Komori K, Itoh Y, Chiba T, Kajita M, Yana I, Seiki M (2001). Membrane-type 5 matrix metalloproteinase is expressed in differentiated neurons and regulates axonal growth. **Cell Growth Differ** 12:573-80.

111.- Butler GS, Will H, Atkinson SJ, Murphy G (1997). Membrane-type-2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. **Eur J Biochem** 244:653-657.

112.- Ramos C, Montaña M, García-Alvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, Pardo A (2001). Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and TIMP's expression. **Am J Respir Cell Mol Biol** 24:591-98.

113.- Leco KJ, Waterhouse P, Sanchez OH, Gowing KL, Poole AR, Wakeham A, Mak TW, Khokha R (2001). Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). **J Clin Invest** 108: 817-829.

114.- Qi JH, Ebrahim Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, Baker A, Anand-Apte B (2003). A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. **Nat Med** 9:407-15.

115.- Cosgrove GP, Brown KK, Schiemann WP, Serls AE, Parr JE, Geraci MW, Schwarz MI, Cool CD, Worthen GS (2004). Pigment epithelium-derived

factor in idiopathic pulmonary fibrosis: a role in aberrant angiogenesis. **Am J Respir Crit Care Med** 170:242-51.

116.- Ebina M, Shimizukawa M, Shibata N, Kimura Y, Suzuki T, Endo M, Sasano H, Kondo T, Nukiwa T (2004). Heterogeneous increase in CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med** 169:1203-08.

117.- Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF Jr (2000). TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. **J Biol Chem** 275:31226-32.

118.- Zhao H, Bernardo MM, Osenkowski P, Sohail A, Pei D, Nagase H, Kashiwagi M, Soloway PD, DeClerck YA, Fridman R (2004). Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. **J Biol Chem** 279:8592-601.

119.- Amour A, Slocombe PM, Webster A, Butler M, Knight CG, Smith BJ, Stephens PE, Shelley C, Hutton M, Knauper V, Docherty AJ, Murphy G (1998). TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. **FEBS Lett** 435:39-44.

120.- Hoshino Y, Tadashi M, Nagai S, Ito S, Shigematsu M, Izumi T (2001). Fibrogenic and inflammatory cytokines modulate mRNA expressions of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 in type II pneumocytes. **Respiration** 68: 509-516.

121.- Su S, DiBattista JA, Sun Y, Li WK, Zafarullah M (1998). Up-Regulation of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3 Gene Expression by TGF- $\beta$  in Articular Chondrocytes Is Mediated by Serine/Threonine and Tyrosine Kinases. **J Cell Biochem** 70:517–27.

122.- Roux PP and Blenis J (2004). ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a family of protein kinases with diverse biological function. **Microbiol Mol Biol Rev** 68: 320–44.

123.- Moriguchi T, Kuroyanagi N, Yamaguchi K, Gotoh Y, Irie K, Kano T, Shirakabe K, Muro Y, Shibuya H, Matsumoto K, Nishida E, Hagiwara M. A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. **J Biol Chem** 1996; 271:13675-13679.

124.- Robinson MJ and Cobb MH (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. **Curr Opin Cell Biol** 9: 180-6

125.- Saklatvala J (2004). The p38 MAP Kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. **Curr Opin Pharmacol** 4:372-7.

## **VIII. APÉNDICE**

**(Publicaciones derivadas de este  
trabajo).**

## Membrane type-matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis

Jorge García-Alvarez<sup>1</sup>, Remedios Ramirez<sup>1</sup>, Clara L. Sampieri<sup>2</sup>, Robert K. Nuttall<sup>2</sup>, Dylan R. Edwards<sup>2</sup>, Moisés Selman<sup>3</sup>, Annie Pardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, <sup>2</sup>School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, Norfolk, United Kingdom, <sup>3</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México

**Abstract.** *Background:* Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is characterized by fibroblast expansion and extracellular matrix accumulation. Some secreted matrix metalloproteinases (MMPs) as MMP2 are highly upregulated in IPF lungs. Membrane-type (MT)-MMPs participate in the activation of pro-MMP2. However, they have not been examined in IPF. *Methods:* Type I transmembrane MT-MMPs, MT1, MT2, MT3, and MT5-MMP were analyzed by real-time PCR and immunohistochemistry in IPF and normal lungs. MMP-2 was also immunolocalized and evaluated by gelatin zymography in BAL fluids. Additionally, the MT-MMPs were examined by real time PCR in lung fibroblasts stimulated with TGF- $\beta$ 1 and IFN- $\gamma$ . *Results:* MT1-MMP, was the most highly expressed followed by MT2- and MT5-MMP, and a moderate expression of MT3-MMP. Regarding their localization, MT1- and MT2-MMPs were found in alveolar epithelial cells, MT3-MMP in fibroblasts from fibroblastic foci and alveolar epithelial cells and MT5-MMP in basal bronchiolar epithelial cells and in areas of squamous metaplasia. MMP2 was localized in alveolar and basal bronchiolar epithelial cells and fibroblasts, and increased active enzyme was observed in BAL fluids. In lung fibroblasts, TGF- $\beta$ 1 induced a strong upregulation of MT3-MMP, both at the gene and protein level. This effect was blocked by genistein, a protein tyrosin kinase inhibitor and partially repressed by SB203580 a p38 MAP kinase inhibitor. IFN- $\gamma$  had no effect. *Conclusions:* MT-MMPs are expressed in IPF, in the same cell types as MMP2. Mostly by different types of epithelial cells a pivotal component in the aberrant remodeling of the lung microenvironment. Interestingly MT3-MMP that was found in fibroblastic foci was upregulated *in vitro* by TGF- $\beta$ 1 a potent profibrotic mediator. (*Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2006, 23: XX-XX)

**Key Words.** MMPs. Lung fibrosis. Epithelial cells. Fibroblastic foci.

Received: July 22, 2005

Accepted after Revision: October 25, 2005

Correspondence: Annie Pardo, Ph.D.

Facultad de Ciencias, UNAM

Apartado Postal 21-630, Coyoacan

México DF, CP 04000, México

Tel.: + 52 55 5622 1536

Fax: + 52 55 5622 1503

E-mail: aps@hp.fcencias.unam.mx

This work was supported by PAPIIT IN223401.

J.G.A. and C.L.S. funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Mexico.

## Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a complex disease of unknown etiology which produces a progressive and irreversible destruction of the lung parenchyma leading ultimately to death from respiratory failure. The sequence of the pathogenic mechanisms has not been elucidated but seems to include cyclic injuries and activation of the alveolar epithelium,

fibroblast/myofibroblast expansion, and an exaggerated extracellular matrix (ECM) accumulation [1-3].

Several members of the matrix metalloproteinases (MMPs) family have been shown to participate in the aberrant ECM remodeling observed in IPF lungs [4-7]. However, these studies have focused on secreted MMPs such as the gelatinases, the collagenases or matrilysin.

The human MMP family comprises 24 distinct proteolytic members that once activated are able to selectively degrade a wide spectrum of both ECM and non-matrix substrates [8]. Among them, the membrane type-MMPs (MT-MMPs) constitute a sub-family of plasma membrane-tethered MMPs that consist of six members. On the basis of their attachment to the plasma membrane, they can be classified as type I transmembrane enzymes which include: MT1-, MT2-, MT3-, and MT5-MMP and two glycosylphosphatidylinositol-anchored enzymes: MT4- and MT6-MMP [8-10]. Type I transmembrane MT-MMPs have a short cytoplasmic tail involved in the regulation of intracellular trafficking and activity of these proteases. By contrast GPI-anchored MT4- and MT6-MMP lack transmembrane and intracellular domains.

Membrane-anchoring confers to MT-MMPs a unique and complex array of regulatory processes that allow cells to control surface proteolytic events and it has been the focus of considerably research in recent years [9-11]. MT-MMPs are effective extracellular matrix-degrading endopeptidases that exhibit a broad spectrum of substrate affinity. It has been recently demonstrated that MT1-MMP is more efficient at processing triple-helical structures from fibrillar collagens than MMP1, suggesting an important role in ECM turnover [12].

Importantly, the major physiological activators of pro-MMP2 are the members of the type I transmembrane enzymes through complex interactions with TIMPs [10]. In this context, it is relevant to indicate that by oligonucleotide microarrays MMP2 gene expression has been found strongly upregulated [7] in IPF tissues and the active form is usually increased in bronchoalveolar lavage fluids [6].

However, with the exception of MT1-MMP there have been no studies on the expression and/or function of MT-MMPs in fibrotic lungs [6]. In this study we explored the expression and localization of

the four transmembrane-type enzymes, MT1-, MT2-, MT3-, and MT5-MMP that are known to activate proMMP2 and associate their localization with that of MMP2. Additionally, in order to analyze if the transcription of these MT-MMPs is differentially regulated in lung fibroblasts we analyzed their expression under basal conditions and after the stimulation with transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), a strong profibrogenic mediator and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) an antifibrogenic mediator [1-3].

## Material and methods

Lung samples from six IPF patients of the National Institute of Respiratory Diseases, Mexico were taken by open lung biopsy. Four were used for real time PCR studies and two for obtaining fibroblasts. The project was approved by the Ethics Committee, and informed consent was obtained from all subjects. Diagnosis of IPF was based on the ATS/ERS consensus and confirmed by open lung biopsy showing typical microscopic findings consistent with usual interstitial pneumonia [13]. Normal lungs from individuals who died of non-lung causes were utilized for immunohistochemistry. For real-time PCR, RNA from normal lungs was purchased from Stratagene (La Jolla, CA), and Ambion (Austin, TX).

### *Bronchoalveolar lavage zymography*

BAL was performed as previously described [14] using flexible fiberoptic bronchoscopy under local anesthesia. Aliquots of BAL supernatants containing 10  $\mu$ g of protein were analyzed by SDS-PAGE gels (8.5%) containing gelatin (1 mg/ml) and a final concentration of 0.3 mg/ml heparin [6]. Control samples were obtained from healthy volunteers.

### *Fibroblast culture*

Primary human lung fibroblasts were derived from IPF lungs (n = 2) and from patients undergoing removal of a lung tumor without histological evidence of disease (n = 3) [15]. These control fibroblasts were obtained from one smoker and two non-smoker subjects. None of the patients had evidence of chronic obstructive pulmonary disease. At passages 5-8, fibroblasts were plated on 100-mm dishes, serum-starved overnight and stimulated with 5 ng/ml TGF- $\beta$  alone or 1000 U/ml of IFN- $\gamma$ . In addition TGF- $\beta$  stimulated fibroblasts were pretreated with various inhibitors: genistein (50  $\mu$ M), SB203580 (10  $\mu$ M), and PD98059 (40  $\mu$ M) (Calbiochem-Novabiochem, San Diego CA).

### *RNA isolation and reverse transcription*

Total RNA was isolated from lung tissue biopsies or lysates according to the instructions provided with the Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad CA). Reverse transcription (RT) reactions contained 0.25 or 1  $\mu$ g of total RNA, 4x PCR buffer (Invitrogen), 1 mM deoxynucleotide triphosphates dATP, dGTP,



dCTP and dTTP (Roche), 40 units Rnasin Rnase Inhibitor (Promega), 2  $\mu$ l DTT (Invitrogen), 100 pmol of random hexamer oligodeoxynucleotides (Promega) and 200 units of reverse transcriptase (Super Script II RNase H Reverse Transcriptase Invitrogen), in a final reaction volume of 20  $\mu$ l.

#### Real-time PCR

For PCR reactions, specific primers and fluorogenic probes for all human MT-MMPs genes were designed as previously reported [16]. The 18S rRNA gene was used as an endogenous control to normalize for differences in the amount of total RNA in each sample; 18S rRNA primers and probe were purchased from PE Applied Biosystems.

Each PCR reaction contained: 8.33  $\mu$ l Taq Man Universal PCR master mix No AmpErase, 200 nM forward primer, 200 nM reverse primer, 100 nM probe and water for a total reaction volume of 25  $\mu$ l. PCR reactions were carried out in a ABI PRISM 7700 Sequence Detection System.

Standard curves were prepared for the genes and the 18S rRNA by serial dilutions. The relative quantity of the experimental samples was determined from the standard curve and divided by the quantity of endogenous control. The cycle number (termed cycle threshold, or CT) at which amplification entered the exponential phase was determined and this number was used as an indicator of the amount of target RNA in each tissue. A lower CT indicates a higher quantity of starting RNA [16].

#### Western blot

Lung fibroblasts serum-starved overnight non-stimulated or with 5 ng/ml TGF- $\beta$  were rinsed with were lysed in 250  $\mu$ l of RIPA buffer [50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.25% sodium deoxycholate, 0.1% NP40, 10  $\mu$ M leupeptin, 0.1  $\mu$ M 5-p-aminophenylmethanesulfonyl fluoride, and 1  $\mu$ M aprotinin] supplemented with 10 mM of EDTA to protect the active forms of MT3-MMP from degradation. The lysates were centrifuged at 300 X g at 4  $^{\circ}$ C for 30 min to remove cell debris. Samples were mixed with Laemmli sample buffer and electrophoresed on 12% SDS-polyacrilamide gels. Proteins were transferred to nitrocellulose filters at 15 V for 20 min using semi-dry transfer cell (BioRad). Non-specific sites were blocked overnight with 4% (w/v) non-fat dried milk in PBS. MT3-MMP recombinant catalytic domain (Chemicon, Temecula CA) was used as positive control. Membranes were incubated with anti human MT3-MMP rabbit IgG (10  $\mu$ g/ml; Chemicon, Temecula CA). Reaction with secondary antibody conjugated to peroxidase was for 1 h at room temperature. Finally, the filters were developed with the a chemiluminescence detection system (ChemiLucent<sup>TM</sup>; Chemicon, Temecula CA) according to the instructions of the manufacturer using Radiograph film (Hyperfilm, Amersham).

#### Immunohistochemistry

Tissue sections were treated as previously described [6, 14]. The following antibodies were used: Mouse anti MT1-MMP/MMP14 and anti MT2-MMP/MMP15 antibodies (10  $\mu$ g/ml; Calbiochem-Novabiochem International Cambridge, MA); rabbit anti MT3-MMP/MMP16 (20  $\mu$ g/ml; Chemicon, Temecula CA) and anti-MT5-MMP/MMP24 (20  $\mu$ g/ml; Triple Point Biologics Inc, Portland OR). Mouse anti-MMP2 (10

$\mu$ g/ml) was kindly donated by Rafael Fridman (Wayne State University Detroit MI). The sections were counterstained with hematoxylin. The primary antibody was replaced by non-immune serum for negative control slides.

## Results

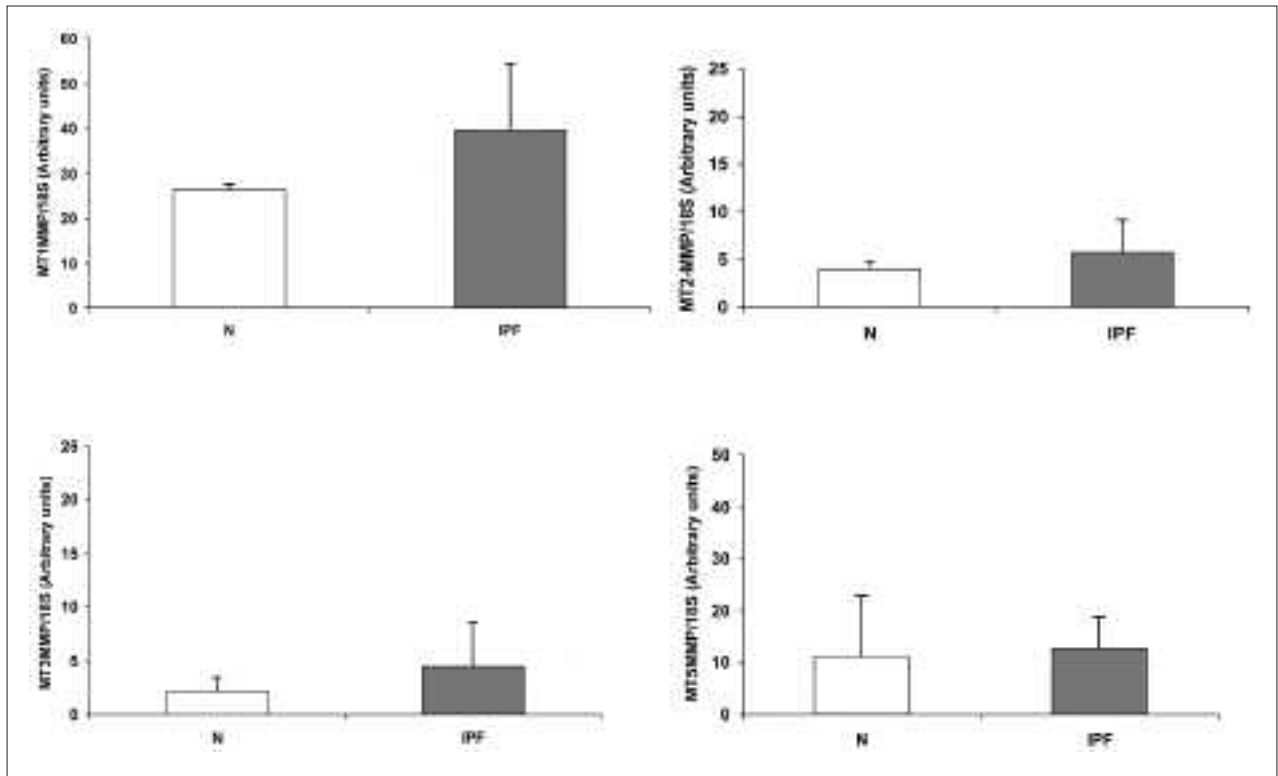
### MT-MMPs in IPF lungs

By real time PCR we used the cycle threshold to classify the gene expression as either very high (CT  $\leq$  25), high (CT = 26-30), moderate (CT = 31-35), low (CT = 36-39), or not detected (CT = 40). With this approach, we found that the most highly expressed MT-MMP in control and IPF lungs was *MT1-MMP*, followed with a high expression of *MT2-* and *MT5-MMPs*, and a moderate expression of *MT3-MMP*. The expression levels of the enzymes did not show significant statistical differences among control and pathologic lungs (*Fig. 1*).

Cell localization of MT1-, MT2-, MT3-, and MT5-MMP was examined by immunohistochemistry. As illustrated in *Figure 2*, MT1- and MT2-MMPs were primarily located in hyperplastic and hypertrophic alveolar epithelial cells (panels A and B). In addition, MT1-MMP was also observed in endothelial cells. MT3-MMP immunoreactive protein was found in IPF mainly expressed by fibroblasts in fibroblastic foci as well as by alveolar epithelial cells lining these foci (panel C). Also hyperplastic type II pneumocytes (panel D) and some endothelial cells in small capillaries were positively stained (D inset). Immunoreactive MT5-MMP was noticed primarily in basal bronchiolar epithelial cells (panel E), and also in some areas suggestive of early squamous metaplasia (panel F). In normal lungs MT-MMPs were barely detected as exemplified with MT1-MMP in panel G.

### Immunolocalization of MMP2 and BAL fluid gelatinolytic activity

As type I transmembrane MT-MMPs may activate pro MMP2 we decided to immunolocalize it in IPF lung sections where these MT-MMPs were positive. As shown in *Figure 3*, immunoreactive MMP2 was found in alveolar epithelial cells (panel A), in fibroblasts foci (panel B), and in bronchiolar epithelial cells (panels C and D). Normal lungs were usual-



**Fig. 1.** *MT1*-, *MT2*-, *MT3*- and *MT5*-MMPs gene expression by real time PCR in normal and IPF lungs.

Values on the ordinate are relative levels of gene expression compared with the expression of 18S rRNA. The values are arbitrary and cannot be compared between different genes. Each bar represents the mean  $\pm$  SD of 4 IPF and 2 normal lungs.

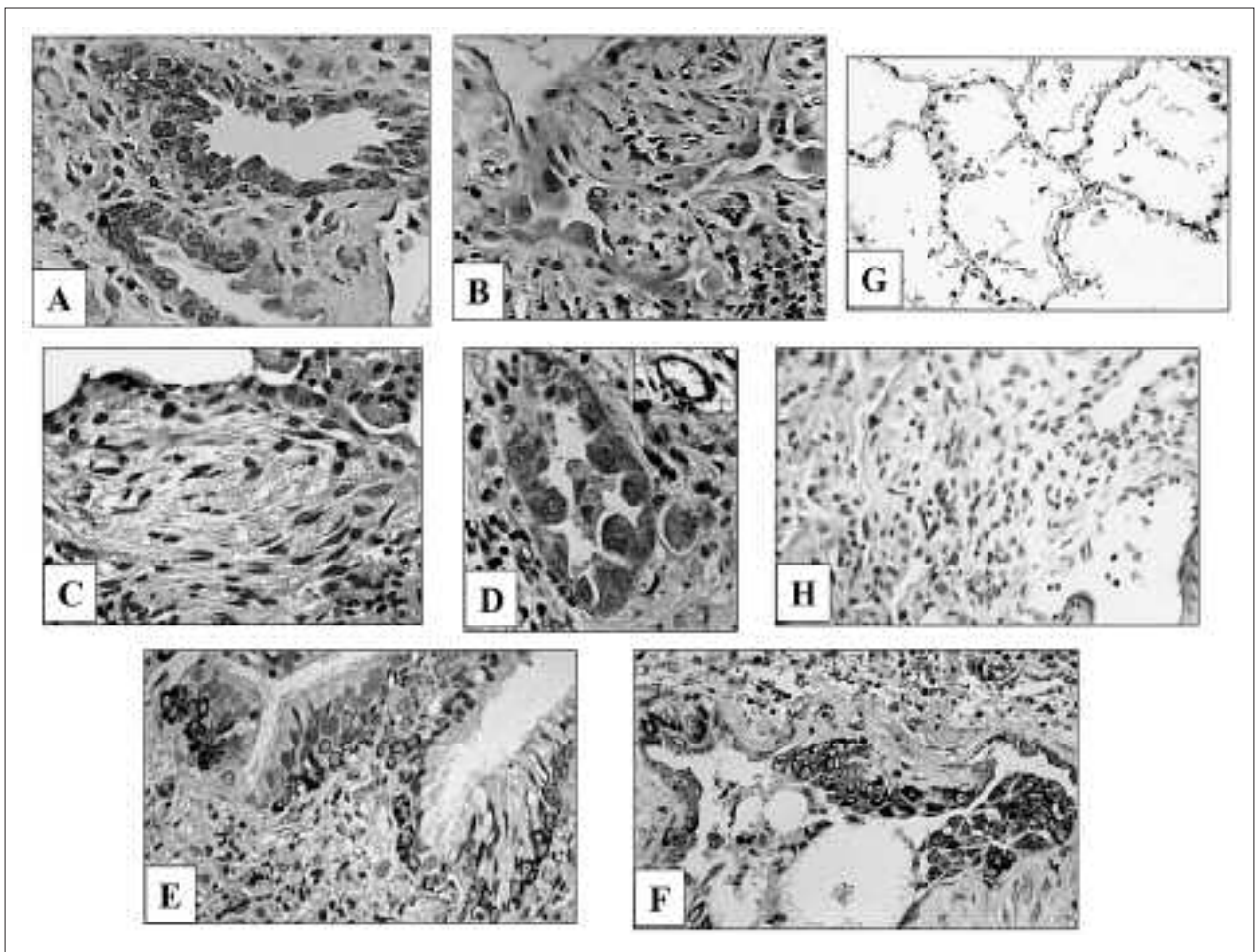
ly negative (panel E), although occasionally, isolated alveolar macrophages were stained.

In order to evaluate MMP-2 gelatinolytic activity, aliquots of lavage fluid from the same IPF patients were analyzed by gelatin substrate gel zymography. A representative gelatin zymogram comparing IPF BAL fluid with that from normal subjects is shown in *Figure 3F*. BAL normal samples (C) showed weak bands of pro-MMP2 and pro-MMP9 activities. IPF samples exhibited a clear increase of pro MMP9 and pro MMP2 activities as well as the activated forms of both enzymes.

#### *MTs-MMP expression in isolated lung fibroblasts*

We examined the expression levels of the four transmembrane MT-MMPs by real time PCR in three normal lung derived fibroblasts and two IPF derived fibroblasts. *MT1-MMP* was the most highly

expressed followed by *MT2*, *MT3*, and *MT5-MMPs* that presented a high expression. No differences were noticed between normal and IPF fibroblasts (not shown). We then analyzed the effect of TGF- $\beta$ 1 and IFN $\gamma$  on MT-MMPs expression (*Fig. 4*). In both normal and IPF lung fibroblasts *MT3-MMP* was strongly upregulated (4-fold over control) by TGF- $\beta$ 1. IFN $\gamma$  had no effect on MT-MMPs expression. In both, normal and IPF fibroblasts TGF- $\beta$ 1 stimulation was inhibited by genistein, partially blocked by SB203580, while PD98059 had no effect (*Fig. 5* upper panel). The effect of TGF- $\beta$ 1 was corroborated at the protein level. As illustrated in *Figure 5B* lower panel, Western blot analysis of the lysates of non-stimulated fibroblasts showed the presence of a low molecular form (~25-30 kDa) of MT3-MMP. This truncated form increased in fibroblasts stimulated with TGF  $\beta$ . Additionally, TGF  $\beta$  stimulated fibroblasts showed higher molecular forms (~50-65 kDa) probably corresponding to the complete enzyme.



**Fig. 2.** Localization of MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP and MT5-MMP in IPF lungs. Immunoreactive proteins were revealed with 3-amino-9-ethyl-carbazole and samples were counterstained with hematoxylin. Panels A and B: Intense epithelial staining of MT1-MMP and MT2-MMP in IPF lungs (original magnification, 40X). Panel C: IPF tissue exhibiting fibroblast and alveolar epithelial staining MT3-MMP (40X). Panel D: Hyperplastic type 2 pneumocytes strongly stained with MT3-MMP antibody (40X). Inset: Positive endothelial cells. Panels E and F: IPF lungs analyzed for MT5-MMP. Basal bronchiolar epithelial cells (E) and alveolar epithelial cells (F) show strong staining (40X). Panel G: Control lung for MT1-MMP showing no staining (40X). Panel H: Negative control section from IPF lung in which the primary antibody was omitted (40X).

## Discussion

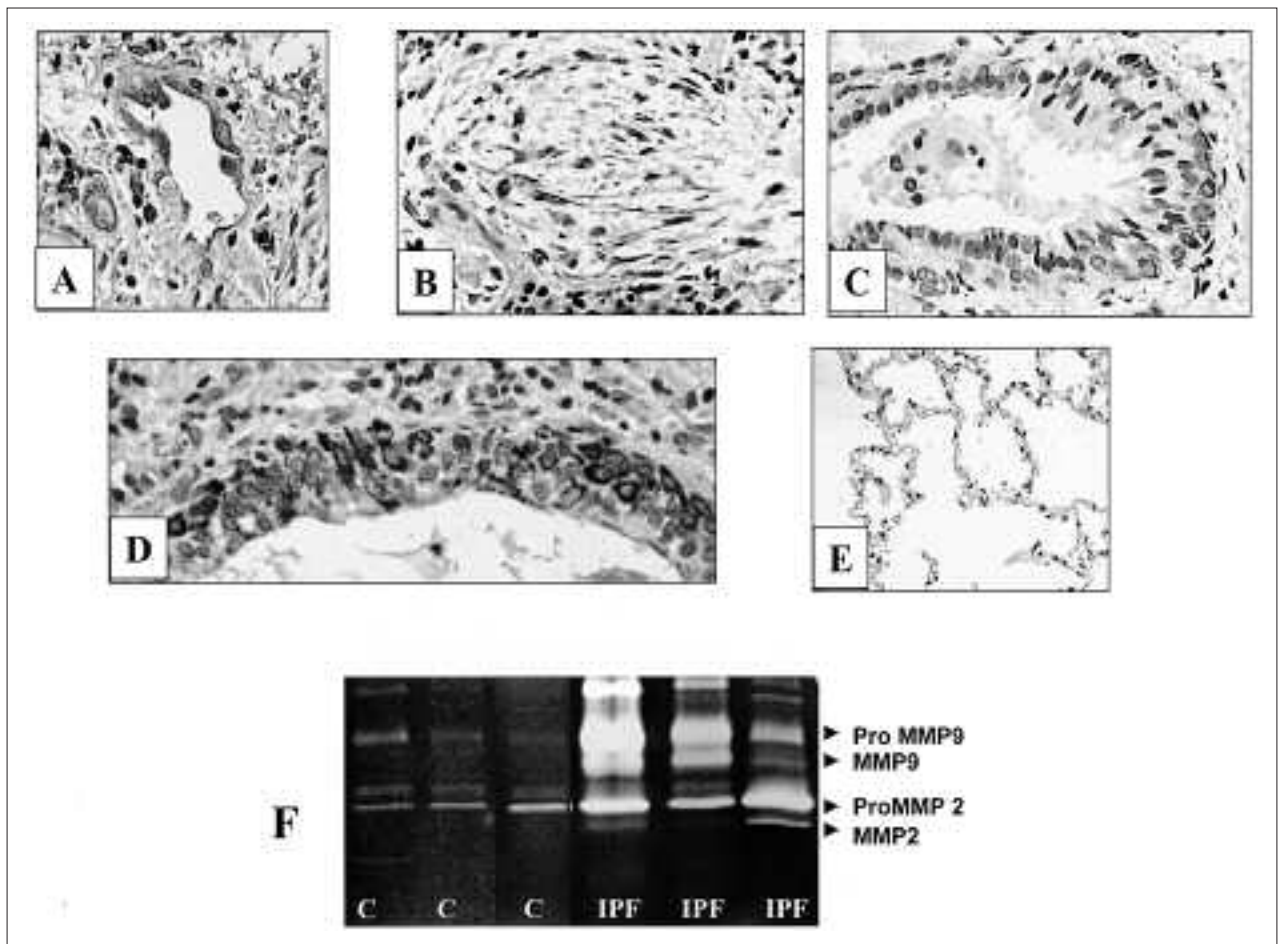
IPF is a chronic and progressive disease characterized by an aberrant tissue remodeling in which a growing body of evidence suggests that MMPs may play a role [4-7, 17]. Among others, MMP2 (gelatinase A) is usually increased in IPF lungs as we confirmed in this study. Thus, lavage fluids from IPF lungs showed a noteworthy increase of pro-MMP2 and relevant to this study of the active form of the enzyme as compared to controls.

MMP2 is synthesized, like all MMPs, as an inac-

tive zymogen that is activated at the cell surface through a trimolecular complex involving the type I transmembrane MT-MMPs and specific TIMPs [9, 10].

Research on MT-MMPs in disease has been focused to few disorders, primarily on cancer and their expression has been associated with malignant parameters. Consistent with their high expression in tumors, it has been demonstrated that MT-MMPs are critical in promoting cell migration, invasion, and angiogenesis [9, 10, 18-20].

In IPF lungs, with the exception of MT1-MMP,



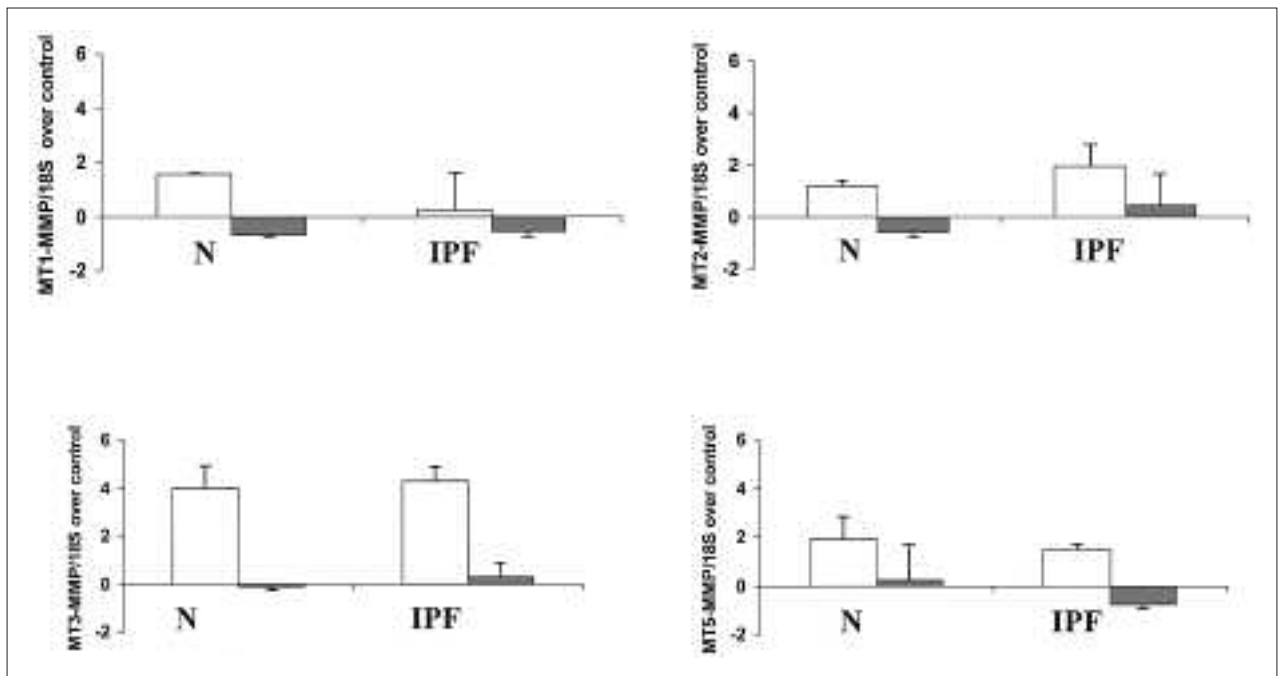
**Fig. 3.** Localization and activity of MMP2 in IPF lungs. Immunoreactive MMP2 was observed in alveolar epithelial cells (panel A), fibroblasts in fibroblastic foci (panel B), bronchiolar epithelial cells (panels C and D). Panel E: Normal lungs were usually negative. Panel F: Zymogram showing gelatinolytic activities in bronchoalveolar lavage of IPF patients and controls. Intense bands of MMP2 and MMP9 activities are observed in IPF.

other MT-MMPs had not been previously examined [6, 17]. In the present study we analyzed the expression at the transcriptional level *in vivo* and the localization of the four transmembrane MT-MMPs proteins as well as of MMP2. In addition, we analyzed MT-MMPs expression in lung fibroblasts and their transcriptional regulation by TGF- $\beta$  and IFN $\gamma$  *in vitro*.

We found a differential expression of the MT-MMPs in the lungs. Our results indicate that in both normal lung tissues as well as in IPF, MT1-MMP was the most highly expressed followed by MT2- and MT5- and lastly by MT3-MMP with a moderate expression.

In contrast to most secreted members of the MMP family the mRNAs for the six MT-MMPs are detectable in the extracts of many tissues [10]. In this study no differences were noticed among normal and IPF lungs at the transcriptional level as analyzed by real time PCR. This finding is supported by our recent cDNA microarray study in which all the genome was analyzed in IPF lungs (Selman *et al* submitted). Despite that no differences were found at gene expression levels among normal and IPF lungs, the immunoreactive proteins for MT1, MT2, MT3, and MT5-MMPs were clearly identified in IPF lungs, while they were barely detected in normal lungs.

Little is known about the posttranscriptional reg-



**Fig. 4.** Effect of TGF- $\beta$  and IFN $\gamma$  on *MT-MMPs* gene expression by fibroblasts.

Cells were treated with TGF- $\beta$  (white bars) and IFN $\gamma$  (dark bars) and MT1, MT2, MT3 and MT5-MMPs expression was determined by real-time PCR. Bars represent mean  $\pm$  SD from two independent experiments performed in three normal and two fibrotic cell lines. Results are expressed as fold increase compared to untreated cells.

ulation of these enzymes but considering that the MT-MMPs are membrane-bound enzymes, it has been proposed that processing, autocatalytic and non-autocatalytic ectodomain shedding and internalization, eventually determines the level of mature enzyme on the cell surface [11, 21].

In IPF we found that all the four MT-MMPs studied were expressed by alveolar epithelial cells, either in hyperplastic or flattened epithelium. Injured/activated epithelial cells play a central role in the pathogenesis of IPF, and actually, they synthesize most of the key cytokines and growth factors responsible for the fibroblasts migration, activation and differentiation to myofibroblasts [3]. Interestingly, MT5-MMP was also detected in basal (progenitor) bronchiolar epithelial cells and in some areas showing early squamous metaplasia.

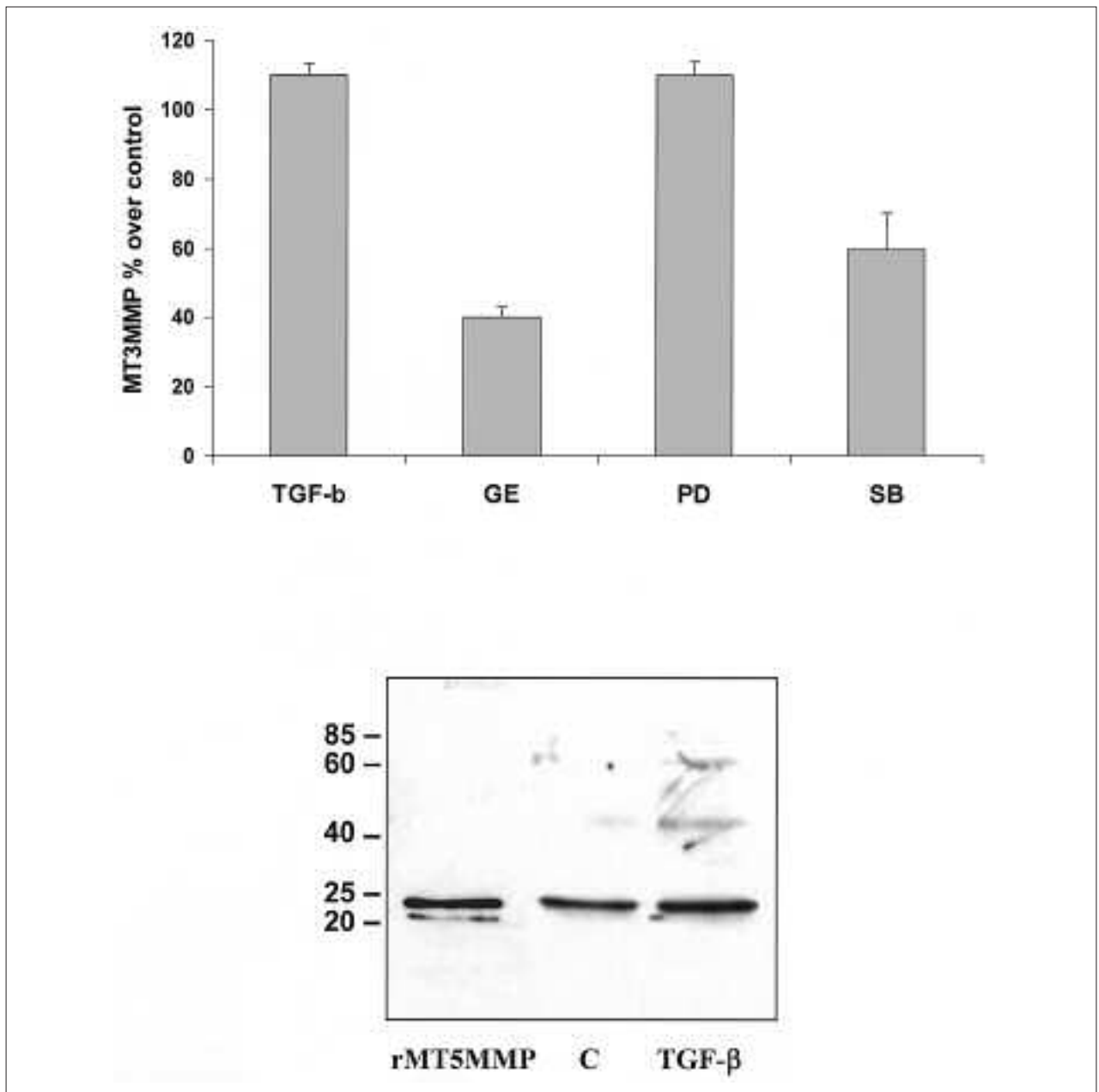
In addition to alveolar epithelial cells, MT3-MMP was also found in fibroblasts from fibroblastic foci and in endothelial cells. MT3-MMP (MMP16) has been reported to be increased in several pathological conditions, including primary and metastatic

tumor growth, rheumatoid arthritis, and vascular smooth muscle cells after injury [22-24]. Expression of MT3-MMP in these cells increased after treatment with platelet-derived growth factor or fibronectin. Additionally, it has been proposed that MT3-MMP plays an important role inducing angiogenesis in the endometrial tissue [25].

One of the best established functions for MT-MMP is its ability to activate pro-MMP2. In this context, it is important our finding that MMP2 was similarly present in IPF lungs as the different MT-MMPs in alveolar and bronchiolar epithelial cells, and in fibroblasts foci.

A major mechanism for controlling MT-MMP activity in the pericellular space is mediated by the action of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). However, as opposed to soluble MMPs, which are almost equally inhibited by all TIMPs, the MT-MMPs are highly selective for TIMP interactions [9, 10, 26].

Regarding lung fibroblasts it was interesting that MT3-MMP presented a high expression compared to



**Fig. 5.** Effect of TGF- $\beta$  on MT3-MMP gene and protein expression by fibroblasts. *Upper panel:* Cells were treated with 5 ng/ml TGF- $\beta$  alone or after pretreatment with the inhibitors, genistein (GE), MEK inhibitor PD98059 (PD), and p38 MAP kinase inhibitor SB203580 (SB). Bars represent mean  $\pm$  SD from two independent experiments performed in three normal cell lines. Results are expressed as percent increase compared to untreated cells. *Lower panel:* Western blot demonstrating an increase of immunoreactive MT3-MMP in lysates obtained from non-stimulated (C) and TGF $\beta$  stimulated fibroblasts. First line shows recombinant catalytic domain of MT3-MMP. Molecular weight markers are indicated at the left.

a moderate one in whole lung tissue, suggesting that the main source of this enzyme in IPF are the fibroblasts. Since TGF- $\beta$  is a critical mediator of fibrogenesis in IPF we analyzed its effect on MT-MMPs expression by lung fibroblasts. TGF- $\beta$  stimulated

fibroblasts, revealed increased expression of *MT3-MMP*. This effect was corroborated at the protein level where it was observed an increase of a low molecular form consistent with a truncation at the C-terminal end as it has been previously described [27].

To further define the differential regulation of TGF- $\beta$  on the induction of these molecules, we determined that genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor abolished this effect, while SB203580, a p38 MAPK inhibitor, partially inhibited it. Thus, these data strongly indicate that TGF- $\beta$ -induced MT3-MMPs is mediated through phosphorylation on tyrosine residues. In summary, our findings suggest that type I transmembrane MT-MMPs are implicated in IPF remodeling, and that additional to pro-MMP2 activation they might participate in other processes that need further exploration. However, with the exception of MT1-MMP, knowledge of the function roles of other MT-MMPs is very limited. It is important to emphasize that beside to their zymogen activation function MT-MMPs constitute a distinctive group of membrane-bound MMPs that are central mediators of cell surface events through proteolytic conversion of the proteins in the extracellular milieu.

## References

- Selman M, King TE, Pardo A: Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001; 134: 136-51.
- Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch JP 3rd, Martinez FJ: Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu Rev Med* 2004; 55: 395-417.
- Selman M, Pardo A: Idiopathic pulmonary fibrosis: misunderstanding between epithelial cells and fibroblasts? *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2004; 21: 165-72.
- Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, Yamanaka N: Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest* 1998; 78: 687-98.
- Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, et al: Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1996; 149: 1241-56.
- Selman M, Ruiz V, Cabrera S, et al: TIMP -1, -2, -3 and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing non degradative lung microenvironment? *Am J Physiol* 2000; 279: L562-74.
- Zuo F, Kaminski N, Eugui E, et al: Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6292-7.
- Puente XS, Sanchez LM, Overall CM, Lopez-Otin C: Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 544-58.
- Hernández-Barrantes S, Bernardo M, Toth M, Fridman R: Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 131-8.
- Zucker S, Pei D, Cao J, Lopez-Otin C: Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). *Curr Top Dev Biol* 2003; 54: 1-74.
- Osenkowski P, Toth M, Fridman R: Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J Cell Physiol* 2004; 200: 2-10.
- Minond D, Lauer-Fields JL, Nagase H, Fields GB: Matrix metalloproteinase triple-helical peptidase activities are differentially regulated by substrate stability. *Biochemistry* 2004; 43: 11474-81.
- American Thoracic Society: Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 646-64.
- Pardo A, Barrios R, Gaxiola M, et al: Increase of lung neutrophils in hypersensitivity pneumonitis is associated with lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1698-704.
- Pardo A, Selman M, Ramirez R, et al: Production of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases by fibroblasts derived from normal and fibrotic human lungs. *Chest* 1992; 102: 1085-9.
- Nuttall RK, Pennington CJ, Taplin J, et al: Elevated membrane-type matrix metalloproteinases in gliomas revealed by profiling proteases and inhibitors in human cancer cells. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 333-45.
- Selman M, Pardo A: Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of metalloproteinases in Pulmonary Fibrosis. In: Lynch JP (ed): Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Marcel Dekker Inc. 2004: 451-81.
- Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, et al: Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol* 2004; 167: 769-81.
- Sato H, Takino T, Okada Y, et al: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994; 370: 61-5.
- Llano E, Pendas AM, Freije JP, et al: Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase overexpressed in brain tumors. *Cancer Res* 1999; 59: 2570-6.
- Remacle A, Murphy G, Roghi C: Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. *J Cell Science* 2003; 116: 3905-16.
- Kahari VM, Saarialho-Kere U: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med* 1999; 31: 34-45.
- Pap T, Shigeyama Y, Kuchen S, et al: Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1226-32.
- Shofuda K, Yasumitsu H, Nishihashi A, Miki K, Miyazaki K: Expression of three membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in rat vascular smooth muscle cells and characterization of MT3-MMPs with and without transmembrane domain. *J Biol Chem* 1997; 272: 9749-54.
- Plaisier M, Kapiteijn K, Koolwijk P, et al: Involvement of Membrane-Type Matrix Metalloproteinases (MT-MMPs) in Capillary Tube Formation by Human Endometrial Microvascular Endothelial Cells: Role of MT3-MMP. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5828-36.
- Butler GS, Will H, Atkinson SJ, Murphy G: Membrane-type-2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Eur J Biochem* 1997; 244: 653-7.
- Zhao H, Bernardo MM, Osenkowski P, et al: Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem* 2004; 279: 8592-601.

## TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASE-3 IS UP-REGULATED BY TRANSFORMING GROWTH FACTOR- $\beta$ 1 IN VITRO AND EXPRESSED IN FIBROBLASTIC FOCI IN VIVO IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS

**Jorge García-Alvarez, Remedios Ramirez, and Marco Checa** □ *Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México*

**Robert K. Nuttall, Clara L. Sampieri, and Dylan R. Edwards** □ *School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, Norfolk, United Kingdom*

**Moisés Selman** □ *Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México DF, México*

**Annie Pardo** □ *Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México*

□ *Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is characterized by fibroblast expansion and extracellular matrix accumulation. However, the mechanisms involved in matrix remodeling have not been elucidated. In this study, the authors aimed to evaluate the expression of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) in human fibroblasts and whole tissues from IPF and normal lungs. They also determined the role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in TIMP3 expression. TIMP1, TIMP2, and TIMP3 were highly expressed in lung fibroblasts. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1, a profibrotic mediator, induced strong up-regulation of TIMP3 at the mRNA and protein levels. The authors examined whether the MAPK pathway was involved in TGF- $\beta$ 1-induced TIMP3 expression. TGF- $\beta$ 1 induced the phosphorylation of p38 and extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2. Biochemical blockade of p38 by SB203580, but not of the ERK MAPK pathway, inhibited the effect of this factor. The effect was also blocked by the tyrosine kinase inhibitor genistein and by antagonizing TGF- $\beta$ 1 receptor type I (activin-linked kinase [ALK5]). In IPF tissues TIMP3 gene expression was significantly increased and the protein was localized to fibroblastic foci and extracellular matrix. Our findings suggest that TGF- $\beta$ 1-induced TIMP3 may be an important mediator in lung fibrogenesis.*

**Keywords** fibroblastic foci, lung fibrosis, TGF- $\beta$ , TIMPs

Received 3 August 2005; accepted 21 April 2006.

This work was supported by PAPIIT IN223401. J.G.A and C.L.S. are funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Mexico. The authors thank Dr. Naftali Kaminski for the analysis of microarray TIMP results.

Address correspondence to Annie Pardo, PhD, Facultad de Ciencias, UNAM, Apartado Postal 21-630, Coyoacan, México DF, CP 04000, México. E-mail: aps@hp.fciencias.unam.mx



Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and usually lethal lung disorder characterized by fibroblast proliferation and abnormal accumulation of extracellular matrix (ECM) [1]. An important morphologic feature in this disorder is the presence of fibroblastic/myofibroblastic foci, which are widely dispersed throughout the lung parenchyma [2]. These foci seem to represent microscopic zones of acute lung injury where fibroblasts migrate, proliferate, differentiate into myofibroblasts, and contribute to the exaggerated deposit of ECM molecules in the lung parenchyma.

Lung remodeling is a complex process involving a number of molecular and cellular factors. Several studies have suggested the active participation of different members of the family of matrix metalloproteinases (MMPs) in the aberrant ECM remodeling observed in IPF lungs [3–6]. Importantly, activated MMPs can be inhibited by interaction with tissue-specific inhibitors, namely the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs). The four members of this family, TIMP1 to TIMP4, have in common their matrix metalloproteinases inhibitory action; however, they differ in some other properties such as pro-MMP activation, cell growth, and cell survival-promoting activity, matrix binding, inhibition of angiogenesis, and induction of apoptosis. Thus, TIMP1 and TIMP2 have cell growth-promoting and antiapoptotic activities, whereas TIMP3 shows proapoptotic activity [7–9].

The balance between MMPs and TIMPs has been implicated in both normal and pathological events, including wound healing and tissue remodeling. However, studies regarding the role of TIMPs in human lung fibrosis including IPF are scanty. It has been suggested that TIMP1 plays a pivotal role in animal models. For example, transient exposure to active transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 induced severe lung fibrosis in C57BL/6 mice compared with Balb/c mice, which was primarily due to a considerable up-regulation of TIMP1 in the lungs of the susceptible mice [10]. Likewise, protection against silica-induced lung fibrosis in mice deficient in tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) receptors was associated with a decreased expression of TIMP1 [11]. Similar results have also been reported also in a rat model of pulmonary fibrosis induced by paraquat plus hyperoxia [12].

In this study, we used real-time polymerase chain reaction (PCR) to examine the expression of the 4 TIMPs in fibroblasts derived from normal and IPF lungs under basal conditions, and after stimulation with TGF- $\beta$ 1, a strong profibrotic factor [1], and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), an antifibrotic mediator [13]. We also evaluated mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling for TIMP3 TGF- $\beta$  induction. In addition, we determined the gene expression of the 4 TIMPs *in vivo* in human normal and IPF lungs.

## MATERIAL AND METHODS

The project was approved by the Ethics Committee, and informed consent was obtained from all subjects. Diagnosis of IPF was based on the American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS) consensus and confirmed by open lung biopsy showing typical microscopic findings consistent with usual interstitial pneumonia [2].

### Fibroblast Culture

Primary human lung fibroblasts were derived from IPF lungs ( $n = 2$ ) and from normal lungs ( $n = 3$ ). The later were obtained from patients undergoing removal of a lung tumor without histological evidence of disease [14]. At passages 5 to 8, fibroblasts were plated on 100-mm dishes, serum-starved overnight, and stimulated with 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1, a powerful profibrotic mediator [1], or with 1000 U/mL of IFN- $\gamma$ , an antifibrotic cytokine [13]. Additionally, TGF- $\beta$ 1 stimulated fibroblasts were pretreated with various inhibitors: 50  $\mu$ M genistein (protein tyrosine kinase inhibitor), 10  $\mu$ M SB203580 (p38 MAPK inhibitor), 40  $\mu$ M PD98059 (inhibitor of MEK1/2) (Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA), and 10  $\mu$ M TGF- $\beta$  receptor type I (activin-linked kinase [ALK5]) inhibitor.

### RNA Isolation and Reverse Transcription

Total RNA was isolated from fibroblast lysates, according to the instructions provided with the Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Each reaction was preincubated with random hexamer oligodeoxynucleotides at 70°C for 10 minutes and the reverse transcription reaction was performed at 42°C for 60 minutes. Reverse transcription (RT) reactions, in a final volume of 20  $\mu$ L, contained 0.25 or 1  $\mu$ g of total RNA, 4 $\times$  PCR buffer (Invitrogen), 1 mM deoxynucleotide triphosphates dATP, dGTP, dCTP, and dTTP (Roche), 40 units Rnasin Rnase Inhibitor (Promega), 2  $\mu$ L dithiothreitol (DTT) (Invitrogen), 100 pmol of random hexamer oligodeoxynucleotides (Promega), and 200 units of reverse transcriptase (Super Script II RNase H Reverse Transcriptase; Invitrogen). Samples were then stored at -20°C until used for real-time PCR.

### Real-Time PCR for RNA from Cultured Fibroblasts

For PCR reactions, specific primers and fluorogenic probes for all human TIMP genes were designed as previously reported [15]. The 18S rRNA gene was used as an endogenous control to normalize for differences in the amount of total RNA in each sample; 18S rRNA primers and probe

were purchased from PE Applied Biosystems. Each PCR reaction contained 8.33  $\mu$ L Taq Man Universal PCR master mix No AmpErase, 200 nM forward primer, 200 nM reverse primer, 100 nM probe, and water for a total reaction volume of 25  $\mu$ L. PCR reactions were carried out in a ABI PRISM 7700 Sequence Detection System.

Standard curves were prepared for the genes and the 18S rRNA by serial dilutions. The relative quantity of the experimental samples was determined from the standard curve and divided by the quantity of endogenous control. The cycle number (termed cycle threshold or Ct) at which amplification entered the exponential phase was determined and this number was used as an indicator of the amount of target RNA in each tissue. A lower Ct indicates a higher quantity of starting RNA [15].

### **Western Blot**

Fibroblasts were harvested, washed, and homogenized using sonication. For immunoblot analysis of phosphorylated proteins the cells were lysed with phosphosafe extraction reagent (Novagen, WI) using proteases inhibitors (protease inhibitor cocktail Sep V, EDTA-free; Calbiochem). Aliquots were subjected to sodium dodecyl sulfate (SDS) gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK). Membranes were treated with anti p38 $\alpha$  MAPK, and anti-phospho-p38 MAPK rabbit antibodies (Chemicon, Temecula, CA), anti-ERK1/2 MAPK, and anti-phospho ERK1/2 MAPK rabbit antibodies (Calbiochem, La Jolla, CA), or anti-human TIMP3 mouse immunoglobulin G (IgG) (Chemicon, Temecula, CA), as previously described [16]. Bands were quantitated by densitometric scanning using a digital photographic system (DC 120 digital Kodak) and the Kodak digitalis Science DC1 software.

### **RNA Isolation from Lung Tissues and DNA Microarray Analysis**

RNA was extracted from frozen lung tissues of 10 IPF patients and 6 controls using TRIzol reagent and protocols (Invitrogen). The resulting total RNA was converted into biotinylated cRNA using standard protocols and the Superscript Choice system for cDNA generation (Invitrogen) and the T7 MegaScript system (Ambion, Austin, TX) for labeled cRNA generation. The labeled cRNA was hybridized to a custom Affymetrix oligonucleotide DNA microarray using standard Affymetrix protocols [17]. The custom array, Hu03, contains 59,619 probesets representing an estimated 46,000 gene clusters. Statistical analyses were performed using ScoreGenes software package (<http://compbio.cs.huji.ac.il/scoregenes/>). For data mining and visualization we used Genomica (<http://genomica.weizmann.ac.il/>) and Spotfire Decision Site 8.0 (Spotfire, Göteborg, Sweden). The

general approach to analysis has been outlined by us [18, 19]. Only transcripts that had an Entrez Gene annotation were included in the analysis.

### Immunohistochemistry

Tissue sections from IPF and controls were treated as previously described [5]. Mouse anti-human TIMP3 (20 µg/mL) (Calbiochem, La Jolla, CA) was applied and samples were incubated at 4°C overnight. A secondary biotinylated anti-immunoglobulin followed by horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (BioGenex, San Ramon CA) was used according to manufacturer's instructions. 3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC; BioGenex) in acetate buffer containing 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used as substrate. The sections were counterstained with hematoxylin. The primary antibody was replaced by nonimmune serum for negative-control slides.

### Statistical Analysis

Results are expressed as mean ± SD. To determine significant differences a 2-way analysis of variance (ANOVA) and the Mann-Whitney *U* test was employed. For microarray analysis the Student *t* test, was applied.

## RESULTS

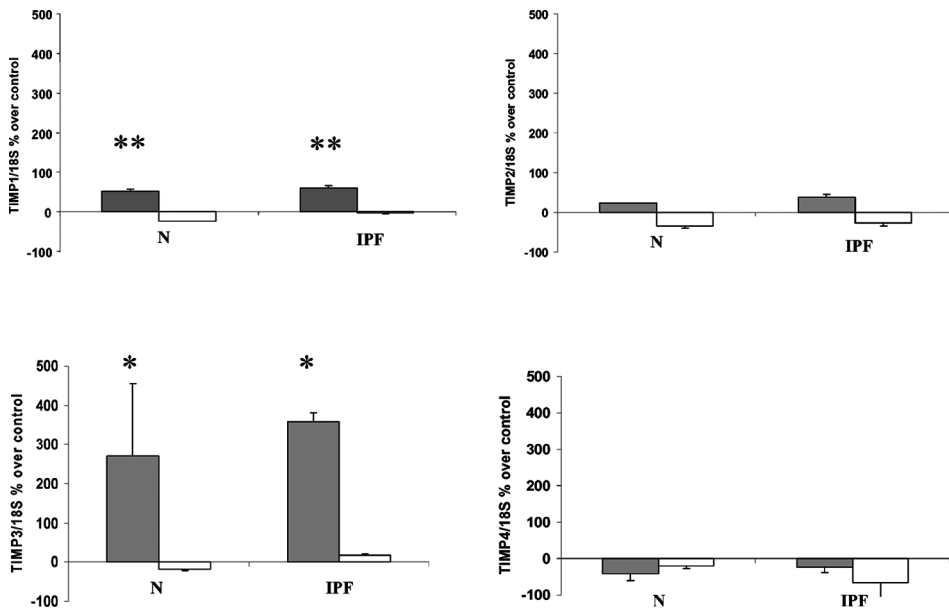
### TIMP Expression by Fibroblasts In Vitro

Expression levels were classified according to the Ct of each gene as: very high (Ct ≤ 25), high (Ct = 26–30), moderate (Ct = 31–35), low (Ct = 36–39), or not detected (Ct = 40). Under basal conditions normal and IPF lung fibroblasts revealed, using quantitative real-time PCR, very high expression of TIMP1, TIMP2, and TIMP3, whereas TIMP4 had a moderate expression. No differences were observed between IPF and normal cell lines (Table 1). We then evaluated the regulation of TIMPs in normal and IPF fibroblasts by TGF-β1 and IFN-γ (Figure 1). TGF-β1 induced a

**TABLE 1** Cycle Threshold (Ct) Values of TIMPs in Lung Fibroblasts under Basal Conditions

	TIMP1	TIMP2	TIMP3	TIMP4	18s
N1	21.91	21.37	22.42	31.78	14.14
N2	23.6	23.08	23.8	31.18	14.24
N3	22.62	22.13	22.31	31.91	14.07
IPF1	23.76	23.22	23.58	31.54	14.94
IPF2	22.74	22.28	22.37	31.41	14.77

N = normal; IPF = idiopathic pulmonary fibrosis.

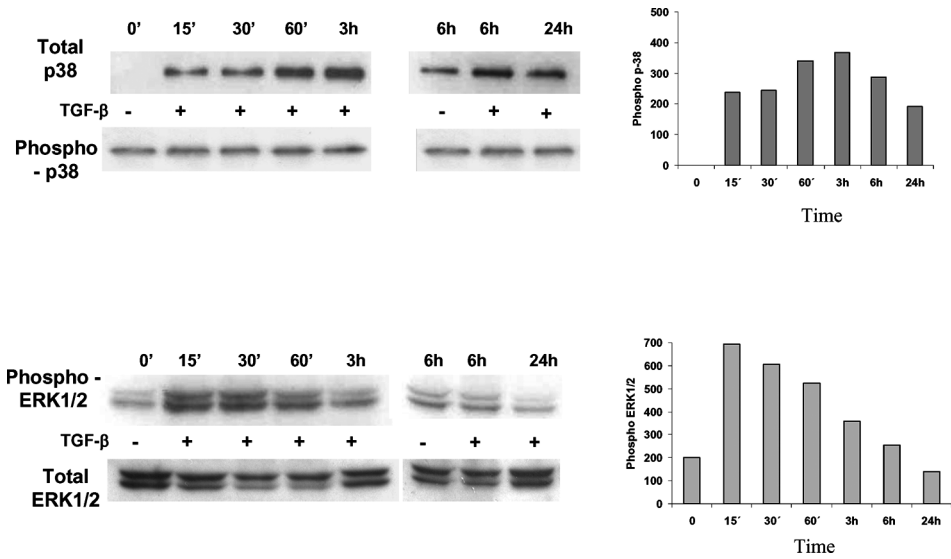


**FIGURE 1** Effect of TGF- $\beta$  and INF- $\gamma$  on TIMP gene expression by fibroblasts. Cells were treated with 5 ng/mL TGF- $\beta$  or 1000 U/mL INF- $\gamma$  and the expression of TIMP1, TIMP2, TIMP3, and TIMP4 was determined by real-time PCR in three normal (N) and two fibrotic cell lines (IPF). Values show the mean  $\pm$  SD of 3 experiments and represent the percentage increase in expression relative to the vehicle control. Grey bars show the effect of TGF- $\beta$  and white bars the effect of INF- $\gamma$ . \* $P < .01$ ; \*\* $P < .05$ .

statistically significant increase of TIMP3 (90% to 600% over control,  $P < .01$ ), whereas the source of the fibroblast (IPF or normal) had no effect ( $P = .32$ ). TGF- $\beta$  induced a lower but also significant increase of TIMP1 (40% to 70% over control,  $P < .05$ ). No differences were observed among the normal and the IPF-derived fibroblasts. No significant effect was observed on TIMP2 and TIMP4 expression. INF- $\gamma$  had no effect on TIMPs expression (Figure 1).

### Activation of p38 and ERK1/2 in Lung Fibroblasts by TGF- $\beta$ 1

Some of the biological actions of TGF- $\beta$ 1 are mediated by activation of MAPK signaling pathways. We evaluated the potential role of MAPKs on TGF- $\beta$ 1-induced TIMP3 expression by analyzing the effect of this factor on the phosphorylation of p38 and ERK. As exemplified in Figure 2 for normal lung fibroblasts, TGF- $\beta$ 1 increased the phosphorylation of p38 MAPK at 15 minutes of stimulation, which remained phosphorylated for 24 hours. No changes were observed in the total amount of p38 MAPK. After stimulation with TGF- $\beta$ 1, ERK1/2 phosphorylation increased from 15 minutes

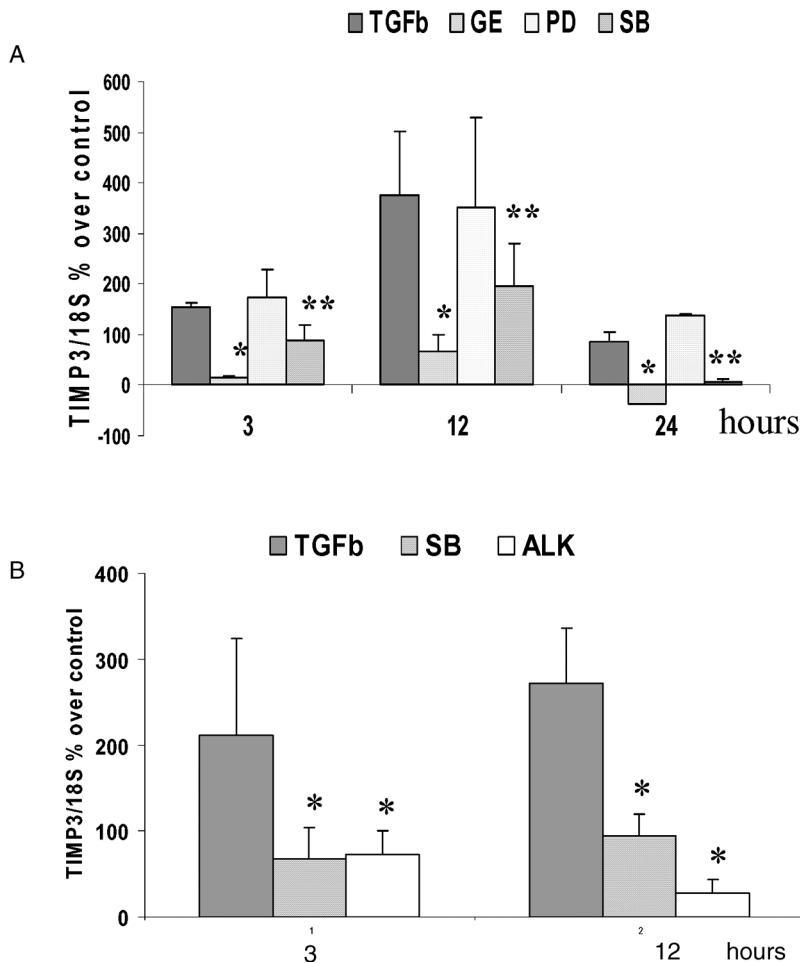


**FIGURE 2** MAPK pathway activation by TGF- $\beta$ 1. Human normal lung fibroblasts were incubated with TGF- $\beta$ 1 for 15 minutes to 24 hours. A representative result of 2 experiments is illustrated. Upper panel shows phosphorylation of p38 MAPK as well as total p38 from cellular extracts as determined by Western blot. Bottom panel shows phosphorylation of ERK1/2 MAPK and total ERK1/2 from cellular extracts. Bar graphs show the densitometric quantitation of p38 and ERK2 phosphorylation at the various time points. Each bar represents the average value obtained from 2 independent experiments.

until 60 minutes, declining thereafter. No changes in total ERK 1/2 proteins were observed.

We examined the effect of inhibiting the different MAPK routes on TGF- $\beta$ 1-induced TIMP3 expression in 1 normal and 1 IPF-derived cell line. Preincubation of fibroblasts with SB203580, a specific inhibitor of p38 MAPK, significantly reduced TGF- $\beta$ 1-induced TIMP3 expression ( $P < .05$ ; Figure 3A and B). By contrast, PD98059, an ERK1/2 MAPK route inhibitor, failed to inhibit TGF- $\beta$ 1-induced TIMP3 mRNA expression (Figure 3A). Additionally, the protein tyrosine kinase inhibitor genistein also abolished TGF- $\beta$ 1 effect at 3, 12, and 24 hours ( $P < .001$ ). The inhibition of signaling of type I serine/threonine kinase receptor for TGF- $\beta$  superfamily (ALK5) blocked the effect of this mediator on TIMP3 expression (Figure 3B).

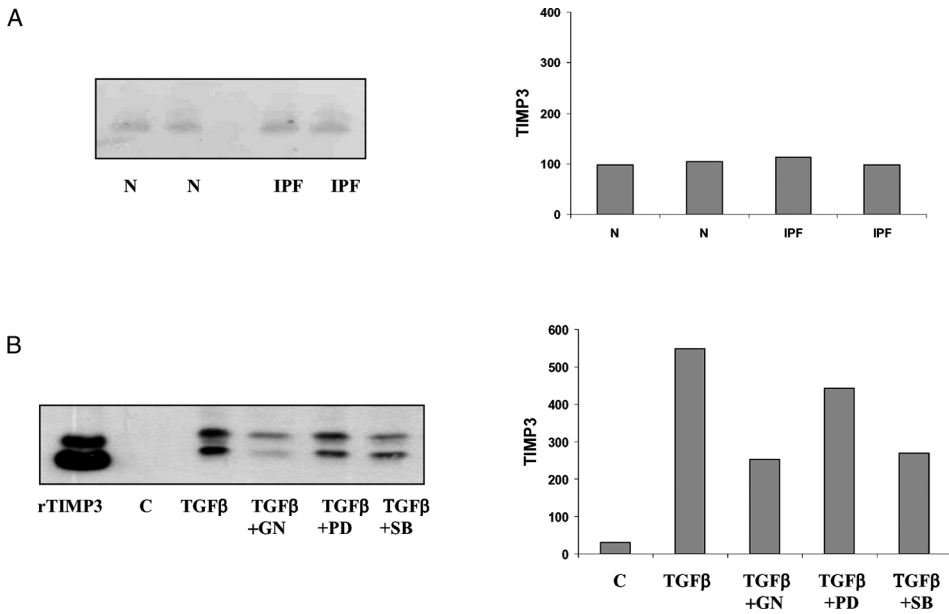
To investigate if the RNA was translated into the corresponding protein, Western immunoblot analysis was performed in conditioned medium after 24 hours of TGF- $\beta$ 1 stimulation. As illustrated in Figure 4A, both IPF and normal lung fibroblasts produced TIMP3 under basal conditions. TGF- $\beta$ 1 induced an up-regulation of the protein and, as shown at the RNA level, genistein inhibited induction of the TIMP3 by TGF- $\beta$ , whereas SB203580 partially inhibited it and PD98059 had no effect (Figure 4B).



**FIGURE 3** Effect of TGF- $\beta$  on TIMP-3 gene expression by fibroblasts. (A) Time course shows the effect of 5 ng/mL TGF- $\beta$  alone or after pretreatment with the inhibitors, genistein (GE), MEK inhibitor PD98059(PD), and p38 MAP kinase inhibitor SB203580 (SB). Results represent mean  $\pm$  SD from 1 normal and 1 IPF cell line by triplicate. \* $P < .001$ ; \*\* $P < .05$  with respect to TGF- $\beta$ 1 alone. (B) Time course shows the effect of 5 ng/mL TGF- $\beta$  alone or after pretreatment with p38 MAP kinase inhibitor SB203580 (SB) and TGF- $\beta$  receptor type I (activin-linked kinase [ALK5]) inhibitor.

### The Gene Expression of TIMP1 and TIMP3 is Up-Regulated in IPF Lungs

Using oligonucleotide microarrays we compared the global gene expression profiles of 6 normal human lungs and 10 IPF lungs, and we analyzed the expression of the 4 TIMPs. As illustrated in Figure 5, a significant increase of TIMP1 and TIMP3 gene expression was observed in IPF lungs compared to the controls (Student *t* test, TIMP1  $P = .00018$  and TIMP3  $P = .015$ ), whereas no changes were observed in TIMP2 and TIMP4.



**FIGURE 4** Effect of TGF- $\beta$  on TIMP3 protein expression by fibroblasts. (A) Western blot performed in conditioned medium from 2 normal and 2 IPF fibroblast cell-lines. (B) Western blot performed in conditioned medium from cells stimulated 24 hours with 5 ng/mL TGF- $\beta$  alone or after pretreatment with genistein (GE), MEK inhibitor PD98059(PD), and p38 MAP kinase inhibitor SB203580 (SB). Recombinant TIMP3 is shown in lane 1. Bar graphs represent the densitometric quantitation of TIMP3 under basal conditions (A) and after TGF- $\beta$  alone or with inhibitors (B). Each bar represents the average value obtained from 2 independent experiments.

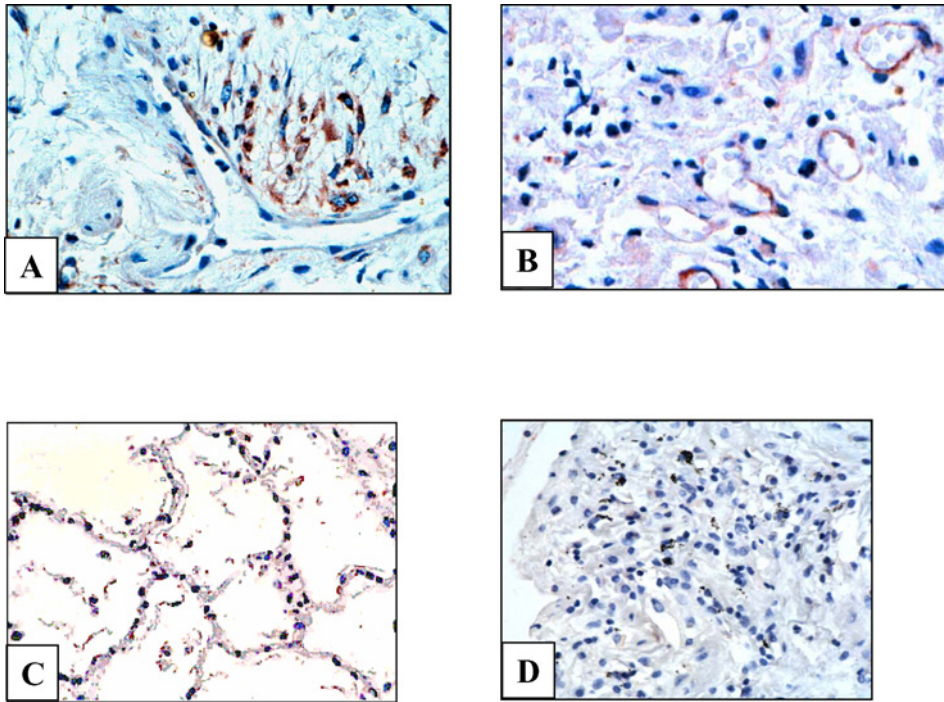


**FIGURE 5** TIMPs expression levels by microarray analysis from controls and IPF lungs. Total RNA was used to generate double-stranded cDNA and biotin-labeled cRNA. The labeled cRNA was hybridized to a custom Affymetrix oligonucleotide DNA microarray using standard Affymetrix protocols. The expression levels for each gene were normalized to the geometric mean of all the samples for each gene. Increased genes are shown in progressively brighter shades of yellow, and decreased genes are shown in progressively darker shades of blue. Genes shown in gray are not different between the groups. TIMP1 (5.1-fold) and TIMP3 (1.3-fold) were significantly increased (*t* test).

### TIMP3-Immunoreactive Protein in IPF Lungs

Because TIMP3 was strongly induced in lung fibroblasts by TGF- $\beta$ 1 and was up-regulated in IPF lungs, we determined pulmonary localization of TIMP3 by immunohistochemical staining. As illustrated in Figure 6, TIMP3





**FIGURE 6** Localization of TIMP3 in IPF and normal lungs. Immunoreactive TIMP3 was revealed with 3-amino-9-ethylcarbazole and samples were counterstained with hematoxylin. (A) Positive fibroblasts in a fibroblast focus. (B) Endothelial cells from capillaries. (C) Normal lung showing no staining. (D) Negative-control section from IPF lung in which the primary antibody was omitted (40 $\times$ ).

was revealed in many fibroblasts, which were present in the fibroblastic foci as well as in some endothelial cells (Figure 6A and B). Likewise, the inhibitor was widely observed in the extracellular matrix mainly on elastic lamina surrounding median and large vessels (not shown). TIMP3 was not detected in normal lungs, as shown in Figure 6C.

## DISCUSSION

IPF is a chronic and progressive disease characterized by dysregulated repair process and aberrant tissue remodeling [20]. A variety of alterations in the alveolar microenvironment have been described, including imbalances in the production of mediators such as chemokines, cytokines, growth factors, and eicosanoids. Likewise, a growing body of evidence suggests that MMPs and TIMPs may also play a role [3–6, 9]. Fibroblasts play a central role in the maintenance of extracellular matrix in the normal lung, in the wound healing response, and in the fibrotic remodeling after injury. In IPF, fibroblasts and myofibroblasts constitute the so called fibroblastic

foci, which are often localized at the “leading edge” of normal and fibrotic lung and secrete most of the fibrotic matrix proteins.

In the present study we determined the quantitative gene expression of the 4 TIMPs in lung tissues as well as by IPF and normal lung derived fibroblasts. In a previous study we found that the expression of TIMPs under basal conditions was increased in IPF fibroblasts compared with those obtained from normal lungs. However, in the present study we found no differences in TIMPs expression [21]. This discrepancy may be partially attributed to the methodological approach. In the present study TIMPs/18S RNA ratio was analyzed by real time PCR whereas in the previous one TIMPs were analyzed by conventional PCR. Additionally, different fibroblast cell lines were used in the 2 studies. Heterogeneity of lung fibroblasts has been largely documented for other properties [21–23]. Nevertheless, the principal aim of this study was to explore the effect of TGF- $\beta$ , a strong profibrotic factor, and IFN- $\gamma$ , an antifibrogenic mediator, on TIMP expression by lung fibroblasts. IFN- $\gamma$  down-regulates the over-expression of TGF- $\beta$ , and subsequently of procollagen expression, leading to decreased collagen content [24, 25]. Our results showed that IFN- $\gamma$  had no effect on TIMP expression. By contrast, TGF- $\beta$ -stimulated fibroblasts revealed a moderate increase in TIMP1 expression and a consistent and high increase of TIMP3. Because the effect of TGF- $\beta$  on TIMP1 has been already documented [8, 26], we examined the differential regulation of TGF- $\beta$  on the induction of TIMP3. Treatment of human lung fibroblasts with TGF- $\beta$ 1 resulted in a rapid activation of p38 and ERK1/2. The inhibition of p38 MAPK by SB203580 decreased TIMP3 expression, whereas PD98059, which is an inhibitor of MEK1/2 and the main route of ERK1/2 activation, had no effect. The p38 MAPK is activated primarily by the MAPK kinases, M6 MEK3/6, via dual phosphorylation at threonine 180 and tyrosine 182 in the activation loop of the protein. Activated p38 can then activate transcription factors through direct phosphorylation [27]. Similar results have been reported in chondrocytes in which TGF- $\beta$  also increased TIMP3 gene expression. Likewise, this up-regulation can also be blocked by genistein, suggesting partial similarities in the induction mechanisms [28]. Thus, these data strongly indicate that TGF- $\beta$ -induced TIMP3 is mediated through phosphorylation on tyrosine residues. Additionally, blocking ALK5 resulted in inhibition of TIMP3 expression. TGF- $\beta$  transduces signals through two distinct serine/threonine kinase receptors, termed type I and type II [29]. Upon activation by type II receptors, type I receptor ALKs transduce intracellular signals through various proteins, of which Smad proteins are the major signaling molecules for TGF- $\beta$  superfamily proteins [29].

Theoretically, overexpression of TIMPs favors local ECM accumulation because they are the natural inhibitors of matrix metalloproteinases.

Actually, experimental models of lung fibrosis show that in the initial stages, TIMP1 is highly up-regulated and appears to be associated with the fibrotic response [10–12].

Global gene expression in IPF lungs has revealed that some matrix metalloproteinases are highly expressed although TIMPs did not appear among the most elevated genes [6]. Using our microarray data [17] we have confirmed the strong expression of several MMPs; however, as shown in this work, TIMP1 and TIMP3 were significantly increased in IPF lungs.

In this study we have demonstrated for the first time that TIMP3 is localized in IPF lungs fibroblasts from fibroblastic foci as well as in endothelial cells. Fibroblastic/myofibroblastic foci are considered to be the active sites of fibrogenesis during the development of IPF, but the reasons why they result in the irreversible formation of scars and honeycomb remodeling have not been elucidated. The expression of strong inhibitors of MMPs, such as TIMP3, suggests that this inhibitor may be implicated in the low degradative microenvironment that seems to characterize these foci. In support of a profibrotic role for TIMP3, it has been shown that the homozygous TIMP-3-null animals develop spontaneous airspace enlargement in the lung, and aged animals show reduced lung collagen [30].

Additionally, TIMP3 is a potent inhibitor of angiogenesis that blocks the binding of vascular endothelial growth factor (VEGF) to VEGF receptor-2; this effect seems to be independent of its MMP-inhibitory activity [31]. The identification of TIMP3 mutation in Sorsby fundus dystrophy, a macular degenerative disease with submacular choroidal neovascularization, also supports a role of TIMP3 in the inhibition of angiogenesis [32]. Importantly, it has been recently demonstrated that capillaries are virtually absent in the fibroblastic foci, suggesting that this process can be relevant for fibrogenesis [33, 34]. Thus, the expression of the angiostatic TIMP3 by fibroblasts from these fibroblastic foci, as demonstrated in this study, might play a role in the absence of capillaries that seems to characterize these foci.

TIMP3 was also found bound to the ECM, primarily to the elastic lamina surrounding the vessels. TIMP3 is associated with the ECM through sulfated glycosaminoglycans, especially heparan sulphate [35]. Perhaps, owing to its membrane-bound proximity, TIMP3 has been reported to inhibit membrane-associated proteases more potently than other TIMPs. These include the MT-MMPs and members of the disintegrin and metalloproteinases family (ADAM) [36], such as TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TACE; ADAM17). TIMP3 appears to be a more potent inhibitor of MMP9 than other TIMPs and it is a high affinity inhibitor of MT3-MMP [8, 37]. In summary, our findings indicate that the expression of TIMP3 by lung fibroblasts is strongly up-regulated by TGF- $\beta$  and that it is significantly increased in IPF tissues. In this disorder, TIMP3 is localized in the fibroblastic

foci, endothelial cells, and ECM, suggesting that it may be an important mediator of the aberrant lung remodeling that characterizes this disease.

## REFERENCES

- [1] Selman M, King TE, Pardo A: Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med.* 2001;134:136–151.
- [2] American Thoracic Society: Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS) and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:646–664.
- [3] Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, Yamanaka N: Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest.* 1998;78:687–698.
- [4] Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, Ferrans VJ, Travis WD: Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 1996;149:1241–1256.
- [5] Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramírez R, Barrios R, Pardo A: TIMP-1, -2, -3 and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing non degradative lung microenvironment? *Am J Physiol.* 2000;279:L562–L574.
- [6] Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, Lollini L, Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M, Heller RA: Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 2002;99:6292–6297.
- [7] Fassina G, Ferrari N, Brigati C, Benelli R, Santi L, Noonan DM, Albini A: Tissue inhibitors of metalloproteinases: regulation and biological activities. *Clin Exp Metastasis.* 2000;18:111–120.
- [8] Woessner JF Jr, Nagase H: *Matrix Metalloproteinases and TIMPs.* New York: Oxford University Press; 2000.
- [9] Selman M, Pardo A: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in pulmonary fibrosis. In: Lynch JP, ed. *Idiopathic Pulmonary Fibrosis.* Marcel Decker; 2004:451–481.
- [10] Kolb M, Bonniaud P, Galt T, Sime PJ, Kelly MM, Margetts PJ, Gauldie J: Differences in the fibrogenic response after transfer of active transforming growth factor-beta1 gene to lungs of “fibrosis-prone” and “fibrosis-resistant” mouse strains. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27:141–150.
- [11] Ortiz LA, Lasky J, Gozal E, Ruiz V, Lungarella G, Cavarra E, Brody AR, Friedman M, Pardo A, Selman M: Tumor necrosis factor receptor deficiency alters matrix metalloproteinase 13/tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression in murine silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:244–252.
- [12] Ruiz V, Ordóñez RM, Berumen J, Ramirez R, Uhal B, Becerril C, Pardo A, Selman M: Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis. *Am J Physiol.* 2003;285:L1026–L1036.
- [13] Selman M, Thannickal VJ, Pardo A, Zisman DA, Martinez FJ, Lynch JP 3rd: Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs.* 2004;64:405–430.
- [14] Pardo A, Selman M, Ramírez R, Ramos C, Montaña M, Stricklin G, Raghu G: Production of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases by fibroblasts derived from normal and fibrotic human lungs. *Chest.* 1992;102:1085–1089.
- [15] Nuttall RK, Pennington CJ, Taplin J, Wheal A, Yong VW, Forsyth PA, Edwards DR: Elevated membrane-type matrix metalloproteinases in gliomas revealed by profiling proteases and inhibitors in human cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2003;1:333–345.
- [16] Selman M, Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Ramírez R, Kudlacz EM, Mitchell PG, Pardo A: Matrix metalloproteinases inhibition abrogates tobacco smoke-induced emphysema in guinea pigs. *Chest.* 2003;123:1633–1641.
- [17] Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Aziz N, Kaminski N, Zlotnik A: Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:188–198.

- [18] Kaminski N, Friedman N: Practical approaches to analyzing results of microarray experiments. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27:125–132.
- [19] Segal E, Friedman N, Kaminski N, Regev A, Koller D: From signatures to models: understanding cancer using microarrays. *Nat Genet.* 2005;37(Suppl):S38–S45.
- [20] Pardo A, Selman M: Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34:1534–1536.
- [21] Ramos C, Montaña M, García-Alvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, Pardo A: Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and TIMP's expression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24:591–598.
- [22] Jordana M, Schulman J, McSharry C, Irving LB, Newhouse MT, Jordana G, Gauldie J: Heterogeneous proliferative characteristics of human adult lung fibroblast lines and clonally derived fibroblasts from control and fibrotic tissue. *Am Rev Respir Dis.* 1988;137:579–584.
- [23] Raghu G, Chen YY, Rusch V, Rabinovitch PS: Differential proliferation of fibroblasts cultured from normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis.* 1988;138:703–708.
- [24] Gurujeyalakshmi G, Giri SN: Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: downregulation of TGF-beta and procollagen I and III gene expression. *Exp Lung Res.* 1995;21:791–808.
- [25] Dooley S, Said HM, Gressner AM, Floege J, En-Nia A, Mertens PR: Y-box protein-1 is the crucial mediator of antifibrotic interferon-gamma effects. *J Biol Chem.* 2006;281:1784–1795.
- [26] Yamanaka M, Shegogue D, Pei H, Bu S, Bielawska A, Bielawski J, Pettus B, Hannun YA, Obeid L, Trojanowska M: Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates TIMP-1 up-regulation. *J Biol Chem.* 2004;279:53994–54001.
- [27] Moriguchi T, Kuroyanagi N, Yamaguchi K, Gotoh Y, Irie K, Kano T, Shirakabe K, Muro Y, Shibuya H, Matsumoto K, Nishida E, Hagiwara M: A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem.* 1996;271:13675–13679.
- [28] Su S, DiBattista JA, Sun Y, Li WQ, Zafarullah M: Up-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by TGF- $\beta$  in articular chondrocytes is mediated by serine/threonine and tyrosine kinases. *J Cell Biochem.* 1998;70:517–527.
- [29] Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P: TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997;390:465–471.
- [30] Leco KJ, Waterhouse P, Sanchez OH, Gowing KL, Poole AR, Wakeham A, Mak TW, Khokha R: Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest.* 2001;108:817–829.
- [31] Qi JH, Ebrahim Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, Baker A, Anand-Apte B: A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med.* 2003;9:407–415.
- [32] Langton KP, Barker MD, McKie N: Localization of the functional domains of human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and the effects of a Sorsby's fundus dystrophy mutation. *J Biol Chem.* 1998;273:16778–16781.
- [33] Cosgrove GP, Brown KK, Schiemann WP, Serls AE, Parr JE, Geraci MW, Schwarz MI, Cool CD, Worthen GS: Pigment epithelium-derived factor in idiopathic pulmonary fibrosis: a role in aberrant angiogenesis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:242–251.
- [34] Ebina M, Shimizukawa M, Shibata N, Kimura Y, Suzuki T, Endo M, Sasano H, Kondo T, Nukiwa T: Heterogeneous increase in CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169:1203–1208.
- [35] Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF Jr: TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 2000;275:31226–31232.
- [36] Zhao H, Bernardo MM, Osenkowski P, Sohail A, Pei D, Nagase H, Kashiwagi M, Soloway PD, DeClerck YA, Fridman R: Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem.* 2004;279:8592–8601.
- [37] Amour A, Slocombe PM, Webster A, Butler M, Knight CG, Smith BJ, Stephens PE, Shelley C, Hutton M, Knauper V, Docherty AJ, Murphy G: TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett.* 1998;435:39–44.

1) García-Alvarez J, Ramírez R, Sampieri CL, Nuttall RK, Edwards DR, Selman M, Pardo A (2006). Membrane Type-Matrix Metalloproteinases in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis**; 23: 13-21.

2) García-Alvarez J, Remedios R, Checa M, Nuttall RK, Sampieri CL, Edwards DR, Selman M, Pardo A (2006). Tissue Inhibitor of metalloproteinase-3 is up-regulated by Transforming Growth Factor-beta 1 *in vitro* and expressed in fibroblastic foci *in vivo* in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Exp Lung Res**; 32: 201-14.