



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**PAPEL DE LA GELATINASA B (MMP9)
EN EL DESARROLLO DE
FIBROSIS PULMONAR.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

BIOL. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANNIE PARDO SEMO

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Agradezco a las siguientes instituciones, por su apoyo para la realización de este trabajo:

- * Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo económico SDI.PTID.O5.6.**
- * Dirección General de Estudios de Posgrado (UNAM) por la beca complementaria.**
- * Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de doctorado.**
- * Facultad de Ciencias de la UNAM.**
- * Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.**
- * Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.**

Agradezco también a los miembros de mi comité tutorial :

Dra. Annie Pardo Semo.

Dra. Clara Inés Espítia Pinzón.

Dr. Héctor Mayani Viveros.

*Esta tesis esta dedicada a la mejor mamá del mundo,
Rosalba Benítez Miranda.*

GRACIAS:

A mis padres académicos, Annie Pardo y Moisés Selman, por su apoyo, amistad y cariño.

A Remedios Ramírez Rangel por ser tan generosa.

A Enrique López Ontiveros por condimentar mi vida.

A mis amigos del Laboratorio de Bioquímica: Jorge García, Isabel de la Cruz y Alfonso Torre.

A todos los miembros del grupo de investigación en fibrosis pulmonar.

A mis alumnos: Alfredo, Luis Antonio, Miguel Ángel, Ayesha, Jazmín y Ana Laura.

A Vilma Maldonado por su hospitalidad en el INCAN y por sus consejos.

Al personal del bioterio del INER.

Al personal de Morfología de la Unidad de Investigación del INER.

Índice

	Pág.
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
<i>Fibrosis pulmonar</i>	4
<i>Metaloproteinasas de Matriz (MMPs)</i>	6
<i>Gelatinasa B (MMP9)</i>	8
<i>Regulación de la actividad de la MMP9</i>	9
<i>Sustratos de la MMP9</i>	13
<i>MMP9 Y Fibrosis Pulmonar</i>	15
OBJETIVOS	19
METODOLOGÍA	20
<i>Generación del ratón transgénico que expresa MMP9 de humano (MMP-9h) en macrófagos</i>	20
<i>Análisis de la expresión de MMP9 (humano), MMP-9 (ratón) e IGFBP-3 por PCR en tiempo real (q-PCR)</i>	20
<i>Fibrosis experimental inducida por bleomicina</i>	21
<i>Evaluación semicuantitativa del porcentaje de fibrosis</i>	22
<i>Cuantificación de hidroxiprolina pulmonar</i>	23
<i>Evaluación del perfil celular en el lavado bronquioalveolar (LBA)</i>	23
<i>Evaluación del perfil de citocinas en el LBA</i>	23
<i>Cuantificación de la actividad de mieloperoxidasa en LBA y tejido</i>	24
<i>Digestión in vitro de la proteína IGFBP-3 de ratón por MMP-9</i>	24
<i>Zimografía en geles usando IGFBP3 como sustrato</i>	25
<i>Zimografía en geles de gelatina</i>	25
<i>Inmunohistoquímica</i>	26
<i>Análisis estadístico</i>	26
RESULTADOS	27
<i>Caracterización de la población de estudio</i>	27
<i>Evidencia de la expresión de MMP9 en el ratón transgénico</i>	28
<i>Análisis de morbilidad y mortalidad post-instilación</i>	29
<i>Análisis de la respuesta inflamatoria post-instilación en el lavado bronquio-alveolar</i> ...	29
<i>Actividad de mieloperoxidasa en LBA y tejido</i>	30
<i>Análisis histológico post-instilación</i>	33
<i>Contenido de hidroxiprolina en pulmón</i>	38
<i>Perfil de citocinas en el lavado bronquio-alveolar</i>	40
<i>Cuantificación de IGFBP-3 por q-PCR</i>	42
<i>Inmunolocalización de IGFBP-3 en el pulmón de los ratones WT y TG MMP9-h</i>	42
<i>Degradación in vitro de la proteína IGFBP-3 por MMP-9</i>	44
<i>Zimografía utilizando IGFBP-3 como sustrato</i>	45
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS	54
ANEXO (ARTÍCULO)	61

Índice de tablas y figuras

	Pág.
TABLAS	
Tabla 1. MMPs altamente expresadas en FPI.....	5
Tabla 2. Sustratos de la MMP9 actualmente descritos, que no son componentes de la matriz extracelular.....	14
Tabla 3. Análisis semicuantitativo de los cambios morfológicos en pulmón después del tratamiento con bleomicina.....	34
Tabla 4. Mapa del arreglo de citocinas	41
FIGURAS	
Fig.1 Mecanismo de activación de las MMPs	7
Fig.2 Dominios estructurales de las metaloproteinasas	7
Fig. 3 Estructura de la MMP9 o Gelatinasa B	8
Fig.4 Elementos de regulación en el promotor de la MMP-9.....	10
Fig. 5 Cascada proteolítica involucrada en la activación de la pro-MMP9	12
Fig. 6 Mecanismos de inhibición de la MMP9	13
Fig. 7 Esquema hipotético de los principales eventos patogénicos que ocurren durante la fibrosis pulmonar.....	16
Fig. 8 Caracterización de los ratones TG MMP9-h	27
Fig. 9 Expresión de MMP9 en el ratón TG MMP9-h	28
Fig.10 Sobrevida de los ratones TG MMP9-h y WT después del tratamiento con bleomicina.....	29
Fig. 11 Perfil celular en LBA	31
Fig. 12 Zimograma de gelatina	31
Fig. 13 Cuantificación de la actividad de mieloperoxidasa	32
Fig. 14 Histología del pulmón de ratones TG MMP9-h y WT (control, semana 1 y 4)	35
Fig. 15 Histología del pulmón de ratones TG MMP9-h y WT (semana 8)	36
Fig. 16 Histología del pulmón de ratones TG MMP9-h y WT (semana 12 y 16)	37
Fig. 17 Curso temporal del contenido de hidroxiprolina pulmonar de ratones control	38
Fig. 18 Curso temporal del contenido de hidroxiprolina pulmonar de ratones tratados con bleomicina	39
Fig. 19 Arreglo de anticuerpos para el análisis de citocinas en LBA de ratones TG MMP9-h y WT, controles y tratados con bleomicina.....	41
Fig. 20 Nivel del mRNA de IGFBP3 en pulmón de ratones TG MMP9-h y WT.....	42
Fig. 21 Inmunolocalización de IGFBP3 en pulmón de ratones TG MMP9-h y WT...	43
Fig. 22 Degradación <i>in vitro</i> de IGFBP3 por MMP9	44
Fig. 23 Zimografía utilizando a IGFBP3 como sustrato	45
Fig. 24 Modelo hipotético del papel de la MMP9 durante la fibrosis pulmonar.....	52

Resumen

TITULO: “Papel de la gelatinasa B (MMP9) en el desarrollo de fibrosis pulmonar”.

ANTECEDENTES: La fibrosis pulmonar es el resultado final de un grupo heterogéneo de padecimientos respiratorios, agrupados bajo el término de Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas (EPID). La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) representa la entidad más común y agresiva de las EPID; es una enfermedad crónica, progresiva y letal, de etiología desconocida. La fibrosis pulmonar se caracteriza por la acumulación excesiva de moléculas de la matriz extracelular (principalmente de colágenas fibrilares) y por la presencia de focos de fibroblastos y miofibroblastos en el parénquima pulmonar. El aumento en la expresión de la Gelatinasa B (MMP9) ha sido documentado en la enfermedad en humanos y también en modelos animales, pero su papel en la respuesta fibrosante no se conoce con precisión.

OBJETIVO: Explorar el efecto de la sobre-expresión de la MMP9, en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, usando un ratón transgénico que expresa MMP9 de humano específicamente en macrófagos alveolares (TG MMP9h).

MATERIAL Y MÉTODOS: Ratones transgénicos y silvestres fueron tratados con bleomicina, un agente inductor de fibrosis pulmonar. Los ratones fueron sacrificados en distintos períodos de tiempo (1, 4, 8, 12 y 16 semanas post-tratamiento) para obtener el pulmón y el lavado bronquio-alveolar (LBA). Se realizó un análisis histológico para determinar el grado y extensión de las lesiones pulmonares y se determinó el contenido de hidroxiprolina pulmonar, como un marcador del depósito de colágena. Adicionalmente, se determinó el perfil de células inflamatorias y citocinas en el LBA. El nivel de expresión de la MMP9 de humano y ratón, así como de IGFBP3, fue evaluado por PCR en tiempo real, tanto en ratones control como tratados. Por inmunohistoquímica se localizó a la MMP9 humana e IGFBP3 en tejido pulmonar. Por Western blot se evaluó la actividad proteolítica de la MMP9 sobre IGFBP-3.

RESULTADOS: El análisis de los cambios morfológicos reveló que la fibrosis desarrollada por los ratones TG MMP9h fue significativamente menos extensa y severa, al comparar con los ratones wild type o silvestres. La respuesta inflamatoria fue diferente al comparar los grupos TG MMP9-h y WT. El número de neutrófilos y linfocitos en el LBA de los WT fue significativamente mayor, en comparación con los TG MMP9-h, durante la primera y cuarta

semana post-tratamiento, respectivamente. Para explorar los posibles mecanismos involucrados en ésta respuesta inflamatoria y fibrosante moderada, observada en el TG MMP9-h, comparamos el nivel de varias citocinas en el lavado bronquio-alveolar de ratones TG MMP9-h y WT. El nivel de IGFBP-3 y TIMP1 fue significativamente menor en el LBA de los ratones TG MMP9h, durante la primera semana post-tratamiento con bleomicina, en comparación con los WT. Diferentes estudios han demostrado que la proteína IGFBP3 induce la sobre-expresión de colágena tipo 1 en fibroblastos y apoptosis en células epiteliales. Varias proteasas que procesan a la proteína IGFBP-3 han sido descritas, incluyendo proteasas de serina, catepsinas y metaloproteinasas de matriz. Para evaluar si la MMP-9 de humano tenía actividad proteolítica sobre IGFBP-3, realizamos una digestión *in vitro*, utilizando MMP-9 de humano purificada y la proteína IGFBP-3 recombinante de ratón. Observamos que la MMP9 procesó a la IGFBP-3, generando fragmentos de diferente peso molecular. También evaluamos, por zimografía, si el pulmón de los ratones TG MMP-9h y WT, expresaban proteasas involucradas en la degradación de IGFBP-3; observamos bandas inmunoreactivas correspondientes al peso molecular de la pro-MMP-9, sólo en el LBA proveniente de los ratones TG MMP-9h, y no en el LBA de los WT.

CONCLUSION: Los resultados citados anteriormente sugieren que un aumento en la actividad de MMP9, secretada por macrófagos alveolares puede tener un efecto anti-fibrosante, en donde un mecanismo potencial puede ser la degradación activa de IGFBP3 y de proteínas quimio-atrayentes de neutrófilos y linfocitos.

Abstract

TITLE: Role of Gelatinase B (MMP9) in pulmonary fibrosis.

INTRODUCTION: Pulmonary fibrosis is a common response to a variety of lung injuries, characterized by fibroblast/myofibroblast expansion and abnormal accumulation of extracellular matrix. An increased expression of matrix metalloprotease 9 (MMP9) in human and experimental lung fibrosis has been documented, but its role in the fibrotic response is unclear. We studied the effect of MMP9 overexpression in bleomycin-driven lung fibrosis using transgenic mice expressing human MMP9 in alveolar macrophages (hMMP9-TG).

MATERIALS AND METHODS: Mice between 8 and 10 weeks of age were instilled intratracheally with bleomycin. Control animals received sterile saline. Mice were sacrificed at 1, 4, 8, 12 and 16 weeks after bleomycin or saline treatment. Lung tissue and BAL were obtained. Lung tissue sections were stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome stain, and were scored blindly for severity and extent of the lesions and percentage of fibrosis. To quantify collagen deposition, lung hydroxyproline levels were measured. Inflammatory cells and cytokine profile were evaluated in BAL. Levels of mouse and human MMP9 and IGFBP3 gene expression were assessed by quantitative real time PCR in total RNA isolated from lungs of bleomycin or saline-treated mice. Immunohistochemical localization of MMP9 and IGFBP3 were performed in lung sections. To test whether lungs from hMMP9 TG and WT mice contained proteases able to cleave IGFBP-3, BAL fluids were examined by IGFBP-3 substrate zymography and in vitro digestion of IGFBP3 by MMP9 was developed.

RESULTS: At 8 weeks postbleomycin, the extent of fibrotic lesions and OH-proline content were significantly decreased in the TG mice compared to the WT mice. The decreased fibrosis in hMMP9-TG mice was preceded by a significant reduction of neutrophils and lymphocytes in bronchoalveolar lavage (BAL) at 1 and 4 weeks post-bleomycin, respectively, as well as by significantly less TIMP-1 than the WT mice. From a variety of cytokines/chemokines investigated, we found that BAL levels of insulin growth factor binding protein-3 (IGFBP3) as well as the immunoreactive protein in the lungs were significantly lower in hMMP9-TG mice compared with WT mice despite similar levels of gene expression. Using IGFBP-3 substrate zymography we found that BAL from TG mice at 1 week after bleomycin cleaved IGFBP-3. Further, we demonstrated that MMP9 degraded IGFBP-3 into lower molecular mass fragments.

CONCLUSION: These findings suggest that increased activity of MMP9 secreted by alveolar macrophages in the lung microenvironment may have an antifibrotic effect and provide a potential mechanism involving IGFBP3 degradation.

Introducción

FIBROSIS PULMONAR.

La fibrosis pulmonar es el resultado final de un grupo heterogéneo de padecimientos respiratorios, agrupados bajo el término de Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas (EPID). La **Fibrosis Pulmonar Idiopática** (FPI) representa la entidad más común y agresiva de las EPID; es una enfermedad crónica, progresiva y letal, de etiología desconocida (Pardo A. y Selman M., 2006; Pardo A. y Selman M., 2002; Selman M. et al, 2001).

Los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la fibrosis pulmonar no se conocen con precisión, sin embargo la enfermedad se caracteriza por la acumulación excesiva de moléculas de la matriz extracelular (principalmente de colágenas fibrilares) y por la presencia de focos de fibroblastos y miofibroblastos en el parénquima pulmonar (Pardo A. et al., 2006; Pardo A. y Selman M., 2002; Selman M. et al., 2001).

La **matriz extracelular** (MEC) es una estructura dinámica que desempeña un papel clave en la arquitectura y homeostasis del pulmón. La MEC del parénquima pulmonar está compuesta principalmente por colágenas tipo I y III, elastina, proteoglicanos y fibronectina; mientras, estructuras especializadas de la MEC, como la **membrana basal** del epitelio alveolar y del endotelio, están compuestas por colágena tipo IV, laminina y entactina (Pardo A. y Selman M., 2006; Fernández D. et al., 2006).

La regulación controlada entre la síntesis y la degradación de la MEC es crucial para la manutención de la morfostasis pulmonar (Pérez-Tamayo, 1974). En este contexto, la fibrosis pulmonar puede ser conceptualizada como la pérdida de la regulación en el metabolismo de la MEC. Las principales alteraciones en el metabolismo de la MEC, en la fibrosis pulmonar son: depósito excesivo de colágenas fibrilares en los espacios intersticial y alveolar, y la ruptura y desintegración de las membranas basales. Se ha estimado que en etapas avanzadas de la enfermedad, el pulmón fibrótico puede contener de 2 a 3 veces más moléculas de MEC por encima del nivel fisiológico. Por otro, lado el rompimiento de la membrana basal es un evento muy importante en la patología, y ha sido postulado que la migración de fibroblastos y miofibroblastos hacia los espacios alveolares ocurre a través de la membrana basal desintegrada (Pardo A. y Selman M., 2006, Selman M. et al., 2001). Además, existen evidencias de que la desorganización de la membrana basal, es un estímulo inicial que induce un cambio en el fenotipo de las células epiteliales transformándolas en células mesenquimales

por un proceso denominado **transición epitelio-mesénquima**. Se ha demostrado que estas células mesenquimales derivadas del epitelio, pueden sintetizar colágenas tipo I y III, además de expresar α -actina de músculo liso (α -AML), contribuyendo al depósito de MEC durante la fibrosis (Willis B. et al., 2006).

Proteínas estrechamente relacionadas con el metabolismo de la MEC son las metaloproteinasas de matriz (**MMPs** del inglés *Matrix Metalloproteinases*) y los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (**TIMPs** del inglés *Tissue inhibitor of Metalloproteinases*). Estas dos familias de proteínas efectúan la degradación y remodelación de la MEC.

Ha sido ampliamente aceptado que tanto las MMPs como los TIMPs juegan un papel importante en la patogénesis de la fibrosis pulmonar, sin embargo, el mecanismo exacto no ha sido caracterizado. Diversos estudios han mostrado que existen alteraciones importantes en la expresión y localización de las MMPs y los TIMPs en la fibrosis pulmonar, tanto en humanos, como en modelos experimentales (bleomicina, sílice, y paraquat e hiperoxia). Estudios recientes donde se ha analizado la expresión génica global en FPI, utilizando microarreglos, han revelado que diferentes genes que codifican para MMPs están significativamente aumentados en los pulmones fibróticos. Entre ellos están: la matrilisina (MMP7), la colagenasa 1 (MMP1), las gelatinasas (MMP2 y MMP9) y TIMP1 (Tabla 1), (Pardo A. y Selman M., 2006; Selman M. et al., 2006; Zuo F. et al., 2002).

Tabla 1. MMPs altamente expresadas en FPI.

MMP	Localización en el pulmón fibrótico	Asociación con la fibrosis pulmonar
MMP1	Epitelio alveolar Epitelio bronquial	Tradicionalmente se había postulado que la expresión de MMP1 disminuía en la fibrosis pulmonar. Sin embargo su expresión está aumentada en la enfermedad, esta paradoja puede ser explicada considerando que la MMP1 está ausente en el espacio intersticial, que es donde ocurre el depósito de colágenas fibrilares. El papel de MMP1 en el epitelio no se conoce con precisión. (Pardo A. y Selman M., 2006).
MMP2	Epitelio alveolar Epitelio bronquial Focos de fibroblastos	Se ha demostrado que la enzima se encuentra aumentada y activa en lavado bronquio-alveolar y en tejido de pacientes con FPI. Los principales sustratos de la MMP2 son componentes de la membrana basal, por lo tanto, se ha asociado su actividad con la ruptura y desintegración de la membrana basal. (Pardo A. y Selman M., 2006).
MMP7	Epitelio alveolar	Recientemente se ha demostrado que co-localiza con la proteína osteopontina, una proteína pro-fibrosante que induce la síntesis de MEC en fibroblastos. Existen evidencias de que la osteopontina induce la expresión de MMP7, y la MMP7 a su vez activa a la osteopontina. (Pardo A. et al, 2005). El ratón deficiente de la MMP7 desarrolla menos fibrosis en respuesta al tratamiento con bleomicina. (Zuo F. et al, 2002). Se ha propuesto que la MMP7 juega un papel importante en la re-epitelización y en la respuesta inmune innata. (Li Q. et al, 2002).
MMP9	Epitelio alveolar Neutrófilos Macrófagos Fibroblastos	Se ha demostrado que la enzima se encuentra aumentada y activa en lavado bronquio-alveolar y en tejido de pacientes con FPI. (Pérez-Ramos J. et al, 1999). La MMP9 tiene un papel importante en la migración epitelial y en la re-epitelización. El ratón deficiente de la MMP9 muestra menos bronquiolarización alveolar después del tratamiento con bleomicina. (Betsuyaku T. et al, 2000).

METALOPROTEINASAS DE MATRIZ (MMPs).

Las **MMPs** son una familia de endopeptidasas responsables de la degradación de los componentes de la matriz extracelular, y actualmente se ha demostrado que además tienen actividad sobre una gran variedad de sustratos, que incluyen a otras proteasas, inhibidores de proteasas, factores de coagulación, moléculas quimiotácticas, factores de crecimiento, proteínas de unión a factores de crecimiento, moléculas de adhesión célula-célula y célula-MEC, hormonas, y receptores transmembranales (Cauwe B. et al., 2007; Mott J. y Werb Z., 2004).

Las MMPs comparten varias características funcionales incluyendo:

- a) La habilidad para degradar por lo menos un componente de la matriz extracelular.
- b) Contienen un átomo de zinc en su sitio activo.
- c) Son sintetizadas como zimógenos.
- d) Su actividad es regulada por inhibidores específicos denominados TIMPs.

Los miembros de la familia de las MMPs tienen una serie de dominios conservados característicos: El **péptido señal (PS)** o pre-dominio que dirige a la proteína a la secreción extracelular. El **pro-péptido** o pro-dominio es responsable de la latencia de las MMPs. Un residuo de cisteína altamente conservado en el propéptido (**PRCGVPD**) de todas las MMPs, es responsable de estabilizar la estructura inactiva de la pro-enzima. El grupo tiol de este residuo de cisteína forma un enlace coordinado con el átomo de zinc, que se encuentra en el dominio catalítico manteniendo de esta forma la latencia de la enzima. La activación de cualquier pro-MMP requiere el rompimiento de este enlace cisteína- Zn^{2+} , a este mecanismo se le conoce coloquialmente como *switch de cisteína* (**Fig. 1**). El **dominio catalítico** es responsable de la actividad proteolítica y presenta una secuencia conservada (-His-Glu-x-Gli-His-), en la cual se une el Zn^{2+} catalítico. También existen de 2 a 3 iones de Ca^{2+} y un ión adicional de Zn^{2+} estructural. El **dominio tipo hemopexina** se encuentra en el extremo carboxilo-terminal, tiene de 3 a 4 secuencias repetidas similares a la proteína hemopexina, y se conecta al dominio catalítico mediante una región de longitud variable, rica en prolina denominada bisagra. El dominio tipo hemopexina y la región de bisagra participan en el reconocimiento de la enzima por su sustrato y en la interacción de la enzima con sus inhibidores. Todas las MMPs excepto la MMP-7 y la MMP-26 contienen este dominio. Existen además otros dominios accesorios como el dominio transmembranal, presente exclusivamente en las MT-MMPs (Membrane type MMPs), (**Fig. 2**), (Mott J. y Werb Z., 2004; Somerville R. et al., 2003; Visse R. et al., 2003).

Las MMPs constituyen una familia que se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de la escala evolutiva y en el caso de los humanos, esta familia esta constituida por 23 proteínas. Basándose en la similitud estructural y en la especificidad por los sustratos, las MMPs se han clasificado en 6 subgrupos: colagenasas, estromelisininas, mastrilisininas, gelatinasas, MT-MMPs y otras MMPs (**Fig. 2**), (Mott J. y Werb Z., 2004; Somerville R. et al., 2003; Visse R. et al., 2003).

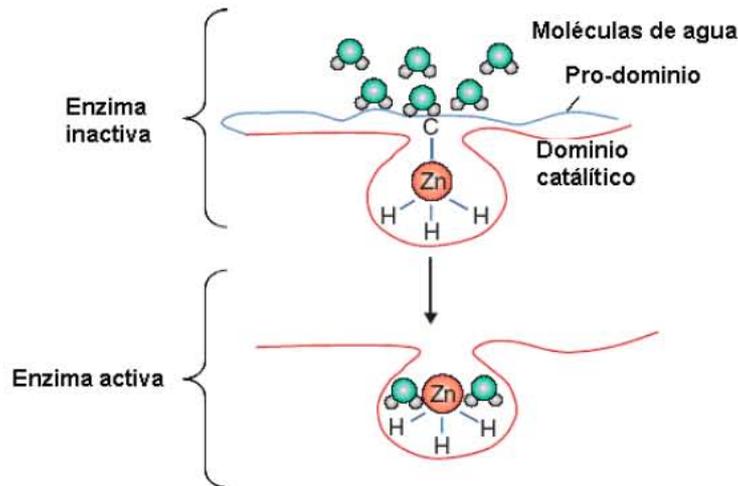


Fig.1 Mecanismo de activación de las MMPs. La interacción del pro-dominio con el átomo de zinc excluye las moléculas de agua y mantiene a la enzima latente. El rompimiento de esta interacción por un cambio conformacional o por proteólisis resulta en la activación de la enzima, y el grupo tiol es reemplazado por 2 moléculas de agua. (Somerville R. et al, 2003).

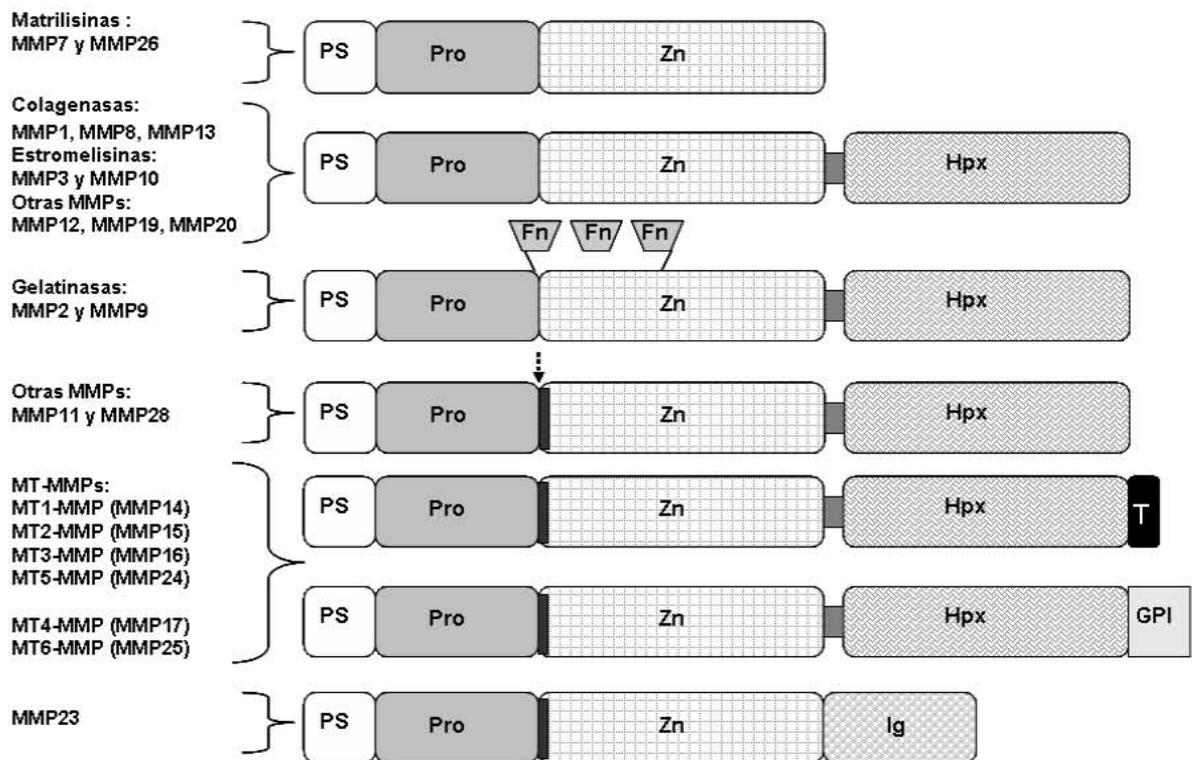


Fig.2 Dominios estructurales de las metaloproteinasas. PS: péptido señal, Pro: pro-dominio, Zn: dominio catalítico, Hpx: dominio tipo hemopexina, Fn: dominio tipo fibronectina, T: dominio transmembranal, GPI: glucosil-fosfatidil-inositol, Ig: dominio tipo IgG. Flecha punteada: sitio de activación intracelular por furina (Visse R. et al, 2003).

GELATINASA B (MMP-9).

Estructura de la MMP-9.

La MMP9, en conjunto con la MMP2, pertenece a la subfamilia de las **gelatinasas**. Además de los dominios prototipo de la familia de las MMPs, las gelatinasas A y B tienen un dominio compuesto por tres segmentos tipo **fibronectina-II**, este dominio es responsable de la unión a gelatina, laminina, colágena tipo I y tipo IV; la MMP9, además, contiene un dominio tipo **colágena-V** rico en Ser-Thr-Pro. En comparación con otras MMPs, la MMP9, en términos estructurales, es el miembro de mayor peso molecular y uno de los miembros más complejos de la familia (**Fig.3B**), (Van den Steen P. et al., 2002).

La MMP9 es una enzima altamente glicosilada. La secuencia de aminoácidos de la pro-MMP9 ha revelado que hay tres sitios potenciales de N-glicosilación (Asn³⁸, Asn¹²⁰, Asn¹²⁷) el primero está situado en el pro-dominio, los otros dos están localizados en el dominio catalítico. Por otro lado el dominio tipo colágena-V, el cual contiene la secuencia T/SXXP, constituye un sitio de O-glicosilación. La función de la glicosilación de la pro-MMP9 no se ha precisado, sin embargo se ha sugerido que puede ser importante para su activación y catálisis (**Fig.3B**), (Kotra P. et al., 2002).

En muchos tipos celulares, la MMP9 es producida como una mezcla de monómeros y homodímeros, formados a través de uniones covalentes. Además, los neutrófilos producen un complejo heterodimérico compuesto por MMP9 y lipocalina. Las diferentes formas de MMP9 pueden ser visualizadas en un gel de poliacrilamida-SDS bajo condiciones no reductoras o en un zimograma de gelatina (**Fig. 3A**), (Van den Steen P et al., 2002).

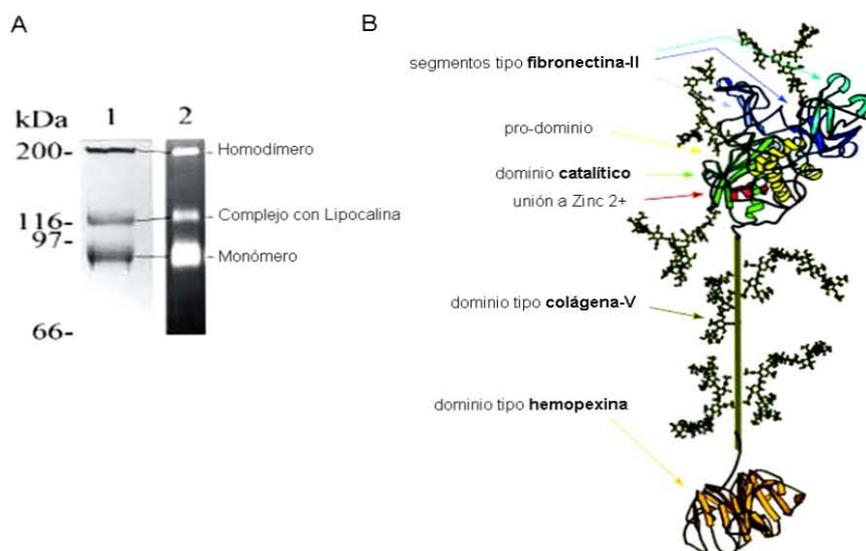


Fig. 3 Estructura de la MMP9 o gelatinasa B. A) Análisis por SDS-PAGE (1) y zimografía (2) de la MMP9 purificada de granulocitos, en donde se observa el monómero de 92 KDa, el homodímero y el complejo MMP9-Lipocalina, no se observan formas activas de MMP9. B) Modelo de la estructura de la MMP9, (Van den Steen P. et al, 2002).

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA MMP9.

La actividad de la MMP9 esta regulada por tres mecanismos principales: transcripción, activación de la proenzima e inhibición. Mecanismos adicionales son glicosilación, compartimentalización y secreción de la enzima, reclutamiento en la superficie celular, endocitosis y degradación intracelular (Van den Steen P. et al., 2002).

Expresión de la MMP9 (Transcripción).

Muchos genes que codifican para varias MMPs en humanos (*Homo sapiens*), se localizan en el cromosoma 11, sub-banda q22, sin embargo, el gen que codifica a la MMP9 ocupa un sitio único en el **cromosoma 20**, sub-banda q12-13. En el ratón (*Mus musculus*) el gen *Mmp9* ha sido localizado en el cromosoma 2. La secuencia del gen de la MMP9, así como la distribución de exones e intrones es muy similar entre humano y ratón (Nair R. y Boyd D., 2005).

Existen evidencias de que la coordinación entre la señalización intracelular, la remodelación de la cromatina, la modificación de las histonas y el reclutamiento de factores de transcripción así como de represores de la transcripción son críticos para regular la expresión de la MMP-9 (Nair R. y Boyd D., 2005, Ma Z. et al., 2004).

En estado basal, el **promotor de la MMP9** está ocupado por complejos de co-represores. Además, la metilación de la histona H3 (residuo K9), define el estado inactivo de la cromatina en el promotor de la MMP9. La inducción de la MMP9 por ciertos estímulos, induce la liberación de los complejos co-represores del promotor y al mismo tiempo se induce el reclutamiento de complejos de remodelación de la cromatina, factores de transcripción y co-activadores. Se ha descrito que el complejo SWI/SNF participa en la relajación de la cromatina en la región promotora del gen de la MMP9. Por otro lado, ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) han revelado que hay un reclutamiento de las proteínas Brg-1 y Brm en el promotor de la MMP9 cuando se estimula su expresión con PMA. También se ha descrito que hay acetilación (residuo K14) y fosforilación (residuo S10) en la histona H3, estas modificaciones en las histonas, facilitan la unión de factores de transcripción, en el promotor de la MMP9 (Ma Z. et al., 2004).

El gen de la MMP9 humana tiene un promotor de 2.2 Kpb, el cual contiene varias secuencias consenso para diferentes **elementos reguladores**, y es más similar al promotor de la MMP-1 y la MMP-3, que al promotor de la MMP-2 (gelatinasa A). En la posición -29 se encuentra una **caja TATA** y río arriba se encuentran por lo menos 4 sitios de unión para

factores de transcripción de las familias c-Fos y c-Jun (**AP-1**). En las posiciones – 328 y – 600 se encuentran sitios de unión para **NFκB**, los cuales son indispensables para la inducción de MMP9 por TNF-α e IL-1β. Por otro lado, el elemento de respuesta **PEA3**, que se encuentra en la posición -541, ha sido implicado en la activación del promotor por c-H-ras (**Fig. 4**). Varios estudios *in vitro* sugieren que Ras juega un papel importante en la regulación de la expresión de la MMP9; Ras puede estimular múltiples vías de señalización, una de ellas involucra la activación secuencial Ras→Raf→MEK1→ERK ½. Las cinasas ERK inducen un incremento en la síntesis y actividad de varios factores de transcripción incluidos c-Fos y Ets. Alternativamente Ras puede modular la expresión de MMP9 a través de JNK (jun amino-terminal kinase), fosfatidilinositol 3-OH cinasa y p38. Existen varias citocinas y factores de crecimiento que inducen la expresión de la MMP9 a través de estas vías de señalización, por ejemplo: TGF-β1, TNF-α, TGF-α, IL-1β, IL-8, IL-2, IL-18, PDGF, bFGF, PDGF, EGF, NGF, etc. Otro factor que induce la expresión de la MMP9 es el estrés oxidante, el cual ha sido asociado con la activación de vías transcripcionales que median respuestas celulares a daño como AP-1 y NF-κB (Van den Steen P. et al., 2002, Nair R. y Boyd D., 2005, Ma Z. et al., 2004).

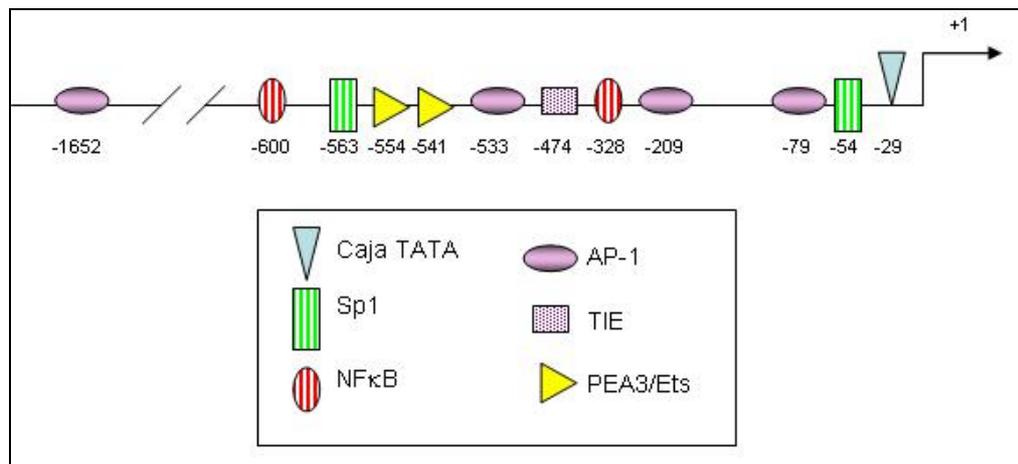


Fig. 4 Elementos de regulación en el promotor de la MMP9. Los sitios de unión a factores de transcripción (5'--- 3') están indicados como números negativos, el inicio de la transcripción está indicado como +1.

Polimorfismos funcionales en el promotor del gen de la MMP-9.

Polimorfismos funcionales en el promotor de la MMP-9 han sido implicados en la regulación de la expresión génica y en la susceptibilidad para desarrollar ciertas enfermedades. Entre ellos, podemos mencionar el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la región -1562, generado por una substitución de C por T (-1562 C/T); ésta transición resulta en un aumento en la actividad transcripcional en macrófagos. En estas células el genotipo C/C resulta en una baja actividad transcripcional en el promotor, mientras que los

genotipos C/T y T/T resultan en una alta actividad transcripcional y han sido asociados con aterosclerosis de coronaria en la población caucásica. De forma similar, el polimorfismo satelital (CA)_n aumenta la actividad transcripcional, debido a su cercanía con el sitio de inicio de la transcripción y con los sitios de unión de diferentes factores de transcripción como Sp1 y NFκB. Este polimorfismo ha sido relacionado con aneurisma aórtico e intracraneal en la población caucásica (Nuzzo D. et al., 2006; Matsumura S. et al., 2005; Nakashima K. et al., 2006).

Activación del zimógeno.

Como todas las MMPs, la pro-MMP9 es producida como un zimógeno que requiere de activación para tener actividad enzimática. La activación de la pro-MMP9 puede ocurrir por mecanismos proteolíticos o no proteolíticos, ambos inducen un cambio conformacional que rompe la interacción Cys-Zn²⁺ (entre el pro-dominio y el sitio catalítico). Una gran variedad de proteasas pueden cortar el pro-peptido de la pro-MMP9 en sitios específicos. La **estromelisina 1** (MMP-3), es uno de los activadores más efectivos de la pro-MMP9; ésta enzima hidroliza el enlace peptídico Glu⁵⁹-Met⁶⁰, generando una especie activa de 82 kDa. Ha sido reportado que la especie activa de 82 kDa puede ser procesada en otra especie activa de 64 kDa por eliminación de un fragmento en el COOH- terminal (Toth M. et al., 2003).

La MMP2, MMP7 y MMP13 también pueden activar a la pro-MMP9. La activación de la pro-MMP9 vía MMP2 y MMP13 es resultado de la **activación de zimógenos en cascada**, iniciada en la superficie celular con la participación de la MT1-MMP, sin embargo, a diferencia de la pro-MMP2, no ha sido descrito un mecanismo de activación dependiente del complejo MT-MMP/TIMP para la pro-MMP9 (**Fig. 5**). La MMP9 activa también tiene la capacidad de activar a la pro-MMP9 por un proceso de **autocatálisis**. Existen otras enzimas involucradas en la activación de la pro-MMP9 que no son metaloproteinasas, por ejemplo, activadores de plasminógeno como **u-PA** (urokinase-type plasminogen activator), **t-PA** (tissue-type plasminogen activator) y **plasmina** (Toth M. et al., 2003; Legrand C. et al, 2001).

Los **mecanismos no proteolíticos** de activación han sido recientemente descritos, uno consiste en la interacción misma de la pro-MMP9 con su substrato, a través del dominio tipo fibronectina, p.ej. con gelatina o con colágena tipo IV; esta interacción puede llevar a un cambio conformacional que hace que el pro-dominio se disocie del dominio catalítico de la enzima, causando su activación. El otro mecanismo involucra al óxido nítrico (NO), el cual puede activar directamente a la pro-MMP9 reaccionando con el grupo tiol del residuo de

cisteína en el pro-dominio, formando un derivado S-nitrosilado. La S-nitrosilación es una modificación post-traducciona análoga a la fosforilación y la acetilación, y modula específicamente la actividad biológica de las proteínas (Gu Z. et al., 2002).

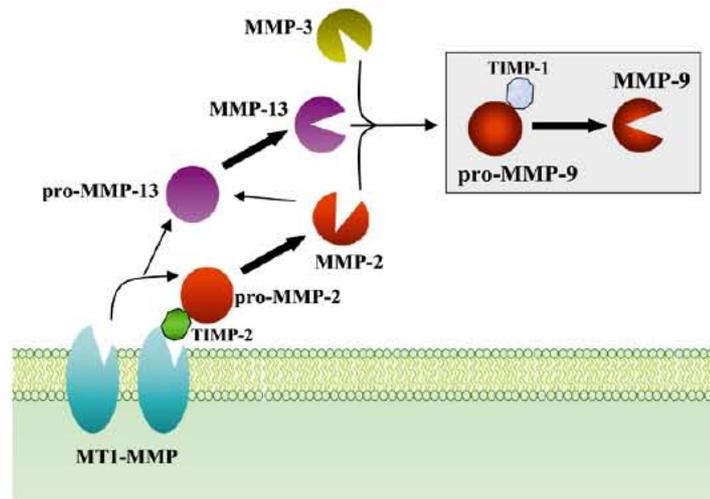


Fig. 5 Cascada proteolítica involucrada en la activación del la pro-MMP9. La pro-MMP9 puede ser activada por MMP2 y MMP13. Esta cascada es iniciada por el complejo de activación MT1-MMP / TIMP2. Por otro lado la plasmina puede activar a la pro-MMP3 y ésta a su vez a la pro-MMP9. Además la plasmina directamente activa a la pro-MMP9. La pro-MMP9 puede ser encontrada formando un complejo con TIMP1, pero no se conoce cuál es la función de este complejo (Fridaman R. et al, 2003).

Es importante mencionar que, cuando por electroforesis son detectadas formas de la MMP9 de menor peso molecular, no es muy claro definir cuáles corresponden a las formas activas debido a que muchos activadores generan formas intermedias inactivas. La presencia de estas formas en plasma, lavado bronquio-alveolar, extracto tisular o lisado celular, pueden ser confundidas con formas activas, en particular cuando se utiliza zimografía de gelatina como el único método para analizar el estado de activación.

Inhibición de la MMP9 activa.

La inhibición de la actividad de la MMP9, como la de otras metaloproteinasas, esta dada por la unión específica y no covalente de los **TIMPs (1-4)** con el sitio activo de la enzima. Los TIMPs inactivan a las MMPs de forma irreversible. Es interesante mencionar que la pro-MMP9 puede formar un complejo estable con TIMP-1 a través del dominio tipo hemopexina, el cual representa un sitio de alta afinidad para este inhibidor. La pro-MMP9 es la única MMP que forma este complejo con TIMP-1, sin embargo, el papel de éste no ha sido definido. Es importante mencionar que el complejo pro-MMP9/ TIMP1 es capaz de inhibir a otras MMPs activas indicando que dominio inhibitorio (amino-terminal), del TIMP1, está libre en el complejo. La MMP9 activa también puede ser inhibida por el inhibidor de

proteasas de amplio espectro **α 2-macrogobulina**. Se considera que en plasma la α 2-macrogobulina es el inhibidor predominante de las MMPs, mientras que en tejido, los TIMPs son los inhibidores clave (Van den Steen P. et al., 2002; Fridaman R. et al., 2003; Opdenakker G. et al., 2001).

La actividad proteolítica de la MMP9 también puede ser inhibida en el microambiente pericelular. Estudios recientes han demostrado que dos proteínas transmembranales pueden influenciar negativamente la actividad de la MMP9, estas proteínas son RECK (**R**eversion-**I**nducing-**c**ysteine-rich protein with **K**azal motifs) y LRP (**L**ow-density lipoprotein **r**eceptor-related **p**rotein). La proteína **RECK** es una glicoproteína rica en cisteína, que contiene dominios tipo inhibidor de proteasas de serina, a través de los cuales interacciona con la MMP9, inhibiéndola. La proteína **LRP**, por otro lado, participa en la endocitosis de proteínas extracelulares diversas como lipoproteínas, proteasas, factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular. Se ha demostrado que la proteína LRP une a la MMP9 y a la pro-MMP9 y endocita tanto a la forma activa como al zimógeno, regulando negativamente la actividad de la enzima. Además la proteína LRP puede endocitar al complejo pro-MMP9/TIMP1 (**Fig. 6**), (Fridman R. et al., 2003).

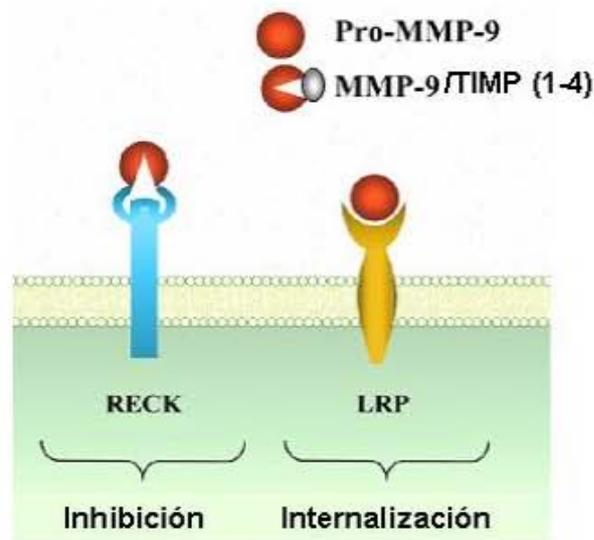


Fig. 6 Mecanismos de inhibición de la MMP9. La MMP9 activa es inhibida por los 4 TIMPs. Además existen proteínas transmembranales como RECK y LRP que participan en su inhibición e internalización respectivamente (Fridman R. et al, 2003).

SUBSTRATOS DE LA MMP9.

Además de digerir componentes de la matriz extracelular como gelatina (colágena desnaturalizada), laminina, colágena tipo IV, decorina, elastina, entactina, versicano, osteonectina y osteopontina, la MMP9 modula la actividad de otras proteasas, moléculas de adhesión celular,

citocinas, receptores y factores de crecimiento. La proteólisis o procesamiento de diversas proteínas puede resultar en un espectro de implicaciones biológicas, que pueden ir desde la maduración y activación del sustrato, hasta su inactivación o degradación.

Tabla 2. Sustratos de la MMP9 actualmente descritos, que no son componentes de la matriz extracelular.

SUBSTRATO		ACTIVIDAD SOBRE EL	Referencia
Siglas	Nombre	SUBSTRATO	
Pro-IL-1β	Pro-Interleukin-1 beta	Activación	Van den Steen P. et al., 2000.
IL-1β	Interleukin-1 beta	Degradación / inactivación	Van den Steen P. et al., 2000.
IL-2R alpha	Interleukin-2 receptor alpha	Corte del dominio extracelular de la proteína transmembranal ("shedding" del ectodominio)	Sheu B. et al., 2001
IP-10/ CXCL-10	IFN-inducible protein-10	Procesa el dominio carboxilo terminal	Van den Steen P. et al., 2003.
SDF-1 o CXCL12	Stromal cell-derived factor-1 Citocina	Degradación/ inactivación	McQuibban G. et al., 2001.
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Activación	Yu X. et al., 2003.
PF-4	Platelet factor-4 quimiocina de neutrófilos	Degradación/ inactivación	Van den Steen P. et al., 2000.
MBP	Myelin basic protein	Degradación/ inactivación	Gijbels K. et al., 1993.
sKitL	Soluble Kit-ligand	Corte del dominio extracelular de la proteína transmembranal ("shedding" del ectodominio)	Heissig B. et al., 2002.
serpin α1-PI	Serpin α 1-proteinase inhibitor	Degradación/ inactivación	Liu Z. et al., 2000
IGFBP-1	Insulin-like growth factor binding protein 1	Degradación / inactivación	Kabir-Salmani M. et al., 2005.
Kiss-1	Metastina	Degradación/ inactivación	Takino T. et al., 2003
GRO-α	Growth-regulated oncogene (GRO) alpha quimiocina tipo CXC de neutrófilos	Degradación/ inactivación	Van den Steen P. et al., 2000.
Pro-TGF-β1	Pro-transforming growth factor-beta 1	Activación	Yu Q. et al., 2000.
Plasminógeno		Procesamiento (generación de angiostatina)	Patterson B. et al. 1997.
CTAP-III	Chemokines-connective tissue-activating peptide-III	Degradación/ inactivación	Van den Steen P. et al., 2000.
ENA78/ CXCL5	Epithelial-cell derived neutrophil activating peptide-78	Degradación/ inactivación	Van den Steen P. et al., 2003.
GCP-2/ CXCL6	Mouse granulocyte chemotactic protein	Degradación/ inactivación	Van den Steen P. et al., 2003.
Syn-1 , Syn-4	Syndecan-1 , Syndecan-4	Corte del dominio extracelular de la proteína transmembranal ("shedding" del ectodominio)	Brule S et al., 2006.
Pro-IL-8	PRO- interleukin-8	Activación	Van den Steen P. et al., 2000.
MIG/CXCL-9	Monokine induced by interferon (IFN)-gamma	Procesa el carboxilo terminal de la proteína	Van den Steen P. et al., 2003.
ICAM-5	Intercellular adhesion molecule-5 (Telencephalin)	Degradación / inactivación	Tian L. et al., 2007.

MMP9 Y FIBROSIS PULMONAR.

Durante el **desarrollo embrionario**, la MMP9 está presente en el pulmón a una concentración muy baja; es expresada principalmente por células epiteliales alveolares tipo II y bronquiales, y su expresión aumenta durante la alveolarización (formación de alvéolos). Sin embargo, la importancia de la MMP9 durante el desarrollo embrionario parece ser mínima, considerando que el ratón deficiente de la MMP9 (MMP-9^{-/-}) muestra una histología normal del pulmón (Betsuyaku T., 2000).

La presencia de la MMP9 ha sido asociada con muchas **patologías pulmonares** (asma, tuberculosis, neumonitis por hipersensibilidad, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cáncer, enfisema y fibrosis pulmonar), sin embargo su papel en las mismas no se conoce con precisión. En estas patologías pulmonares, se ha demostrado que, células de músculo liso, células epiteliales alveolares tipo II, células epiteliales bronquiales, fibroblastos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y células dendríticas, expresan MMP9 (Chakrabarti S. y Patel K., 2005). Este trabajo, sólo está enfocado en el estudio de la MMP9 durante la fibrosis pulmonar.

Como se mencionó previamente, la FPI es una enfermedad caracterizada por un proceso de remodelación anormal de la MEC. El agente causal de la enfermedad es desconocido, pero un daño inicial al epitelio alveolar parece ser un evento desencadenante. Recientemente, ha sido propuesto que la FPI probablemente es el resultado de múltiples ciclos de daño al epitelio, el cual libera citocinas y factores de crecimiento que pueden provocar la migración, proliferación y activación de fibroblastos/ miofibroblastos y la síntesis y depósito exagerado de la MEC (**Fig. 7**), (Selman M. y Pardo A., 2006). La fibrosis pulmonar es visualizada actualmente como una enfermedad epitelial, y se ha sugerido que la membrana basal y su remodelación, juegan un papel crucial durante la patogénesis de la misma. En este contexto, el estudio de la MMP9 y la MMP2 (gelatinasas) en la enfermedad, ha sido esencialmente relacionado con el metabolismo de la membrana basal.

En **modelos experimentales** de fibrosis pulmonar, se ha demostrado que la integridad de la membrana basal es fundamental para la conducción de una regeneración ordenada del epitelio (Buckley S. et al., 2001). La pérdida de integridad de las membranas basales alveolo-endoteliales evita la adecuada re-epitelización post-necrosis, representando un estímulo para la fibrogénesis tanto intersticial como intra-alveolar. Además, se ha propuesto recientemente, que la desintegración de la membrana basal es un estímulo inicial que induce un cambio de

fenotipo de células epiteliales a células mesenquimales, por un proceso de TEM, citado previamente, contribuyendo ellas mismas al depósito de matriz extracelular (Willis B. et al., 2006).

En un estudio realizado por Raghu, et-al., se demostró que existe ruptura de las membranas basales en la mayoría de los pacientes con fibrosis pulmonar, esto fue determinado por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-colágena tipo IV y anti-laminina. La destrucción de las membranas, se observó más frecuentemente en las etapas iniciales de la enfermedad, lo que sugiere que el daño a esta estructura es un evento temprano en el desarrollo de la fibrosis (Raghu G. et al., 1999). En los sitios donde ha ocurrido degradación de la membrana basal, se puede observar pérdida de las células epiteliales alveolares tipo I, hiperplasia y cuboidalización de las células epiteliales alveolares tipo II, anomalías en la producción del surfactante y colapso alveolar. Es importante mencionar que las mismas células epiteliales expresan MMP2 y MMP9, contribuyendo a la remodelación de la membrana basal (Fukuda Y. et al., 1998; Selman M. et al., 2001).

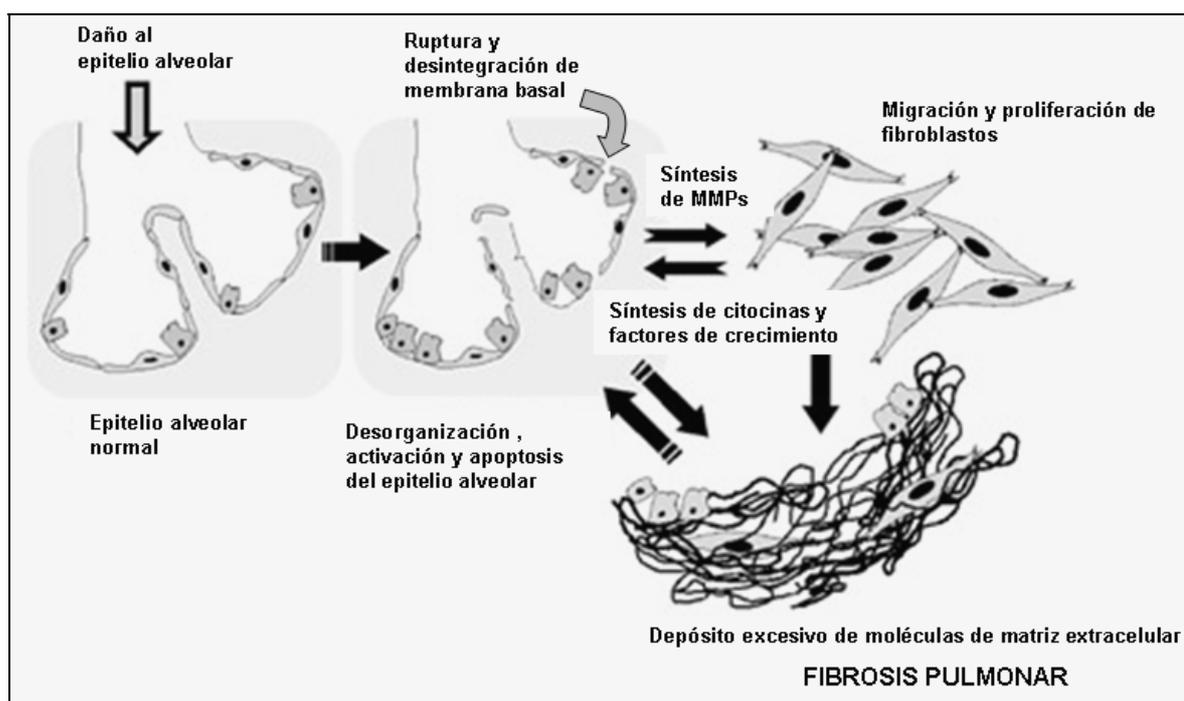


Fig. 7 Esquema hipotético de los principales eventos patogénicos que ocurren durante la fibrosis pulmonar. El daño inicial al epitelio alveolar induce apoptosis, desintegración y activación del mismo. El epitelio libera citocinas y factores de crecimiento que promueven la migración de los fibroblastos hacia los sitios de daño y su proliferación. Las células del epitelio alveolar sintetizan distintas MMPs, entre ellas MMP2 y MMP9. Los fibroblastos también expresan gelatinasas y de esta forma migran hacia los espacios intra-alveolares. La síntesis y depósito de MEC en el intersticio conducen a la fibrosis pulmonar (Selman M. y Pardo A., 2001).

El posible papel de las gelatinasas en la fibrosis pulmonar ha sido explorado en nuestro grupo de investigación, tanto en modelos experimentales, como en la enfermedad en

humanos. En el pulmón fibrótico en humanos, la MMP9 ha sido localizada en células epiteliales, neutrófilos, macrófagos y en focos de fibroblastos/miofibroblastos subepiteliales, por inmunohistoquímica. Asimismo, por zimografía, se ha observado que la actividad de esta enzima se encuentra aumentada en el líquido de lavado bronquio-alveolar (LBA) de pacientes con FPI (Selman M. et al., 2000). Y recientemente, analizando la expresión génica global en FPI por microarreglos de oligonucleótidos, se ha determinado que la expresión, tanto de la MMP2 como de la MMP9 está incrementada al comparar con pulmones de pacientes control (Selman M. et al., 2006).

En los modelos experimentales, por ejemplo en la fibrosis inducida por el tratamiento con paraquat e hiperoxia en rata, en el modelo de bleomicina en ratón, en el modelo de silicosis en rata, y en el modelo de exposición a humo de cigarro y bleomicina en cobayos, se ha encontrado que la actividad de la MMP9 aumenta significativamente tanto en el tejido como en el LBA, en comparación con los animales control. En estos modelos, se ha establecido una relación entre el aumento de la MMP9 y un aumento en el número de neutrófilos en el pulmón, siendo los neutrófilos la fuente principal de producción de ésta enzima. Sin embargo en FPI, el aumento en la expresión de la MMP9 no puede ser explicado de esta forma. (Cisneros-Lira J. et al., 2003; Pardo A. et al., 2003; Pérez-Ramos J. et al., 1999; Ruiz V. et al., 2003; Swiderski R. et al., 1998).

Los estudios citados anteriormente sugieren que la MMP9 juega un papel patogénico en la fibrosis pulmonar; sin embargo, el ratón deficiente de la MMP9 desarrolla fibrosis de forma similar al ratón silvestre o wild type. Betsuyaku, T. et al., demostraron que la deficiencia de esta enzima no parece afectar la respuesta inflamatoria, ni la respuesta fibrosante después del tratamiento con bleomicina. Los pulmones de los **ratones deficientes de MMP9** (MMP-9^{-/-}) mostraron una inflamación alveolar comparable a la desarrollada por los animales wild type (MMP-9^{+/+}), estos datos sugieren que la MMP9 no es crítica para la migración de linfocitos y monocitos en el pulmón. Por otro lado, el contenido de hidroxiprolina y la severidad de la fibrosis fue similar entre los ratones wild type y MMP-9^{-/-}. El hallazgo más importante de este trabajo es que determinaron que la **bronquiolización alveolar** fue menor en los ratones MMP-9^{-/-} en comparación con los animales wild type, después del tratamiento con bleomicina. La bronquiolización alveolar ha sido considerada como un proceso de reparación epitelial, donde células del epitelio bronquial migran hacia las áreas denudadas después del daño alveolar; es claro que el proceso de migración celular involucra la degradación de la membrana basal por la MMP9 (Betsuyaku T. et al., 2000; Buckley S. et al., 2001).

En contraste, en un modelo de asma inducido por un tratamiento con ovalbúmina, utilizando ratones MMP-9^{-/-}, fue demostrado que los ratones deficientes desarrollaron menos fibrosis peribronquial en comparación con los wild-type, y que el número de eosinófilos fue menor. Estos datos sugieren que la MMP9 puede jugar un papel importante en el reclutamiento de eosinófilos en el pulmón (Lim D. et al., 2006).

Recientemente la MMP9 ha sido considerada como un regulador importante de la respuesta inmune innata y adaptativa. Una exagerada producción de IL-13 ha sido documentada en el estudio de la fibrosis pulmonar. La expresión constitutiva o inducible de IL-13, en un ratón transgénico (TG IL-13), genera un fenotipo patológico, caracterizado por inflamación pulmonar rica en macrófagos, neutrófilos, y linfocitos, y el desarrollo de fibrosis subepitelial e intersticial. Este ratón TG IL-13, fue cruzado con el ratón MMP-9^{-/-}, resultando un fenotipo interesante. El número de neutrófilos, así como el nivel de las citocinas KC y MIP-2 (quimio-atrayentes de neutrófilos) fue significativamente mayor en el pulmón de los ratones TG IL-13/ MMP-9^{-/-} comparación con los ratones TG IL-13/ MMP-9^{+/+}. Estos datos demuestran que la MMP9 podría estar procesando e inactivando quimiocinas neutrofílicas, regulando negativamente la migración de neutrófilos hacia el pulmón. Además *in vitro*, se ha demostrado que MMP9 degrada a otras quimiocinas de neutrófilos como GRO α y PF-4 (Lanone S. et al., 2002, Van den Steen P. et al., 2000).

Un extenso cuerpo de evidencias sugiere que existe una asociación entre la MMP9 y la fibrosis pulmonar. Sin embargo, estos estudios han sido fundamentalmente descriptivos. Los hallazgos derivados de los modelos animales han sido contradictorios; mientras que algunas evidencias sugieren que la MMP9 tiene un papel patológico, otras sugieren que la respuesta fibrosante es un proceso independiente de la actividad de MMP9, y que la MMP9 tiene un papel importante en la reparación epitelial después del daño y en la regulación de la respuesta inflamatoria. La aplicación de la tecnología de la transgénesis, es una forma eficiente de definir las funciones de la MMP9 in vivo y complementar los estudios fenomenológicos en la fibrosis pulmonar; en este trabajo de investigación, evaluamos la respuesta fibrosante pulmonar inducida por bleomicina en un ratón transgénico que sobre-expresa MMP9 específicamente en macrófagos.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la respuesta fibrosante pulmonar inducida por bleomicina en un ratón transgénico que sobre-expresa MMP9 específicamente en macrófagos bajo la regulación del promotor del receptor scavenger (SR-A) y establecer una comparación con los animales silvestres (wild-type).

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Inducir fibrosis pulmonar en ratones TG MMP9h y wild type por instilación intratraqueal de bleomicina.
- Analizar la expresión del transgen (MMP9h) en el modelo de fibrosis.
- Analizar la respuesta inflamatoria inducida por bleomicina.
- Analizar los cambios morfológicos en el pulmón después del tratamiento con bleomicina.
- Evaluar el contenido de colágena pulmonar en el modelo de fibrosis.
- Determinar la actividad gelatinolítica en pulmón, en el modelo de fibrosis.
- Evaluar el perfil de citocinas en el lavado bronquio-alveolar, en el modelo de fibrosis.
- Analizar algunos mecanismos involucrados en la respuesta inflamatoria y fibrosante.

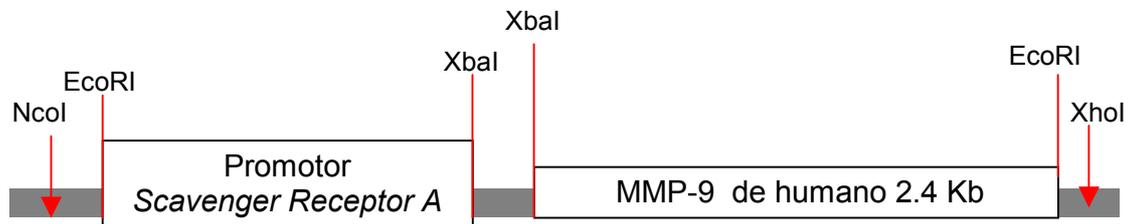
Metodología

Generación del ratón transgénico que expresa MMP9 de humano (MMP-9h) en macrófagos.

El ratón transgénico que sobre-expresa MMP-9 (**TG MMP-9h**) y el ratón silvestre (**WT**), fueron obsequiados por la Dra. Jeanine D'Armiento (Columbia University, New York, NY). El cDNA de la MMP9 (2.4 Kb) fue clonado en un vector que contenía la secuencia de poli-adenilación del gen de la beta-globina, y fue puesto bajo el control del promotor del gen del receptor SA-I (human Scavenger Receptor A-Enhancer/Promoter) que permite la expresión específica de la enzima en **macrófagos** (Lemaitre V. et al., 1999). La construcción final, de 8.3 kb fue micro-inyectada en cigotos de ratón (F1 [C57BL/6 x CBA/J] x F1[C57BL/6 x CBA/J]). Por Southern blot y PCR se establecieron las líneas de ratones que expresaban el transgen (genotipo); se utilizaron primers específicos para la MMP9 de humano, obteniendo un producto específico de 200pb en los ratones transgénicos.

Primer sense: 5'GCCAGGACCGCTTCTACTGGCGCGT3'

Primer anti-sense: 5'CAGAACAGAATACCAGTTTGTATC 3'



Construcción utilizada para la generación del transgénico.

Análisis de la expresión de MMP9 (humano), MMP-9 (ratón) e IGFBP-3 por PCR en tiempo real (q-PCR).

Confirmación de la expresión del transgen.

El fenotipo de los ratones fue establecido a nivel de mRNA. La expresión de MMP9 de humano y de ratón fue analizada en el pulmón de ratones TG MMP-9h y WT por PCR en tiempo real (i-Cycler iQ Detection System, Bio-Rad, Hercules, CA). El RNA total de pulmón se obtuvo por el método de Trizol (Life Technologies, NY), de acuerdo al protocolo del fabricante. Un microgramo de RNA fue tratado con 1U de DNAsa para evitar contaminación

con DNA genómico; este RNA fue utilizado para la síntesis de cDNA, utilizando el kit *Advantage RT for PCR* (Clontech, Palo Alto CA). Se diseñaron primers específicos para la **MMP9** de **humano** (primer sense: 5'- CCC TTC TAC GGC CAC TAC TGT-3', primer anti-sense: 5'- GCG ATG GCG TCG AAG ATG TT-3'), y para la **MMP-9** de **ratón** (primer sense: 5'- TGG CTT TTG TGA CAG GCA CTT-3', primer anti-sense: 5'- CCC GAC ACA CAG TAA GCA TTC-3'). Para evitar amplificaciones no específicas debido al alto grado de homología que existe entre la MMP-9 de humano y de ratón, se comparó la secuencia de los primers vs la secuencia del mRNA de cada gen, utilizando el *BLAST* (Basic Local Alignment Search, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

MMP9 humano: *Homo sapiens* matrix metalloproteinase 9, mRNA (gi:13543892)

MMP9 ratón: *Mus musculus* matrix metalloproteinase 9, mRNA (gi: 28461346)

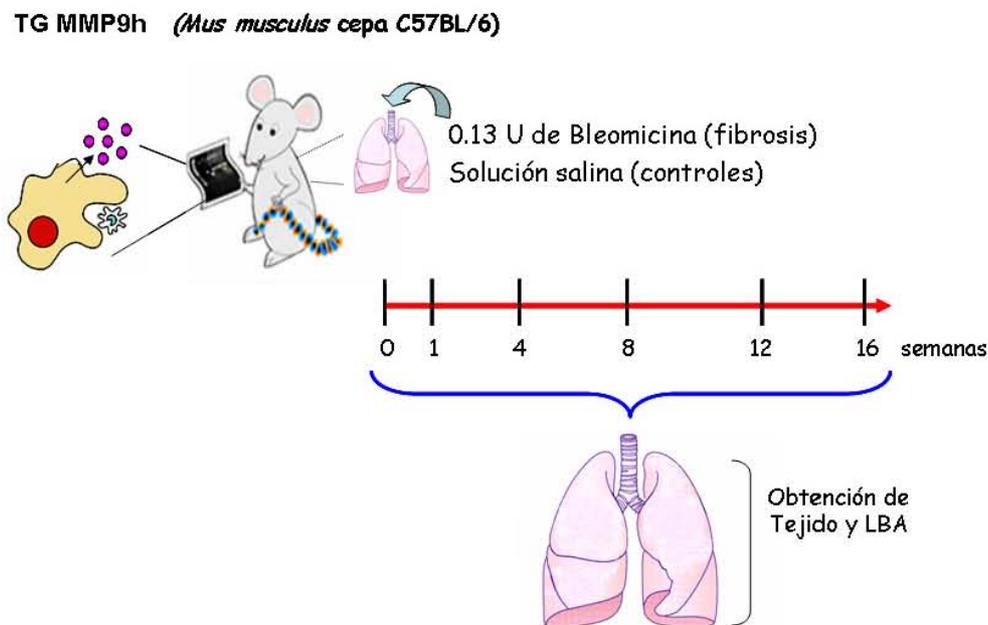
Se construyó una curva estándar con diluciones seriales (1×10^8 a 1×10^2 copias) de cada producto específico. La reacción de amplificación fue desarrollada bajo las siguientes condiciones: activación inicial de la DNA polimerasa (Amplitaq Gold) a 95°C por 7 min, desnaturalización a 95°C por 30 sec, alineación a 62°C por 30 sec y extensión a 72°C por 30 sec (40 ciclos). El **rRNA 18s** (primer sense: 5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3', primer anti-sense 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3') se utilizó como control endógeno para comparar diferencias en la cantidad de RNA total en cada muestra. La especificidad de los productos de PCR fue confirmada por el análisis de la curva de fusión (*melt curve*) y por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Los resultados fueron expresados como número de copias del gen blanco normalizados con rRNA 18s.

Para cuantificar el mRNA de **IGFBP3** (primer sense: 5'-CGT CCA CAT CCC AAA CTG TG-3', primer anti-sense 5'- CCA AGG GGA AAG ACG ACG TA-3') se siguió el protocolo descrito anteriormente.

Fibrosis experimental inducida por bleomicina.

Ratones transgénicos y silvestres fueron anestesiados con pentobarbital sódico, para recibir **bleomicina** (0.13 U/10 g de peso) (Blenoxane, Bristol-Myers Squibb Co.), por vía intra-traqueal en dosis única (**instilación**). La droga fue administrada en un volumen de 50µl, los animales control fueron instilados con el mismo volumen de solución salina. Los animales fueron sacrificados en distintos períodos de tiempo (1, 4, 8, 12 y 16 semanas post-

tratamiento) para evaluar el desarrollo tanto de la respuesta inflamatoria como de la respuesta fibrosante. Después del sacrificio, se obtuvieron los pulmones y se evaluó la gravedad de la fibrosis a través de la medición semicuantitativa de las lesiones y la determinación de hidroxiprolina.



Bleomicina.

La bleomicina es un glicopéptido utilizado para el tratamiento del cáncer, sin embargo, el potencial terapéutico de esta droga está limitado debido a la toxicidad pulmonar que presenta. El efecto citotóxico de la bleomicina es dependiente de la dosis, e involucra el desarrollo de pneumonitis la cual progresa a fibrosis pulmonar. Las células epiteliales alveolares son el blanco principal del daño inducido por bleomicina. La bleomicina activa, ejerce su efecto citotóxico a través de la generación de especies de oxígeno reactivas y por daño directo al DNA y al RNA.

Instilación.

Del latín *in*, en; y *stilla*, gota. Acción de agregar gota a gota. Metodológicamente consiste en realizar una traqueotomía e inyectar, en la luz la tráquea, la bleomicina o solución salina.

Evaluación semicuantitativa del porcentaje de fibrosis.

El pulmón derecho fue fijado por instilación a presión constante (25 cmH₂O) con paraformaldehído al 4% en PBS. Posteriormente el tejido fue deshidratado en alcohol etílico (30, 50, 70, 96%) y finalmente en xilol, después el tejido fue embebido en parafina y se hicieron cortes de 5µm. La extensión y grado de las lesiones, así como el porcentaje de inflamación y fibrosis, fueron evaluados después de la tinción de Masson y hematoxilina-

eosina. El **score de fibrosis** fue determinado al multiplicar la extensión de la lesión x el porcentaje de fibrosis.

Cuantificación de hidroxiprolina pulmonar.

La hidroxiprolina en pulmón fue cuantificada por una técnica colorimétrica (Woessner JF., 1961). Brevemente, los tejidos pulmonares se secaron a peso constante y se hidrolizaron en HCl 6N a 110°C por 24 horas. Alícuotas de este hidrolizado se utilizaron para el desarrollo de la técnica colorimétrica, utilizando el reactivo de Ehrlich. La hidroxiprolina se cuantificó por comparación con una curva patrón generada con concentraciones conocidas de 4-hidroxiprolina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Cada muestra fue analizada por triplicado. Los datos fueron expresados como microgramos de hidroxiprolina por pulmón izquierdo.

Evaluación del perfil celular en el lavado bronquioalveolar (LBA).

El LBA se utilizó para examinar los posibles cambios en las poblaciones celulares durante el desarrollo del modelo experimental. A través de una sonda intratraqueal se instilaron 2 alícuotas de 600µl de solución salina estéril. Posteriormente el líquido del LBA se recuperó por aspiración suave y el líquido obtenido se centrifugó a 1500 rpm a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante se separó para el análisis de citocinas y zimografía. El botón celular se resuspendió en 100µl de PBS estéril y una alícuota de 10µl se utilizó para contar el número total de células obtenidas utilizando un hemocitómetro. Posteriormente se determinaron los diferentes tipos de células inflamatorias presentes en el lavado en preparaciones teñidas con Wright-Giemsa. El conteo diferencial se realizó con un microscopio de luz convencional usando objetivos de 40 X contando un mínimo de 300-500 células en diferentes campos seleccionados al azar.

Evaluación del perfil de citocinas en el LBA.

El nivel relativo de **10 citocinas** involucradas en la patogénesis de la fibrosis pulmonar fue analizado en el LBA, utilizando arreglos de anticuerpos específicos inmovilizados en membranas (mouse cytokine antibody arrays, RayBiotech, Inc. Norcross, GA). Brevemente, las membranas fueron incubadas con el buffer de bloqueo por 30 min y después con 500µl del LBA de ratones (TG y WT, controles y tratados con bleomicina) por 2h a temperatura ambiente. La concentración de proteína en todas las muestras fue de 2µg/µl.

Las membranas fueron lavadas con el buffer de lavado e incubadas con 1 ml del cóctel de anticuerpos, conjugados con biotina por 2h a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas fueron lavadas e incubadas con el conjugado estreptavidina-peroxidasa por 1h y los complejos citocina-anticuerpo, fueron detectados por quimio-luminiscencia. Las membranas fueron expuestas a una película y procesadas por auto-radiografía. El nivel relativo de las citocinas fue comparado por densitometría.

Cuantificación de la actividad de mieloperoxidasa en LBA y tejido.

El pulmón fue homogenizado en buffer de fosfatos 50 mM (pH 6.0) y bromuro de hexadecil-trimetil amonio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). El homogenizado fue sonicado y centrifugado a 12,000 x g por 15 min a 4°C. Alícuotas de los sobrenadantes o del LBA fueron mezcladas con un buffer de fosfato de potasio que contenía O-dianisidina-2HCl (0.167 mg/ml; Sigma-Aldrich) y H₂O₂ al 0.0005 %. Después de 15 min de incubación, se adicionó NaN₃ al 1% (100 µl) para detener la reacción y la D.O. de la mezcla fue calculada a 460 nm. Mieloperoxidasa purificada (10 U/ml; Sigma-Aldrich) fue utilizada como control interno y control positivo de la reacción. La actividad de mieloperoxidasa se expresó como unidades/mg de proteína.

Digestión in vitro de la proteína IGFBP-3 de ratón por MMP-9.

La proteína **IGFBP3 recombinante de ratón** (200ng) fue incubada con la enzima **MMP9 de humano** purificada, en presencia del buffer de la enzima (glicina 0.1M, pH 8.0, CaCl₂ 5 mM y ZnCl₂ 5 mM), durante toda la noche a 37°C. Paralelamente en otra reacción, la MMP-9 humana fue pre-incubada con **EDTA** 100 mM por 1h a 37°C, antes de agregar el sustrato a la reacción (el EDTA fue utilizado como inhibidor de la actividad MMP). **APMA** (1.5 mM) fue utilizado como activador de MMPs. Las distintas reacciones fueron analizadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 15%, y posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF. Después de la transferencia, la membrana fue bloqueada por 1h con leche libre de grasa al 5% en PBS. La membrana fue incubada con el anticuerpo primario policlonal anti-mIGFBP-3 (1 µg/ml; R&D Systems, Inc.) a 4°C durante toda la noche. Después la membrana fue lavada con Tween 20 al 0.1% en PBS (pH 7.4) e incubada por 1h con el anticuerpo secundario anti-cabra (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA) a temperatura ambiente. La proteína IGFBP3 recombinante de ratón, así

como los productos de digestión fueron visualizados por quimio-luminiscencia (ECL chemiluminescent reagent, Amersham Corp., Arlington Heights, IL).

Zimografía en geles usando IGFBP3 como sustrato .

Las muestras de LBA fueron ajustadas a 15 µg de proteína y analizadas en geles de acrilamida al 8.5 % los cuales contenían 2µg/ml de **IGFBP3 recombinante de ratón** (R&D Systems, Inc.). Después de la electroforesis, los geles fueron lavados en Tritón X-100 (Sigma, St Louis, MO, USA) al 2.5% por 30 minutos y puestos en el buffer de incubación (glicina 0.1M, pH 8.0, CaCl₂ 5 mM y ZnCl₂ 5 mM) durante toda la noche a 37°C. Los fragmentos generados por la digestión de la proteína IGFBP-3 recombinante de ratón fueron transferidos a una membrana de PVDF. Después de la transferencia, la membrana fue procesada para inmunoblot como se describió en el experimento anterior.

Zimografía en geles de gelatina.

Para la extracción de proteínas, el tejido y el pellet celular del LBA fueron homogenizados con el buffer de CHAPS, el cual contenía CHAPS 10 mM, HEPES 20 mM y NaCl 150 mM. Los homogenizados fueron centrifugados a 12000 rpm por 30 minutos y el sobrenadante fue separado de los lípidos y del detritus tisular. Las proteínas totales fueron cuantificadas por el método de Bradford, utilizando una curva patrón con concentraciones conocidas de albúmina.

La actividad gelatinolítica de la MMP-9 fue evaluada por zimografía en el sobrenadante del LBA, en el pellet celular del LBA y en tejido. Las muestras de LBA fueron ajustadas a 15 µg de proteína y analizadas en geles al 8.5 % los cuales contenían 1 mg/ml de **gelatina**. Después de la electroforesis los geles fueron lavados en Tritón X-100 (Sigma, St Louis, MO, USA) al 2.5% por 30 minutos y puestos en el buffer de incubación (glicina 0.1M, pH 8.0, CaCl₂ 5 mM y ZnCl₂ 5 mM) durante toda la noche a 37°C. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 al 0.5% y desteñidos en una solución de metanol 30% y ácido acético 10%. En el gel, se observaron bandas blancas que representan la actividad enzimática en un fondo azul. El análisis cuantitativo de la actividad gelatinolítica se realizó utilizando un sistema de densitometría de Kodak (Eastman Kodak, Rochester, NY).

Inmunohistoquímica.

Para la localización de MMP9, MPO e IGFBP3 en pulmón, los tejidos fueron desparafinados en xilol por 30 min y después rehidratados (etanol 100%, 90%, 50% y agua). Para eliminar la actividad de peroxidasa endógena, los tejidos se incubaron con H₂O₂ (3%) en metanol por 10 min. Posteriormente se realizó la recuperación de antígenos incubando los tejidos en buffer de citratos 10 mM (pH 6.0) y calentado las laminillas en un horno de microondas por 5 min. Para evitar uniones inespecíficas antígeno-anticuerpo, los tejidos fueron tratados con suero de borrego diluido 1:100 en PBS por 20 minutos y con solución bloqueadora (Dako, Corp., Carpinteria, CA). Los tejidos fueron incubados con el anticuerpo primario por 18 horas a 4 °C. Como anticuerpos primarios se utilizaron: un anticuerpo monoclonal **anti-MMP9h** (1 µg/ml ; Chemicon, Temecula, CA), un anticuerpo policlonal **anti-MPO** (1 µg/ml; NeoMarkers, CA) y un anticuerpo policlonal **anti-mIGFBP-3** (1 µg/ml; R&D Systems, Inc.). Posteriormente los tejidos se incubaron con un anticuerpo secundario marcado con biotina y un complejo estreptavidina-peroxidasa (BioGenex), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para revelar, los tejidos se incubaron con 3-amino-9-etil-carbazol (AEC, BioGenex) como cromógeno, en buffer de acetatos con 0.05% de H₂O₂ y finalmente los tejidos fueron contra-teñidos con hematoxilina. En algunos tejidos el anticuerpo primario fue reemplazado por suero no inmune como control negativo.

Análisis estadístico.

En este trabajo, los datos fueron expresados como promedio \pm desviación estándar. Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas mediante la prueba de Tukey utilizando el paquete INER stat. Para el análisis del contenido de hidroxiprolina, además, se realizó regresión lineal, utilizando la concentración de hidroxiprolina como variable de respuesta para analizar los grupos (TG MMP9h vs WT) y el tipo de tratamiento (bleomicina vs solución salina). Además las diferencias entre los grupos se establecieron mediante el método de máxima verosimilitud, cuando el valor de p fue menor a 0.05 ($p < 0.05$).

Resultados

Caracterización de la población de estudio.

El peso corporal de los ratones transgénicos (TG MMP9-h) y wild type (WT) no tratados, fue comparado para evaluar si existía diferencia entre los grupos. Como se muestra en la **Fig. 8A**, no se encontraron diferencias significativas en el peso corporal al comparar los grupos. Por otro lado, se analizó el pulmón de ratones no tratados, para evaluar posibles cambios morfológicos debido a la sobre-expresión de MMP9. No se encontraron diferencias morfológicas en el pulmón de los ratones TG MMP9-h en comparación con los WT como se muestra en la **Fig. 8B**. Estos datos sugieren que la sobre-expresión de MMP9 en los macrófagos alveolares no modifica la morfología pulmonar de los ratones transgénicos no tratados.

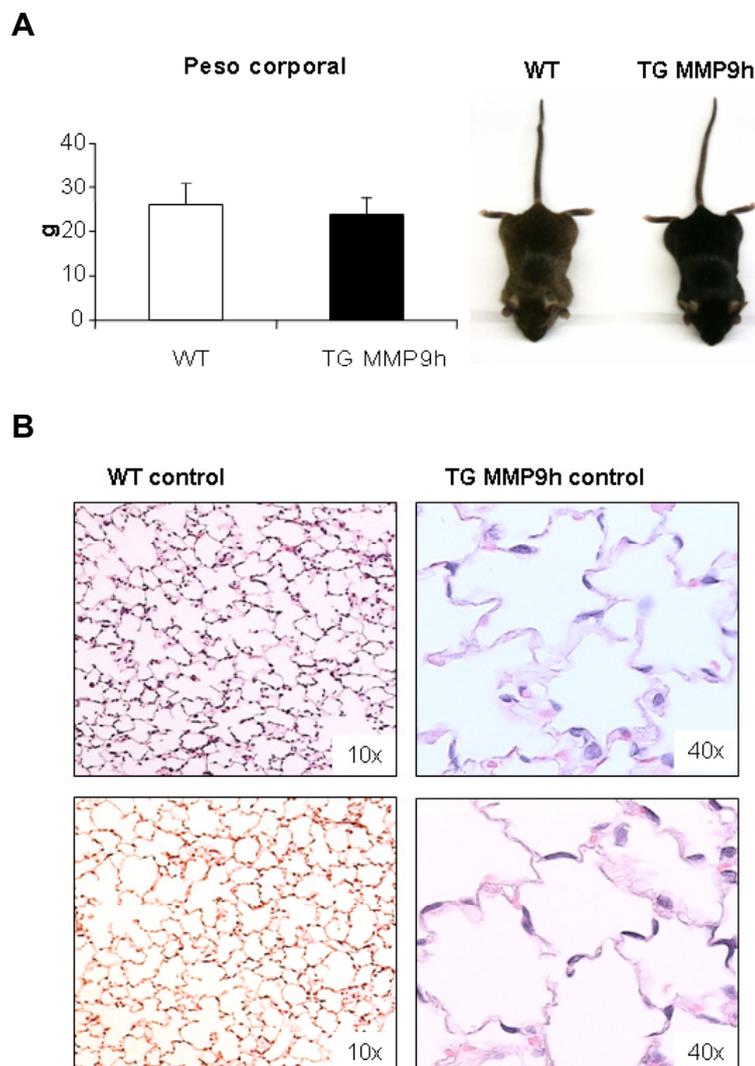


Fig. 8 Caracterización de los ratones TG MMP9-h. A) Peso corporal , n=18 (izq.) y fenotipo de ratones TG MMP9-h y WT(der). b) Pulmón de ratones TG MMP9-h y WT no tratados, HE.

Evidencia de la expresión de MMP9h en el ratón transgénico.

La expresión de las enzimas MMP9 de humano y de ratón, fue analizada en el pulmón de animales TG MMP9-h y WT, a nivel de RNA mensajero por PCR en tiempo real, y a nivel de proteína por zimografía en geles de gelatina. Un fragmento de 75 pb, correspondiente a la **MMP9 de humano** fue amplificado en el pulmón de ratones TG MMP-9h, pero no en el pulmón de ratones WT, como se esperaba. Un fragmento de 126 pb correspondiente a la **MMP9 de ratón** fue amplificado tanto en ratones TG MMP9-h, como en ratones WT. La expresión de MMP9 de humano, en el pulmón de los TG MMP9-h, aumentó durante la primera y cuarta semana después del tratamiento con bleomicina, al comparar con los animales control, posteriormente su expresión disminuyó ($p < 0.05$ **Fig. 9A**). Por otro lado, la expresión de la MMP9 de ratón aumentó durante la primera, cuarta y octava semana post-tratamiento, al comparar con los animales control, en ambos grupos TG MMP9-h y WT ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas en el nivel de MMP9 de ratón entre los grupos TG MMP9-h y WT en ningún periodo (**Fig. 9B**). Estos datos indican que la expresión del transgen, no induce cambios en la expresión de la MMP9 endógena (de ratón). También observamos un aumento en la actividad gelatinolítica en el pulmón de los ratones TG MMP-9h control, en comparación con los WT, por zimografía (**Fig. 9C**). Por inmunohistoquímica, localizamos a la MMP9 de humano en macrófagos alveolares y también en el espacio extracelular, como se esperaba (**Fig. 9D**).

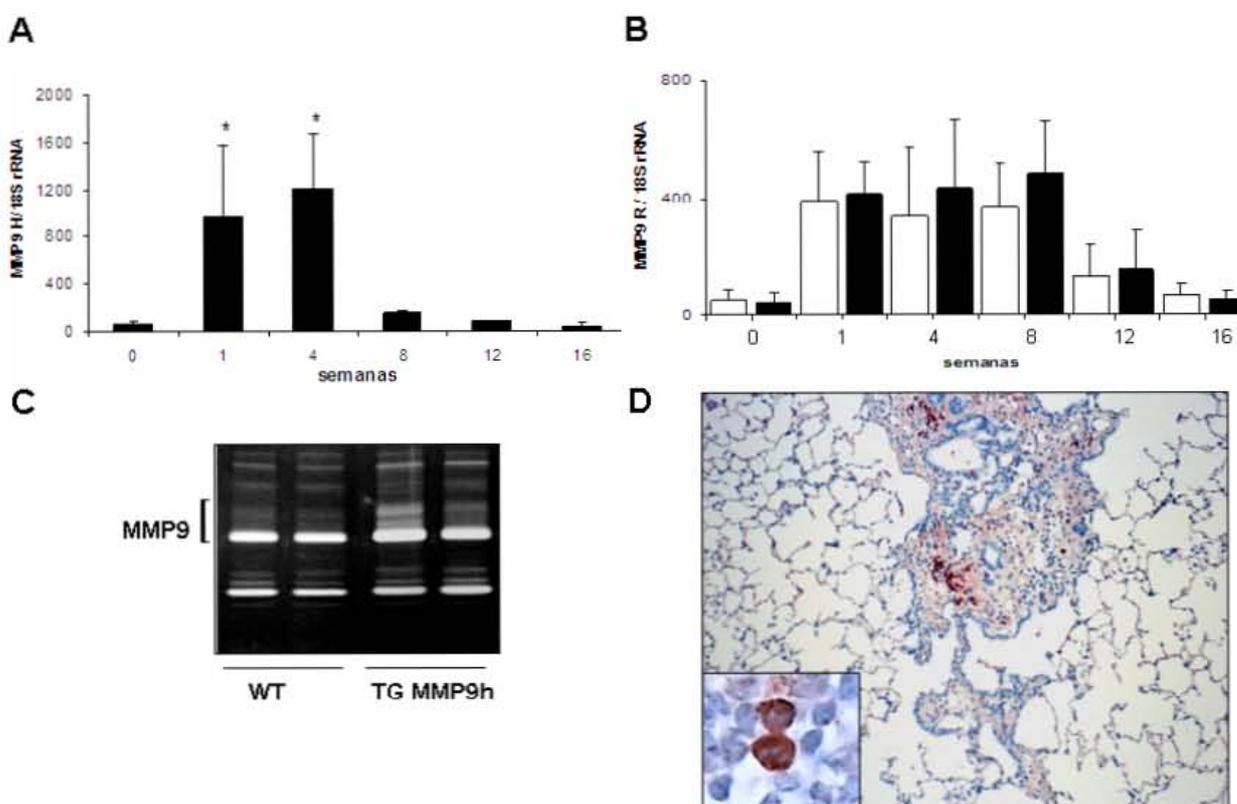


Fig. 9 A) Nivel de expresión de la MMP9 de humano, B) y de ratón en pulmón, determinado por q-PCR. TG MMP9-h (barras negras) y WT (barras blancas), $n = 6$, $*p < 0.05$. C) Zimograma de gelatina de extractos de tejido pulmonar de animales control, las bandas blancas representan la actividad gelatinolítica. D) Imagen representativa de la inmunolocalización de la MMP9 de humano en el pulmón de un TG tratado con bleomicina (10x), en el inserto se observan macrófagos alveolares positivos (40x).

Análisis de morbilidad y mortalidad post-institación.

Después de la instilación intra-traqueal de **solución salina** en los ratones TG MMP9-h y WT, no se observaron cambios en el peso corporal, y el 100% de los animales sobrevivieron al tratamiento, por lo tanto concluimos que la instilación de solución salina, no tiene ningún efecto en la morbilidad (analizada como pérdida de peso corporal), ni en la mortalidad. Después del tratamiento con **bleomicina**, el peso corporal de los ratones TG MMP9-h y WT disminuyó significativamente durante la primer semana post-institación, posteriormente, los animales recuperaron peso, a partir de la tercer semana post-institación (datos no mostrados). El mayor porcentaje de muerte después del tratamiento con bleomicina ocurrió durante la primer semana en ambos grupos (23.4 % TG vs 25.3 % WT), este efecto ha sido relacionado con el establecimiento de una respuesta inflamatoria aguda y con la pérdida significativa de peso corporal. No se encontraron diferencias significativas en el índice de mortalidad al comparar los grupos TG MMP9-hy WT (**Fig. 10**).

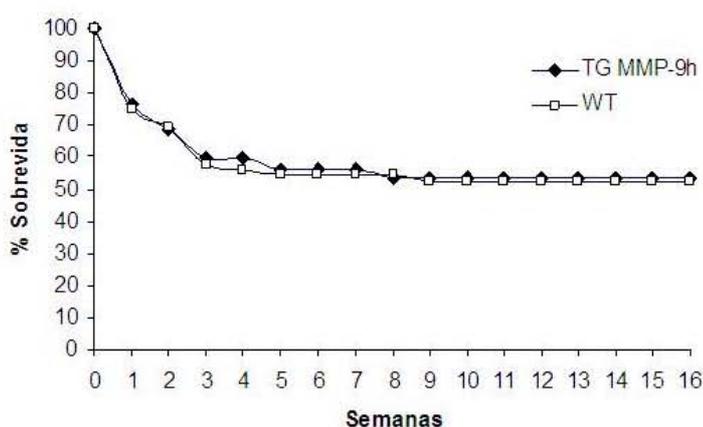


Fig. 10 Sobrevivencia de los ratones TG MMP9-h y WT después del tratamiento con bleomicina.

Análisis de la respuesta inflamatoria post-institación en el lavado bronquio-alveolar.

Para evaluar la **respuesta inflamatoria** después del tratamiento con bleomicina, se analizaron las cuentas celulares total y diferencial en el lavado bronquio-alveolar (LBA) de ratones TG MMP9-h y WT. Después de la primera semana post-institación con bleomicina, observamos un aumento significativo en el **número total de células inflamatorias** en el LBA, tanto en los ratones TG MMP9-h ($8.644 \pm 1.3 \times 10^5$ vs $20.3188 \pm 2.7 \times 10^5$ células) como en los WT ($7.32 \pm 095 \times 10^5$ vs $18.51 \pm 1.28 \times 10^5$ células), al comparar con sus respectivos controles (animales tratados con solución salina)($p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas al comparar los grupos TG MMP9-hyWT en ningún período (**Fig. 11A**).

Por otro lado, el análisis de la cuenta diferencial de las células inflamatorias reveló que el número de **neutrófilos** aumentó significativamente, tanto en el LBA de los TG MMP9-h, como en el LBA de los WT, durante la **primera semana** post-instilación, al comparar con sus respectivos controles, en respuesta al daño inducido por la bleomicina. Posteriormente, el número de neutrófilos disminuyó a niveles del control en ambos grupos. Sin embargo, el número de neutrófilos, fue significativamente menor en los TG MMP9-h, que en los WT, durante la primera semana post-instilación ($2.02 \pm 0.3 \times 10^5$ vs $3.66 \pm 0.68 \times 10^5$ células, $p < 0.05$) (**Fig. 11B**).

El número de **linfocitos** aumentó significativamente en el LBA de los TG MMP9-h y los WT durante la primera y cuarta semana post-instilación, al comparar con sus respectivos controles. Sin embargo, el número de **linfocitos** en el LBA de los TG MMP-9h fue significativamente menor, al comparar con los WT, en un período de 4 semanas post-instilación ($2.475 \pm 0.36 \times 10^5$ vs $1.33 \pm 0.3 \times 10^5$ células, $p < 0.05$) (**Fig. 11C**). El número de **macrófagos** aumentó significativamente tanto en los ratones TG MMP9-h, como en los WT (comparando vs sus respectivos controles), después de la primera y cuarta semana post-instilación, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en ningún período al comparar los grupos TG MMP-9h y WT (**Fig. 11D**). Los datos obtenidos del análisis de la cuenta diferencial, muestran que la respuesta inflamatoria desarrollada en los TG MMP9-h es diferente a la respuesta inflamatoria en los WT.

Por otro lado, la **actividad gelatinolítica**, cuantificada en extractos de células inflamatorias aisladas del LBA, fue significativamente mayor en los TG MMP9-h, en comparación con los WT, durante la primera semana post-instilación (**Fig. 12**). Estos datos indican que aunque no hubo diferencias en el número de macrófagos, la actividad de MMP9 es mayor en los transgénicos, confirmando su fenotipo.

Actividad de mieloperoxidasas en LBA y tejido.

Con el objetivo de confirmar que el infiltrado de **neutrófilos** en el pulmón de los ratones TG MMP9-h fue menor que en los WT, se cuantificó la actividad de **mieloperoxidasa** (MPO) en el tejido y en el LBA. La actividad de MPO aumentó significativamente tanto en el tejido como en el LBA, en los grupos TG MMP9-h y WT, después de la primera semana post-instilación, al comparar con sus respectivos controles ($p < 0.05$); sin embargo, la actividad de MPO fue significativamente menor en los ratones TG MMP9-h tanto en el tejido como en el LBA al comparar con los WT ($p < 0.05$), como se muestra en la **Fig. 13A y B**. La

actividad de mieloperoxidasa disminuyó después de la primera semana post-instilación. Estos datos muestran que hay una correlación entre el número de neutrófilos y la actividad de mieloperoxidasa, confirmando los datos obtenidos del análisis de la cuenta diferencial de células inflamatorias. Además, la localización de la mieloperoxidasa fue analizada por inmunohistoquímica. Observamos que los tejidos de los ratones WT fueron más inmunoreactivos que los tejidos de los ratones TG MMP9-h (Fig. 13C vs D).

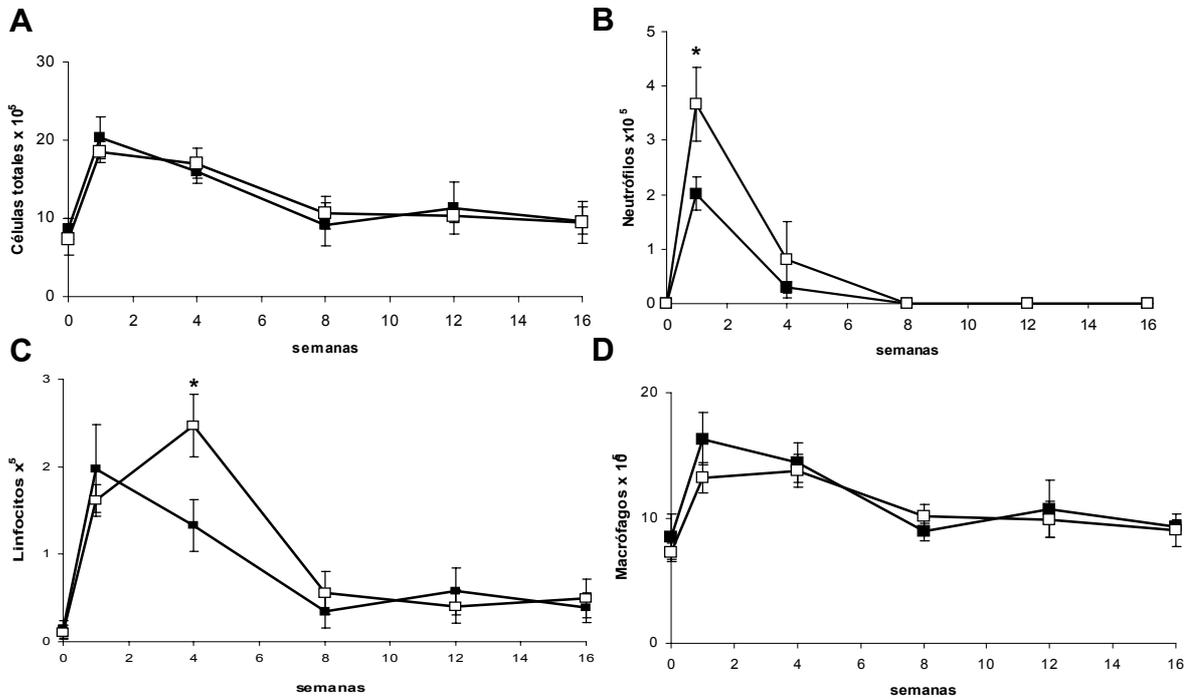


Fig. 11 A) Células totales, B) Neutrófilos, C) Linfocitos y D) Macrófagos en LBA. TG MMP9-h (cuadros negros) y WT (cuadros blancos), n= 6, * p< 0.05 (Comparación TG vs WT).

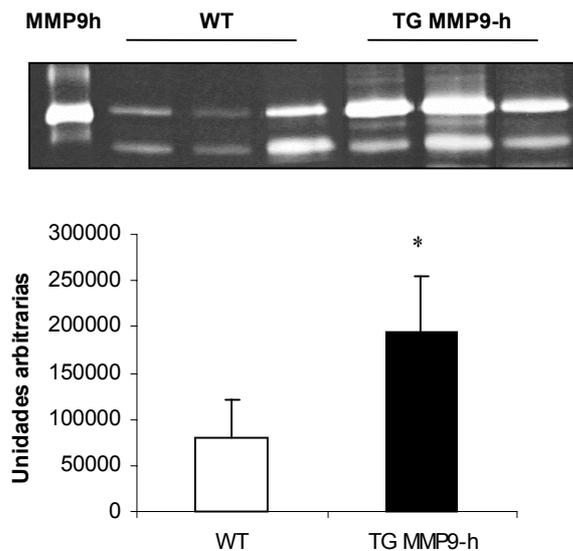


Fig. 12 Zimograma de gelatina (1 mg/ml) (panel superior). Como marcador positivo para la MMP-9 se utilizó medio condicionado de células U2-OS estimuladas con PMA (línea 1), extracto de células de LBA de ratones WT instilados con bleomicina y sacrificados a los 7d (líneas 2-4), extracto de células de LBA de ratones TG MMP9-h instilados con bleomicina y sacrificados a los 7d (líneas 6-8). Densitometría de las bandas de actividad gelatinolítica (panel inferior), n= 6, * p< 0.05 (Comparación TG vs WT).

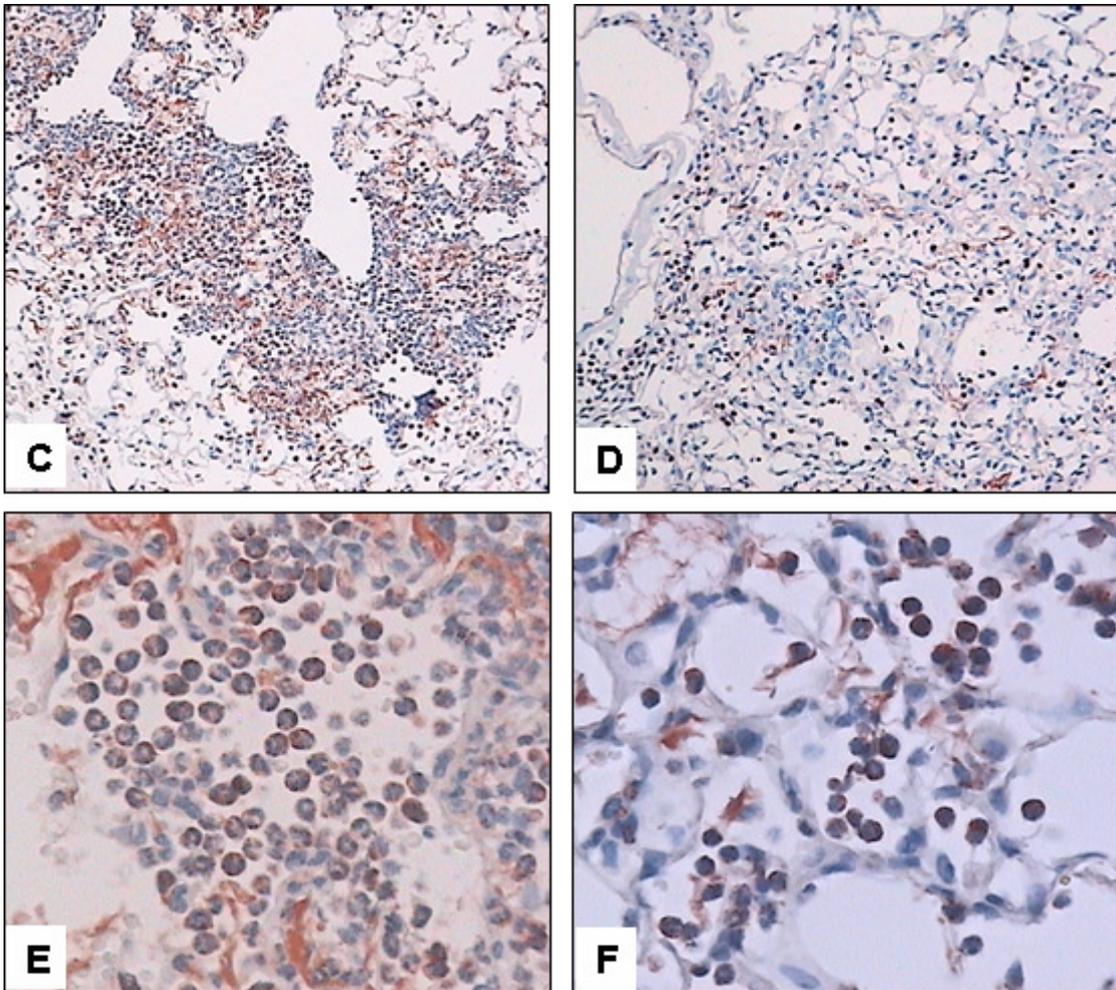
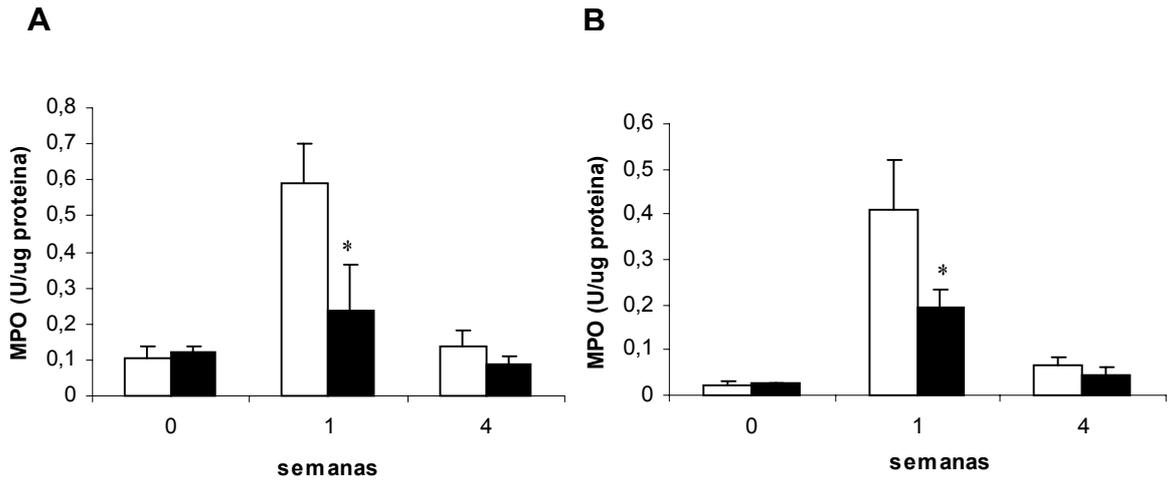


Fig 13. Cuantificación de la actividad de mieloperoxidasa en A) extracto de tejido pulmonar y B) en LBA. Los resultados están expresados como unidades de MPO/ μg de proteína. TG MMP9-h (barras negras) y WT (barras blancas), $n= 6$, * $p< 0.05$ (Comparación TG vs WT). Inmunolocalización de MPO en tejido pulmonar de ratones tratados con bleomicina y sacrificados después de la primer semana post-institación. C) WT (10X), D) TG MMP9-h (10X), E) WT (40X), F) TG MMP9-h (40X).

Análisis histológico post-instilación.

Los animales control fueron tratados con solución salina por vía intra-traqueal. No se encontraron diferencias morfológicas en el pulmón de los ratones TG MMP9-h, ni tampoco en los WT, después del tratamiento con solución salina, en ningún período (**Fig. 14A y B**).

Como agente inductor de fibrosis se utilizó bleomicina. Diversos estudios han mostrado que la administración intratraqueal de bleomicina produce daño directo al epitelio alveolar, el cual es capaz de liberar citocinas y factores de crecimiento que participan como quimio-atrayentes de células inflamatorias y fibroblastos.

Durante la **primera semana** después del tratamiento con bleomicina, observamos un aumento en la celularidad de los septos alveolares, asociado con inflamación intersticial e intra-alveolar y con un patrón multifocal. La inflamación estuvo caracterizada por células polimorfonucleares y mononucleares, tanto en los TG MMP9-h, como en los WT (**Fig. 14C y D, Tabla 3**).

Después de **4 semanas** post-instilación, observamos focos de fibrosis difusos, tanto en los ratones TG MMP-9h, como en los WT. Estos focos de fibrosis estuvieron caracterizados por el depósito de fibras de colágena, y la presencia de fibroblastos y miofibroblastos en el espacio intersticial (**Fig. 14E y F**). El análisis semicuantitativo de los cambios morfológicos no reveló diferencias al comparar los grupos TG MMP-9h y WT en este período; sin embargo, la fibrosis desarrollada por los ratones WT, en un período de **8 semanas** post-instilación, fue significativamente más extensa y severa, que en los ratones TG MMP-9h (**Fig. 15A y B**).

También observamos por tinción con Tricrómica de Masson, que el depósito de colágena en el intersticio pulmonar de los ratones WT fue mayor que en el pulmón de los ratones TG MMP-9h, a las 8 semanas post-instilación (**Fig. 15 C-F**). En las **semanas 12 y 16** post-instilación, la extensión de las lesiones pulmonares disminuyó considerablemente en ambos grupos, y observamos áreas grandes del pulmón con una morfología normal. Sin embargo, en algunos individuos, pequeños focos fibróticos subpleurales, y peribronquiales persistieron, mientras que en otros animales, observamos alargamiento de los espacios alveolares. El alargamiento de los espacios alveolares en los ratones TG MMP-9h fue más evidente, en comparación con los ratones WT (**Fig. 16A - F**).

Tabla 3 . Análisis semicuantitativo de los cambios morfológicos en pulmón, después del tratamiento con bleomicina.

	Extensión	Severidad	% de fibrosis
4 semanas			
WT	35 ± 21*	1.7 ± 0.5	25 ± 12
TG MMP-9h	19 ± 18	1.4 ± 0.5	21 ± 8
8 semanas			
WT	45 ± 16*	2.5 ± 0.5*	31 ± 18*
TG MMP-9h	27 ± 13	1.7 ± 0.5	23 ± 7
12 semanas			
WT	19 ± 20	1.1 ± 0.9	9 28 ± 24
TG MMP-9h	10 ± 9	1.2 ± 0.9	27 ± 23
16 semanas			
WT	10 ± 16	1.1 ± 0.9	6 ± 7
TG MMP-9h	5 ± 7	0.7 ± 0.8	5 ± 8

n= 6 – 10; * p< 0.05

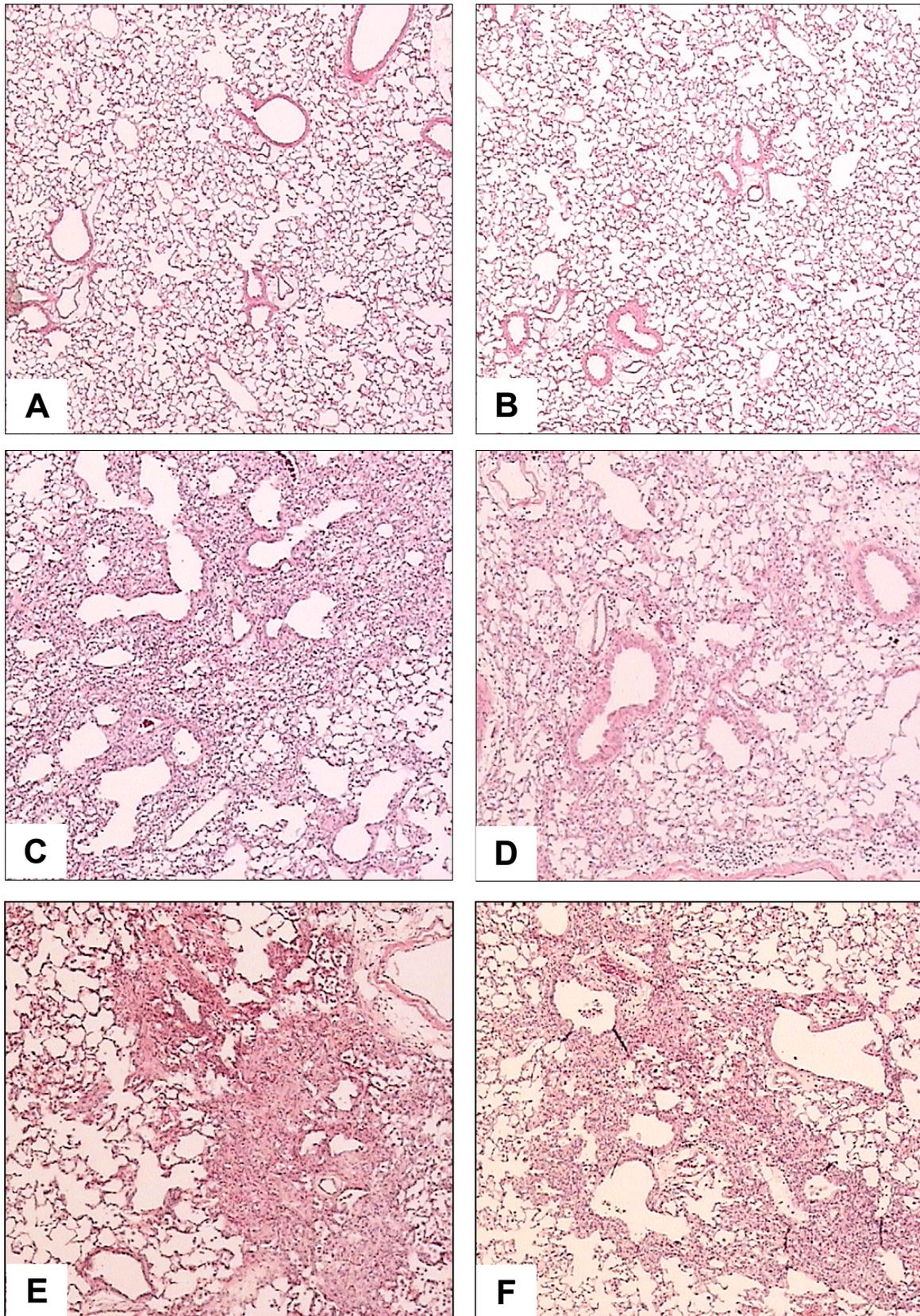


Fig 14. A) WT control, B) TG MMP9-h control, C) WT semana 1 post-bleo, D) TG MMP9-h semana 1 post-bleo, E) WT semana 4 post-bleo, F) TG MMP9-h semana 4 post-bleo. Tinción: hematoxilina y eosina. 4X

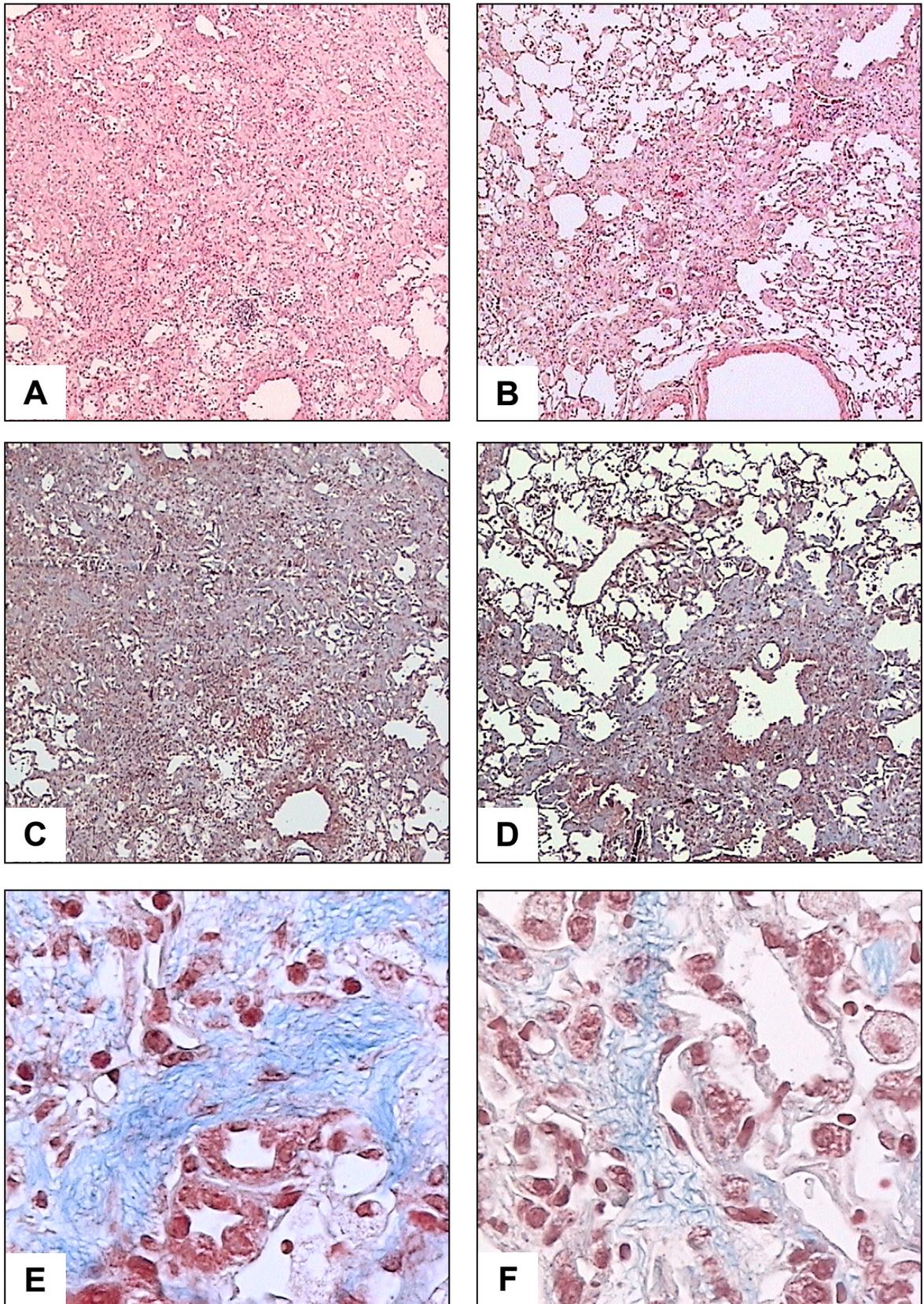


Fig. 15 A) WT semana 8 post-bleo, B) TG MMP9-h semana 8 post-bleo. Tinción: hematoxilina y eosina. C) WT semana 8 post-bleo, D) TG MMP9-h semana 8 post-bleo, E) WT semana 8 post-bleo, F) TG MMP9-h semana 8 post-bleo. Tinción: Tricrómica de Masson. (Fotos A, B, C y D 4X; E y F 40X).

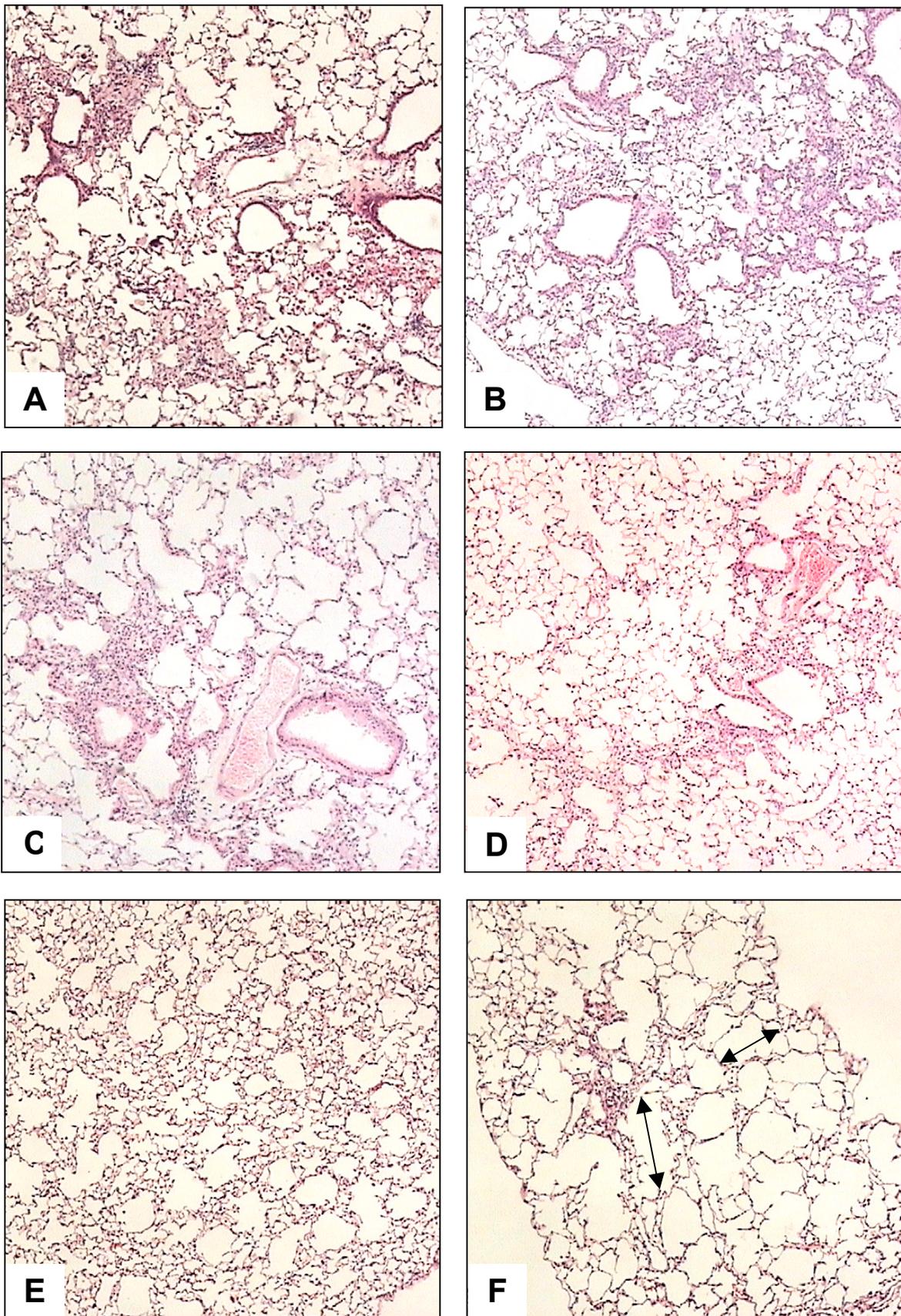


Fig. 16 A) WT semana 12 post-bleo, B) TG MMP9-h semana 12 post-bleo C) WT semana 16 post-bleo, D) TG MMP9-h semana 16 post-bleo, E) WT semana 16 post-bleo, F) TG MMP9-h semana 16 post-bleo. Tinción: hematoxilina y eosina. 4X

Contenido de hidroxiprolina en pulmón.

Controles (animales tratados con solución salina).

El contenido de hidroxiprolina fue analizado en los ratones TG MMP-9h y WT tratados con solución salina (períodos de 0 a 16 semanas). Observamos una tendencia al aumento en la concentración de hidroxiprolina pulmonar en ambos grupos, sin embargo no se encontraron diferencias significativas, ni en los ratones TG MMP-9h, ni en los WT, al hacer la comparación intra-grupal de los 5 períodos estudiados (**Fig. 17A y B**). Tampoco se encontraron diferencias significativas, al comparar los grupos TG MMP9-h y WT, en ningún período. Estos resultados demuestran que la instilación de solución salina no tiene ningún efecto en el contenido de hidroxiprolina, aunque hay una tendencia al aumento que puede estar relacionada con la edad y con un aumento fisiológico de la masa pulmonar.

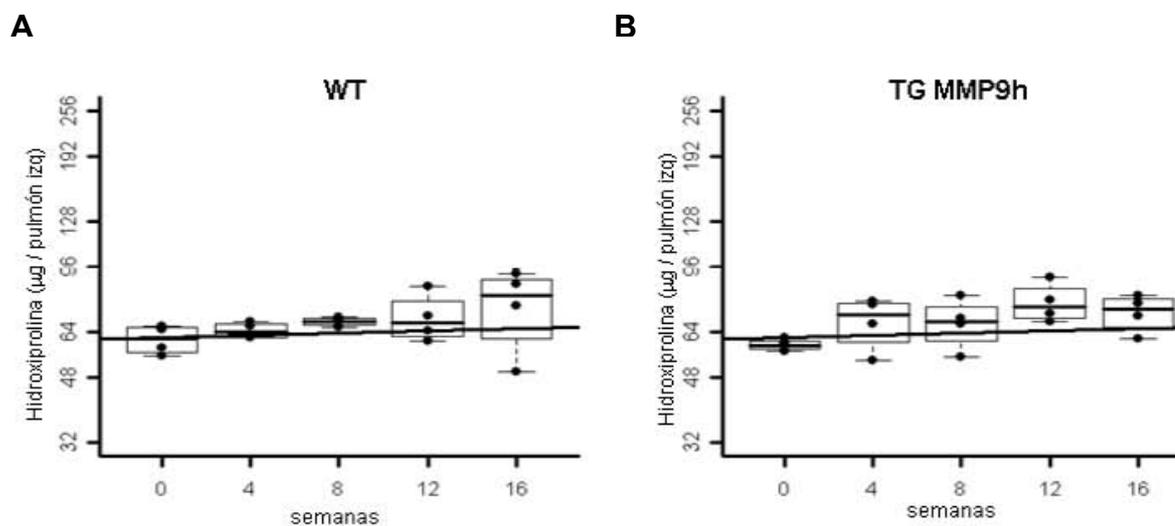


Fig. 17 Curso temporal del contenido de hidroxiprolina pulmonar de ratones control **A)** WT y **B)** TG MMP9-h. n= 4.

Animales tratados con bleomicina (0.13 U/ 10g peso corporal).

El tratamiento con bleomicina indujo un incremento significativo en el contenido de hidroxiprolina en el pulmón de los ratones TG MMP9-h (59.02 ± 2 vs 84.6 ± 15 µg/pulmón) y en los ratones WT (61 ± 5 vs 90.9 ± 8.3 µg/pulmón), después de **4 semanas** post-tratamiento, comparado con sus respectivos controles ($p < 0.05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los animales WT y TG MMP9-h. Después de **8 semanas** post-instilación, el aumento en la hidroxiprolina pulmonar fue significativamente mayor en

los ratones WT comparando con los TG MMP9-h (176.2 ± 20.4 vs 98.1 ± 15.4 ; $p < 0.001$) (**Fig. 18C**). Estos resultados indican que el depósito de colágena es mayor en los WT durante este período; esta observación se puede correlacionar con la extensión y grado de fibrosis (**Tabla 3**). A las **12 y 16 semanas** post-instilación, el contenido de hidroxiprolina fue variable. En algunos ratones el contenido de hidroxiprolina fue alto, mientras que en otros fue similar a los controles (observar dispersión de datos en **Fig. 18A y B**). Esto sugiere que la fibrosis en algunos animales es progresiva, mientras que en otros hay reversión y reparación tisular, lo cual ha sido confirmado con el análisis histológico. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de hidroxiprolina entre los WT y TG MMP9-h después de las semanas 12 y 16 (**Fig. 18C**).

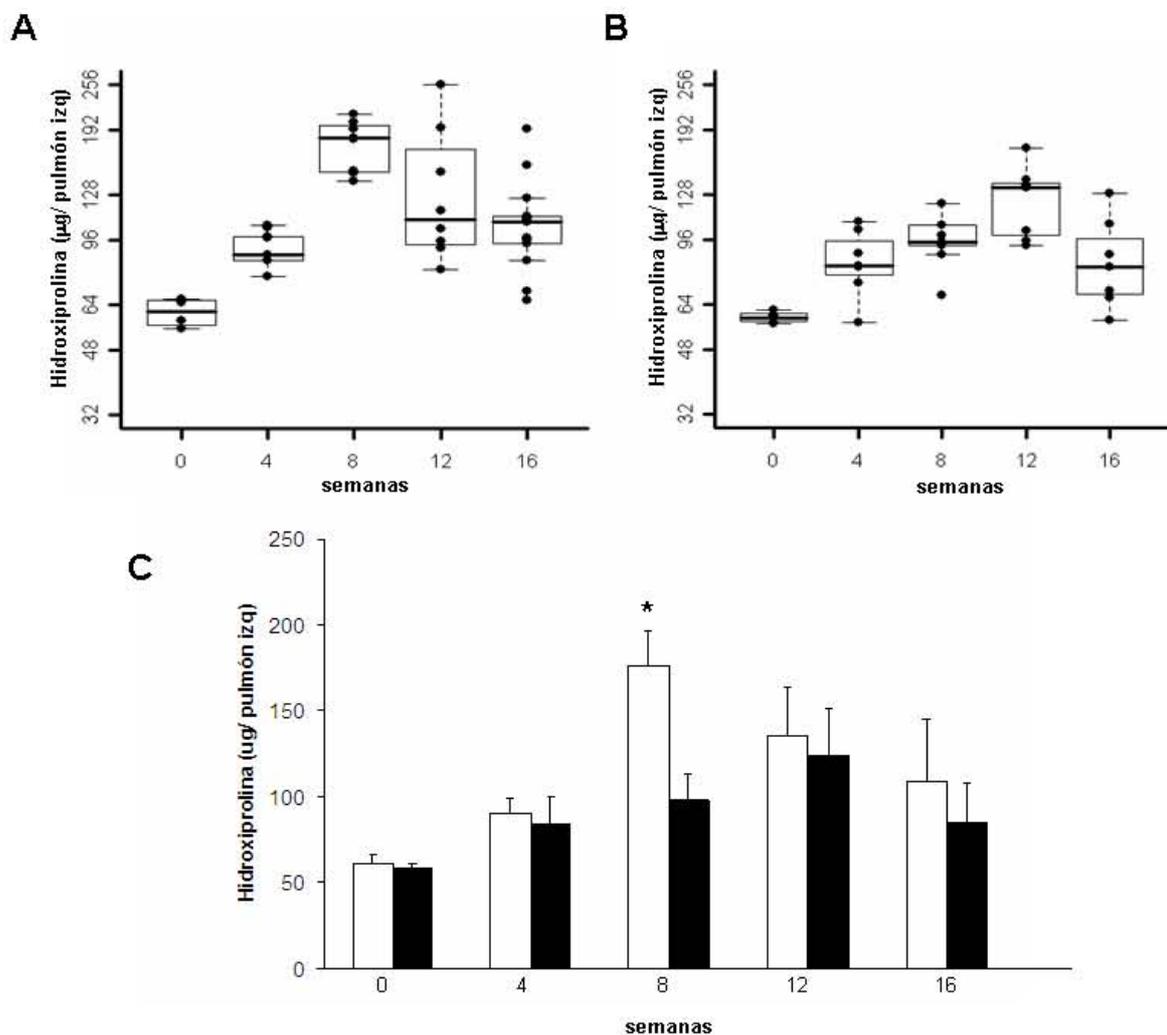


Fig. 18 Curso temporal del contenido de hidroxiprolina pulmonar de ratones tratados con bleomicina **A)** Box plot WT y **B)** Box plot TG MMP9-h. **C)** Comparación entre WT (barras blancas) y TG MMP9-h (barras negras), ($n = 4-10$, $p < 0.001$).

Perfil de citocinas en el lavado bronquio-alveolar.

Diversos estudios han mostrado que el perfil de citocinas determina el curso de la respuesta inflamatoria y de la respuesta fibrosante. Como se ha citado previamente, existen evidencias que sugieren que la MMP9 tiene un papel importante en la modulación de la respuesta inflamatoria procesando diferentes quimiocinas, citocinas y receptores.

En este estudio se ha mostrado que el desarrollo de fibrosis en los ratones TG MMP9-h fue menor en comparación con los ratones WT. Para explorar los posibles mecanismos involucrados en esta respuesta fibrosante moderada, comparamos el nivel de varias citocinas implicadas en la respuesta inflamatoria y/o fibrosante; algunas de ellas son sustratos conocidos de la MMP9 (ver **Tabla 2**). Las citocinas seleccionadas fueron: CRG-2, GM-SCF, IGFBP-3, IGFBP-5, IL-1 β , KC, PF-4, SDF-1, TIMP-1 y TNF- α . La cuantificación de estas proteínas se realizó en el LBA de ratones TG MMP-9h y WT, instilados con solución salina y con bleomicina (semanas 1 y 4).

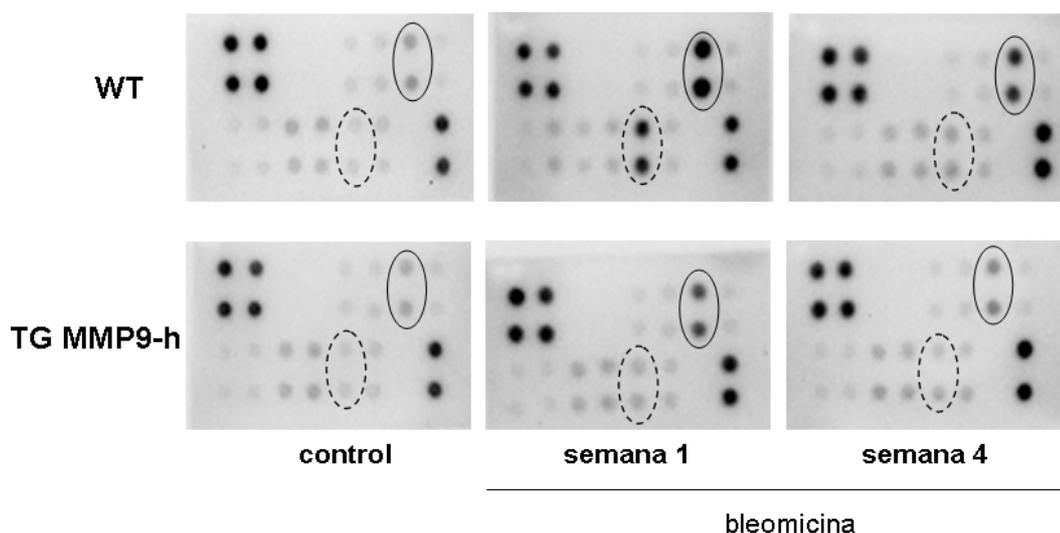
La **Fig. 19A**, muestra un ejemplo representativo del arreglo de anticuerpos utilizado para la cuantificación de citocinas. Observamos que el nivel de **IGFBP-3** en el LBA de los ratones instilados con bleomicina (semana 1 y 4) aumentó significativamente en comparación con los ratones control en ambos grupos, TG MMP9-h y WT ($p < 0.05$). Sin embargo, el nivel de IGFBP-3 fue significativamente menor en el LBA de los ratones TG MMP-9h al comparar con los WT, durante la primer semana post-instilación con bleomicina ($p < 0.01$) (**Fig. 19B**).

También detectamos diferencias en el nivel de TIMP-1 al comparar los grupos WT y TG MMP-9h. En los WT, el nivel de TIMP-1 aumentó significativamente durante la primera y cuarta semana post-intilación con bleomicina, al comparar con el grupo control. Por el contrario, el nivel de TIMP-1 no aumentó en el LBA los ratones TG MMP9-h tratados con bleomicina. El nivel de **TIMP-1** fue significativamente menor en el LBA de los ratones TG MMP9-h al comparar con los WT, durante la primer semana post-instilación con bleomicina (**Fig. 19C**). No encontramos diferencias en las demás citocinas evaluadas.

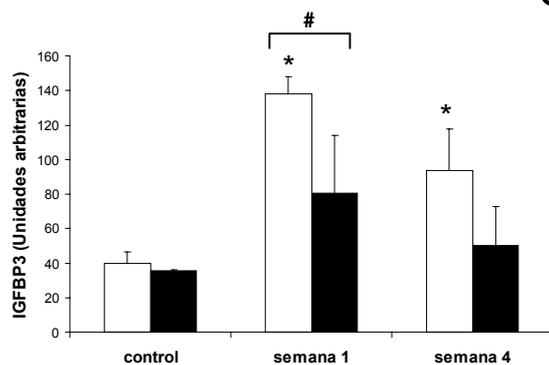
Tabla 4. Mapa del arreglo de citocinas.

	a	b	c	d	e	f	g	h
1	pos	pos	neg	neg	CXCL10	GM-CSF	IGFBP-3	IGFBP-5
2	pos	pos	neg	neg	CXCL10	GM-CSF	IGFBP-3	IGFBP-5
3	IL-1b	KC	PF-4	SDF-1	TIMP-1	TNF-a	BLANK	POS
4	IL-1b	KC	PF-4	SDF-1	TIMP-1	TNF-a	BLANK	POS

A



B



C

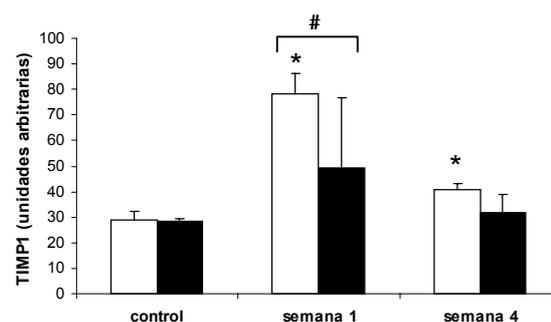


Fig. 19 A) Arreglo de anticuerpos para el análisis de citocinas en LBA de ratones WT y TG MMP9-h, controles y tratados con bleomicina. Los spots correspondientes a IGFBP-3 están indicados con una elipse continua, los spots correspondientes a TIMP-1 están indicados con una elipse punteada. Densitometría de **B)** IGFBP-3 y **C)** TIMP-1. WT (barras blancas) y TG MMP9-h (barras negras). * Comparación con sus respectivos controles, # comparación entre WT y TG MMP9-h (n= 6, p< 0.05).

Cuantificación de IGFBP-3 por q-PCR.

El mRNA de IGFBP-3 fue cuantificado por PCR en tiempo real. El nivel de IGFBP-3 aumentó significativamente después de la primera y cuarta semana post-instilación tanto en los ratones WT como en los ratones TG MMP9-h. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los grupos WT y TG MMP9-h en ningún período. Estos resultados sugieren que la sobre-expresión de MMP9 no tiene ningún efecto en la expresión de IGFBP3, por lo tanto la diferencia en el nivel de la proteína puede ser atribuida a eventos post-transcripcionales y/o post-traduccionales (**Fig. 20**).

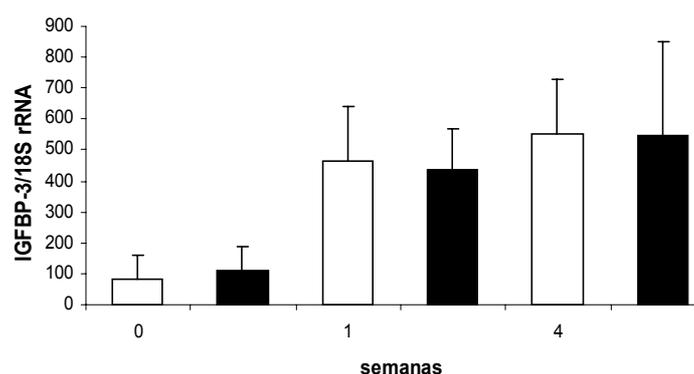


Fig. 20 El nivel del mRNA de IGFBP-3 fue determinado por PCR en tiempo real en pulmón de ratones WT y TG MMP9-h, controles y tratados con bleomicina. WT (barras blancas) y TG MMP9-h (barras negras), (n= 6).

Inmunolocalización de IGFBP-3 en el pulmón de los ratones WT y TG MMP9-h.

La familia de proteínas de unión a IGF (IGFBPs) esta conformada por seis miembros (IGFBP-1 a -6). Todas las IGFBPs son proteínas extracelulares y se unen a IGF-I e IGF-II con alta afinidad, regulando su interacción con el receptor IGF-R, y por lo tanto, su actividad. Las proteínas IGFBP-3 e IGFBP-5 además se unen a la matriz extracelular a través de un dominio de unión a heparina y presentan una señal de localización nuclear en el dominio carboxilo terminal.

En el pulmón de los ratones WT y TG MMP9-h controles, observamos tinción en la matriz extracelular que rodea los vasos como se señala en la **Fig. 21A y B**. En el pulmón de los ratones tratados con bleomicina y sacrificados durante la primera y cuarta semana, observamos que la proteína se encuentra en macrófagos alveolares e intersticiales y también en la matriz extracelular. La proteína inmunoreactiva fue menos abundante en los ratones TG MMP9-h en comparación con los WT (durante la primera y cuarta semana post-instilación) como se ejemplifica en la **Fig. 21C y D**. También observamos localización nuclear de IGFBP-3 en algunas células epiteliales, tanto en los WT, como en los TG MMP9-h (**Fig. 21E y F**).

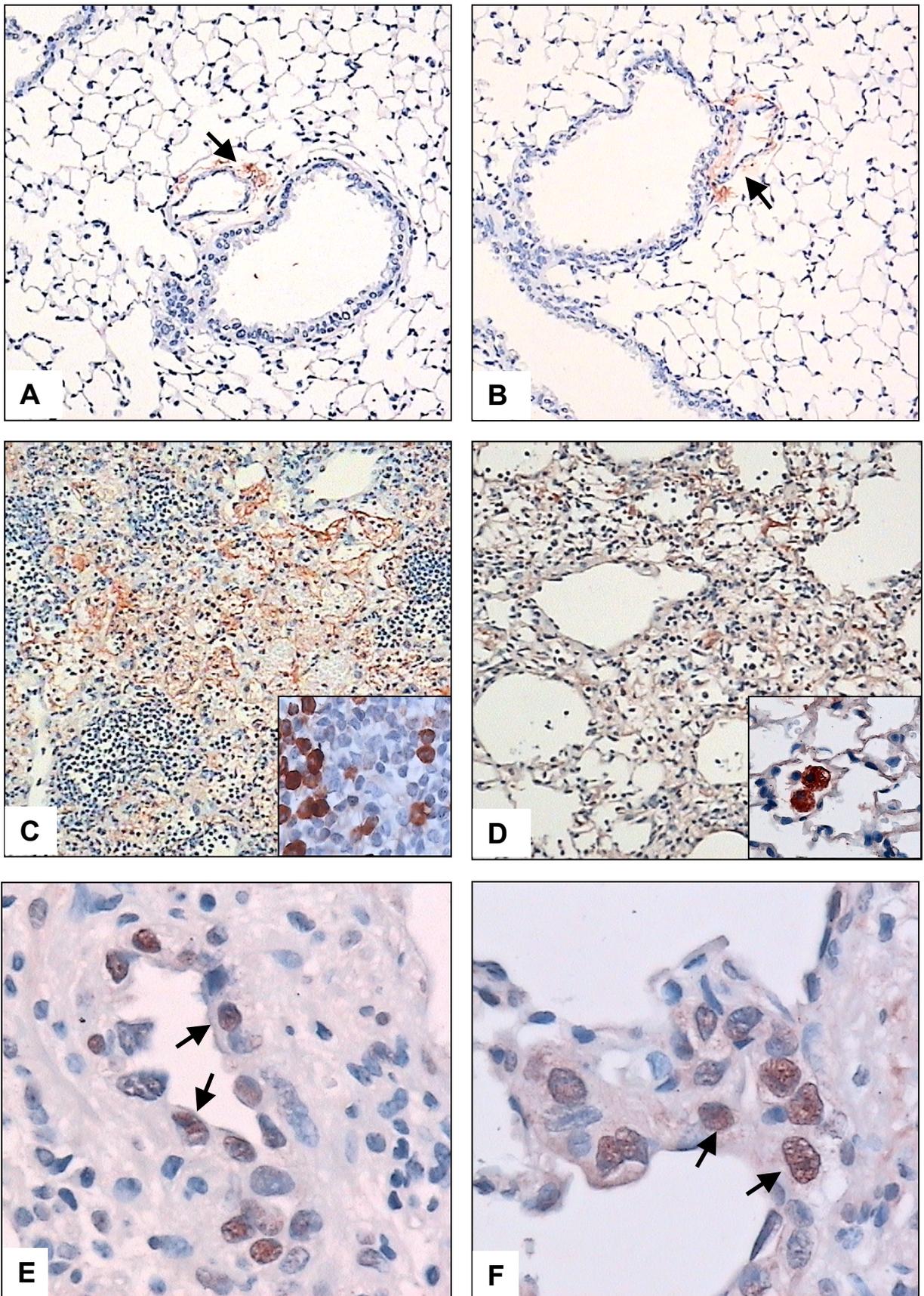


Fig. 21 Immunolocalización de IGFBP-3 en pulmón de ratones WT y TG MMP9-h. **A)** WT control, **B)** TG MMP9-h control, **C)** WT semana 1 post-bleo, **D)** TG MMP9-h semana 1 post-bleo (10X). Insertos en C y D muestran macrófagos alveolares e intersticiales positivos (40x). Núcleos positivos para IGFBP-3 en células epiteliales, **E)** WT semana 1 post-bleo, **F)** MMP9-h semana 1 post-bleo (100X).

Degradación in vitro de la proteína IGFBP-3 por MMP-9.

Diferentes proteasas que procesan a la proteína IGFBP-3 han sido descritas, incluyendo proteasas de serina, catepsinas y metaloproteinasas de matriz. Como se reportó anteriormente, el nivel de IGFBP-3 en el LBA de los ratones TG MMP9-h fue significativamente menor que en los WT durante la primera y cuarta semana post-instilación. Con estos antecedentes, surgió la hipótesis de que la **proteólisis de IGFBP-3** podría estar aumentada en el ratón TG MMP9-h, debido a que sobre-expresa MMP-9, resultando en niveles bajos de IGFBP-3 en el LBA. Para evaluar si la MMP-9 humana tenía actividad proteolítica sobre IGFBP-3, realizamos una digestión *in vitro*, utilizando MMP-9 humana purificada y la proteína IGFBP-3 recombinante de ratón. Por western blot observamos que la **forma intacta de IGFBP-3** presenta varias formas glicosiladas con una masa molecular aproximada entre los 40 y 50 kDa, y una **proteína central** de 29 kDa (**Fig.22, carril 1**). La MMP-9 humana procesó a la IGFBP-3, generando fragmentos de diferente masa molecular (~ 24 a 7 kDa) (**Fig.22, carril 2**). Adicionalmente, dos fragmentos diferentes de ~18 y 12 kDa fueron generados cuando la MMP-9 se activó previamente con APMA (**Fig.22, carril 3**). Asociado con la degradación de la IGFBP-3, la intensidad de las bandas, correspondientes a las formas glicosiladas, disminuyó; mientras que la intensidad de la de banda de 29 kDa aumentó, y los fragmentos de la degradación aparecieron. La digestión de la IGFBP-3 fue inhibida cuando EDTA 10 mM fue agregado a la reacción de digestión (**Fig. 22, carril 4**).

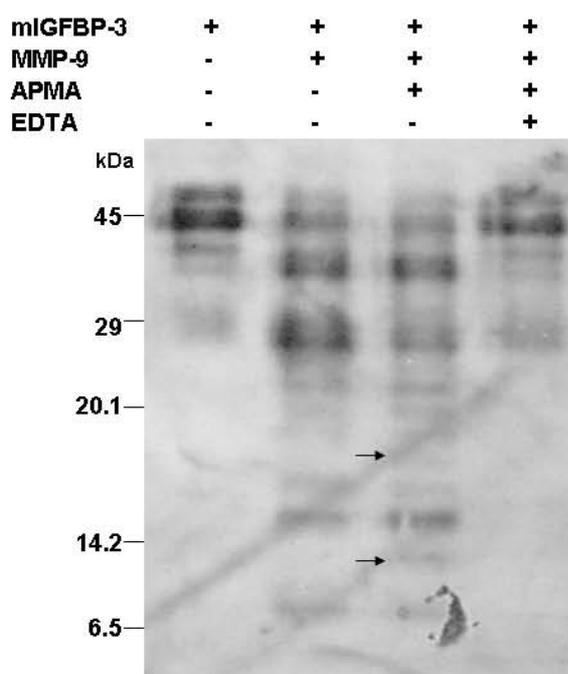


Fig. 22 Degradación in vitro de IGFBP-3 por MMP9. Carril 1: forma intacta, carril 2 y 3: procesamiento de IGFBP-3 por MMP9, carril 4: inhibición de la actividad proteolítica con EDTA.

Zimografía utilizando IGFBP-3 como sustrato.

Para evaluar *in vivo*, si el pulmón de los ratones TG MMP9-h y WT, expresaban **proteasas** capaces de procesar IGFBP-3, analizamos el LBA de ratones (semana 1 post-institución con bleomicina), por zimografía utilizando como sustrato IGFBP-3 recombinante de ratón. Después de la zimografía, los productos de la digestión fueron transferidos a una membrana de PVDF y analizados por Western blot. Observamos bandas inmunoreactivas que corresponden a la masa molecular de la **pro-MMP-9**, sólo en el LBA proveniente de los ratones TG MMP-9h, y no en el LBA de los WT (**Fig. 23**). Estas bandas desaparecieron cuando se agregó EDTA 10 mM al buffer de incubación, sugiriendo que la degradación de IGFBP-3 es dependiente de la actividad de MMPs (datos no mostrados).

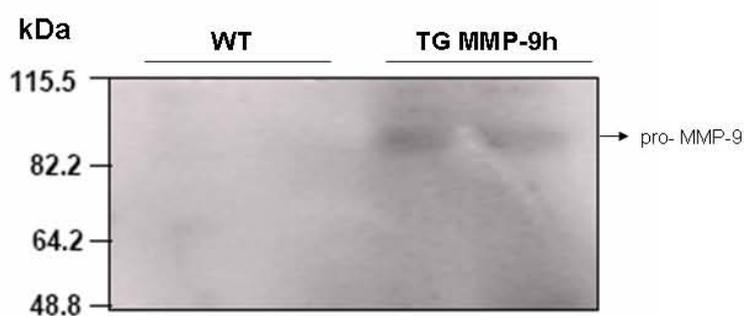


Fig.23 Zimografía utilizando IGFBP-3 como sustrato. El LBA de ratones WT (carril 1 y 2) y TG MMP9-h (carril 3 y 4) fue analizado después de la primera semana post-institución con bleomicina por zimografía, posteriormente se transfirió el gel a una membrana PVDF y se hizo Westernblot usando un anticuerpo α -IGFBP-3. Las bandas indican las zonas de degradación de IGFBP-3 y corresponden al peso molecular de la pro-MMP9.

Discusión

La Fibrosis Pulmonar Idiopática representa la entidad más común y agresiva de las Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas; es una enfermedad crónica, progresiva y letal, de etiología desconocida. Los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la fibrosis pulmonar no se conocen con precisión, sin embargo la enfermedad se caracteriza por la acumulación excesiva de moléculas de la matriz extracelular en el parénquima pulmonar (Pardo A. y Selman M., 2002).

Mucho de lo que actualmente conocemos sobre la patogénesis de la fibrosis pulmonar proviene de estudios experimentales realizados en animales. Los métodos convencionales para inducir fibrosis pulmonar experimental incluyen la instilación directa de un agente fibrogénico (asbesto, sílice, bleomicina, etc.) a través de la tráquea. La instilación intra-traqueal de bleomicina en ratón, se ha convertido en la actualidad, en el modelo experimental más popular para estudiar *in vivo* a la fibrosis pulmonar. Por otro lado, la generación de animales transgénicos, ha sido muy útil para determinar la función de genes específicos, en modelos experimentales de enfermedades humanas, en el contexto del organismo completo.

En este estudio se utilizó un ratón TG que sobre-expresa MMP9 de humano (específicamente en macrófagos, bajo la regulación del promotor del gen Scavenger Receptor-A), para evaluar el papel de ésta enzima en el desarrollo de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Siguiendo el modelo por un período de 4 meses, se demostró que la sobreexpresión de MMP9 en el TG MMP9h, resulta en una respuesta fibrosante retardada y moderada, en comparación con los ratones WT.

Diferentes estudios han demostrado que la expresión de MMP9 está aumentada en el pulmón de pacientes con FPI (Selman M. et al., 2006; Selman M. et al., 2000; Zuo F. et al., 2002); la enzima esta aumentada tanto en tejido como en LBA y distintos tipos de células la expresan: células de músculo liso, células epiteliales alveolares tipo II, células epiteliales bronquiales, fibroblastos, neutrófilos, linfocitos y macrófagos (Fukuda Y. et al., 1998; Hayashi T. et al., 1996; Lemjabbar H. et al., 1999; Pérez-Ramos J. et al., 1999; Selman M. et al., 2000).

La MMP9, en conjunto con la MMP2, degrada los componentes de la membrana basal, y su papel en la fibrosis ha sido principalmente relacionado con el metabolismo de esta estructura y la migración de células epiteliales y de fibroblastos. Sin embargo, actualmente sabemos que la MMP9 procesa un gran número de sustratos: citocinas, factores de crecimiento, receptores, proteasas, moléculas de adhesión e inhibidores de proteasas. Considerando el número de sustratos potenciales y la variedad de tipos celulares que expresan MMP9, podemos deducir que ésta enzima está involucrada en múltiples procesos biológicos, en diferentes microambientes, durante el desarrollo de fibrosis pulmonar.

MMP9 y la respuesta inflamatoria

La migración de células inflamatorias hacia los sitios de infección o de daño tisular es regulada por quimiocinas. La MMP9 juega un papel dual en la migración de neutrófilos durante la respuesta inflamatoria procesando quimiocinas. Se ha demostrado que la MMP9 corta un péptido de seis aminoácidos en la IL-8, aumentando su actividad quimiotáctica para neutrófilos. En primates la IL-8, es el activador más potente de neutrófilos, debido a que promueve la granulocitosis en estas células. La pro-MMP9 en los neutrófilos es almacenada en gránulos, y se ha observado que existe un proceso de retroalimentación positiva entre la IL-8 y la MMP9; mientras que la MMP9 potencia la actividad de IL-8, la IL-8 promueve su secreción al espacio extracelular (Van den Steen P. et al., 2000; 2003).

Contradictoriamente, se ha demostrado que la MMP9 degrada distintas quimiocinas atrayentes de neutrófilos. En el ratón no se ha encontrado una quimiocina homóloga a la IL-8, y se ha definido que la quimiotaxis de neutrófilos está mediada por GRO α , PF-4, MIP-2, KC y GCP-2, ésta última es considerada la quimiocina más potente en ratón. En un estudio *in vivo*, donde se utilizaron ratones deficientes de MMP9 que sobre-expresaban IL-13 (TGIL-13/MMP-9^{-/-}), se observó acumulación de KC y MIP-2 en el LBA, además de neutrofilia en el pulmón. El aumento de estas quimiocinas no estuvo relacionado con un aumento en el mRNA de estas proteínas y los autores proponen que MMP9 podría estar metabolizándolas e inactivándolas. Además *in vitro* se ha demostrado que MMP9 degrada a GRO α y a PF-4 (Van den Steen P. et al., 2000, 2003; Lanone S. et al., 2002).

En este estudio observamos que el número de neutrófilos en el LBA fue significativamente menor en los ratones TG MMP9h, en respuesta al daño inducido por bleomicina. Estos datos sugieren que la MMP9 podría estar regulando negativamente el influjo de neutrófilos hacia el pulmón, procesando quimiocinas o receptores de quimiocinas. Aunque no se encontraron diferencias en los niveles de KC y PF-4 en el LBA de los ratones TG MMP9-h comparando con los WT, otros quimiotrayentes podrían estar involucrados como MIP-2, GRO α y GCP-2. Sin embargo, el nivel de estas proteínas en el LBA no fue analizado en este trabajo.

Es importante mencionar que existe una relación positiva entre el número de neutrófilos y el desarrollo de fibrosis. El daño pulmonar inducido por bleomicina está caracterizado por el incremento de células mononucleares y granulocitos en el pulmón; estas células liberan enzimas oxidantes, especies de oxígeno reactivas, enzimas elastinolíticas, y citocinas que potencian la respuesta inflamatoria. Existen evidencias de que hay una correlación positiva entre el número de neutrófilos en el pulmón y la severidad de la fibrosis. Li et al., utilizaron un ratón deficiente de matrilisina (MMP7^{-/-}), y demostraron que este ratón es resistente al desarrollo de fibrosis pulmonar; este fenotipo fue asociado con la ausencia de neutrófilos en los espacios alveolares. Por otro lado, Pardo et al., observaron que el ratón deficiente de la enzima γ -glutamyl-transpeptidasa (GGT^{-/-}), tratado con bleomicina, desarrolla menos fibrosis pulmonar en comparación con el WT, y esto estuvo asociado con una respuesta inflamatoria poco neutrofílica (Li Q. et al., 2002; Pardo A. et al., 2003; Zuo F. et al., 2002).

En este contexto podríamos concluir que la respuesta fibrosante moderada en los ratones TG MMP9-h está relacionada con un infiltrado menor de neutrófilos en el parénquima pulmonar. Además la actividad de mieloperoxidasa en el LBA y en el pulmón de los TG MMP9-h, fue significativamente menor; en este contexto, podríamos deducir que el daño pulmonar por estrés oxidante fue menor en los transgénicos.

Relación MMP9 / TIMP1.

TIMP1 es uno de los principales inhibidores de la MMP9 en los tejidos, interesantemente, la pro-MMP9 forma un complejo estable con TIMP1, a través del dominio tipo hemopexina. El papel de esta interacción no se conoce con precisión. Es importante mencionar que TIMP1 es una de las proteínas altamente expresadas en la FPI. Además en modelos experimentales de fibrosis

pulmonar, ha sido demostrado que la expresión de TIMP-1 está incrementada (Kolb M. et al., 2002; Ruiz V. et al., 2003; Swiderski R. et al 1998; Garcia-Alvarez J. et al., 2006; Hayashi T. et al., 1996; Selman M. et al., 2000).

En este trabajo, se demostró que el nivel de TIMP1 en el LBA durante la primera y cuarta semana fue significativamente menor en los ratones TG MMP9-h, en comparación con los WT. El origen de este efecto no lo conocemos, sin embargo, podríamos sugerir que un exceso de pro-MMP9, podría estar en complejo con TIMP1. Existen evidencias de que este complejo puede ser endocitado, vía el receptor LRP, para posteriormente ser degradado. El nivel del mRNA para TIMP1 no fue analizado en este estudio, por lo tanto, no podemos descartar que haya menor expresión de este inhibidor en el transgénico.

Degradación de IGFBP-3 por MMP9.

Las IGFBPs (del inglés, **I**nsulin-like **g**rowth **f**actor **b**inding **p**rotein) son proteínas extracelulares que se unen a IGF-I e IGF-II con alta afinidad, regulando su interacción con el receptor IGF-R, y por lo tanto, su actividad. Seis IGFBPs han sido clonadas en mamíferos. Las IGFBPs son proteínas globulares, que acarrear a IGF en plasma, sin embargo, se ha demostrado que IGFBP-3 e IGFBP-5 además, se asocian con la matriz extracelular. Las IGFBPs pueden modular la actividad de los IGFs de una forma positiva o negativa, dependiendo del tipo celular, y sus efectos biológicos pueden ser dependientes o independientes de su interacción con los IGFs (Jones J. y Clemmons D., 1995; Bonner J. y Brody A., 1995).

La actividad de las IGFBPs esta regulada por diferentes procesos post-traduccionales como glicosilación, forforilación y procesamiento por proteasas específicas. Distintas proteasas pueden procesar a las IGFBPs, entre ellas: proteasas de serina, catepsinas, MMPs y ADAMs. Existen evidencias de que las IGFBPs o fragmentos generados por su protéolisis, tienen actividad biológica intrínseca (Fowlkes J. et al, 1994; Hemers E. et al., 2005; Manes S. et al., 1999; Mochizuki S. et al, 2003).

En este estudio demostramos que el nivel de IGFBP-3 en el LBA de los ratones TG MMP9-h fue significativamente menor en comparación con los WT. El nivel del mRNA para IGFBP3 fue comparable en los TG MMP9-h y los WT, por lo tanto, la disminución de la proteína en LBA puede ser explicada por un evento post-traducciona, como lo es la degradación proteolítica. Demostramos

con un experimento *in vitro* que la MMP9 procesa a IGFBP-3, generando distintos fragmentos. También *in vivo*, demostramos que el LBA de los ratones TG MMP9-h, contiene enzimas proteolíticas para IGFBP-3. Por zimografía observamos que la posición de los fragmentos de proteólisis, coinciden con el peso molecular de la MMP9. La actividad y concentración de las IGFBPs en los tejidos depende de distintas variables: síntesis de la proteína, abundancia de proteasas y presencia o ausencia de inhibidores de estas proteasas. Por lo tanto, podríamos deducir que una alta concentración de MMP9 en el pulmón de los TG MMP9-h, así como, una baja concentración de TIMP1, resultan en la proteólisis activa de IGFBP-3, lo que genera una menor concentración de la proteína.

Recientemente se ha propuesto que IGFBP-3 es una proteína pro-fibrosante. Se ha demostrado que la expresión de IGFBP-3, -4 y -5, está aumentada en tejido de pacientes con FPI y también en el modelo de bleomicina. En nuestro modelo, observamos que el nivel del mRNA de IGFBP-3 aumenta significativamente en respuesta al daño inducido por bleomicina tanto en los ratones TG MMP9-h, como en los WT. La proteína IGFBP-4 ha sido localizada en células del epitelio bronquial, mientras que IGFBP-3 e IGFBP-5 han sido localizadas en fibroblastos que se encuentran rodeando los espacios aéreos y en células epiteliales de bronquiolos y alvéolos (Aston C. et al., 1995; Pala L. et al., 2001; Pilewski J. et al, 2005; Selman M. et al., 2006; Schwartz D. et al; 2006). En este estudio observamos a IGFBP-3 asociado a la matriz extracelular y en macrófagos alveolares e intersticiales.

Por otro lado, se ha observado que IGFBP-3 e IGFBP-5 son secretadas en exceso por fibroblastos derivados de pacientes con FPI, comparado con fibroblastos de pulmón normal. Y además se observó que IGFBP-3 e IGFBP-5 estimulan la síntesis de colágena tipo I en fibroblastos (Pilewski J. et al, 2005). En este contexto, en nuestro modelo, podríamos deducir que la degradación activa de IGFBP-3 por MMP9, estaría regulando negativamente la de síntesis de colágena tipo I en fibroblastos, lo que resultaría en un menor depósito de matriz extracelular en el parénquima pulmonar.

Interesantemente, por inmunohistoquímica, encontramos células epiteliales con núcleos positivos para IGFBP-3 en el pulmón fibrótico, tanto en los TG MMP9-h, como en los WT; pero no en el epitelio de animales control. Las proteínas IGFBP-3 e IGFBP-5 poseen una secuencia de localización nuclear en el dominio carboxilo terminal, y se ha demostrado que, en células de cáncer de mama, IGFBP-3 es transportado por la proteína importina- β . Además se ha observado

que IGFBP-3 interacciona con el receptor nuclear RXR α (receptor α del retinoide X), y que esta interacción es necesaria para inducir apoptosis en ciertos tipos celulares (Lee K. y Cohen P., 2002; Singh B. et al, 2004).

Como mencionamos previamente, la IGFBP-3 tiene actividad biológica intrínseca y ha sido reportado que induce apoptosis en células epiteliales. En este contexto, podríamos hipotetizar que IGFBP-3 podría estar induciendo apoptosis en células epiteliales, evitando de esta manera una adecuada re-epitelización, sin embargo, en este estudio, no realizamos ninguna prueba para demostrar esto.

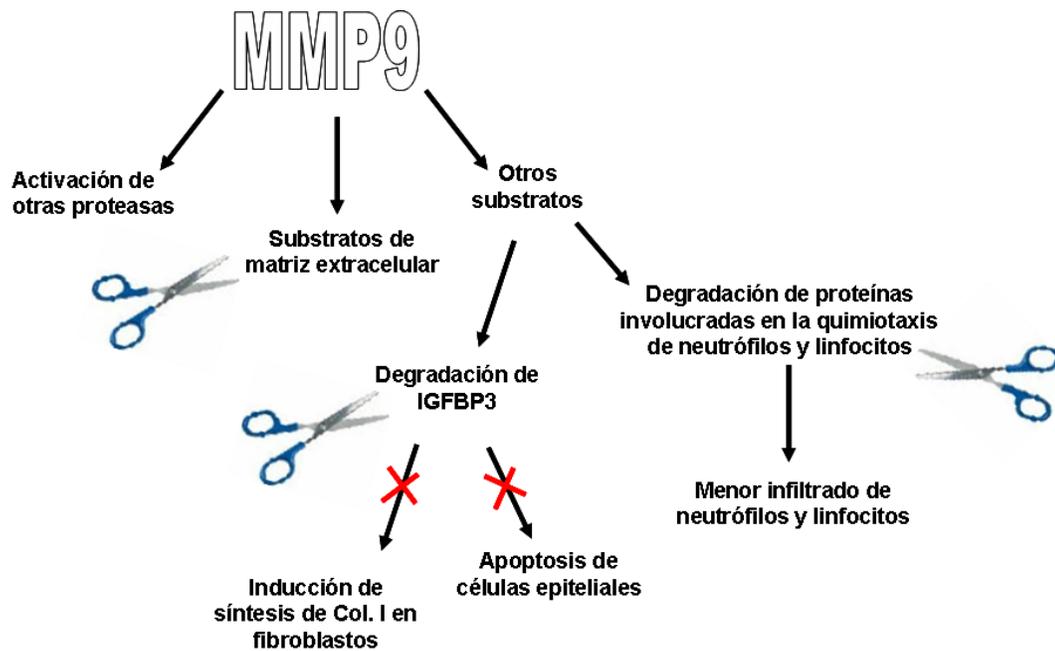


Fig. 24 Modelo hipotético del papel de la MMP9 durante la fibrosis pulmonar.

El mecanismo propuesto en este trabajo establece que la MMP9 secretada por macrófagos tiene un efecto anti-fibrosante mediado por la reducción de mediadores pro-fibrosantes como IGFBP-3 y TIMP1, y por un efecto inhibitorio de la respuesta inflamatoria. Considerando los substratos de la MMP9 podemos sugerir lo siguiente: a) Activación de otras proteasas- la MMP9 activa a la MMP2, MMP13 y plasmina, por lo tanto, no podemos descartar el efecto indirecto de la MMP9 sobre los substratos específicos de estas proteasas. b) Substratos de la MEC- considerando que la actividad de la MMP9 está aumentada en el ratón TG MMP9h, podríamos sugerir que la reabsorción de colágena en pulmón podría ser más rápida y eficiente en el transgénico, lo cual se reflejaría en un depósito menor de matriz extracelular en el intersticio pulmonar. c) Sustratos no componentes de la MEC- la MMP9 podría estar regulando negativamente el infiltrado de células inflamatorias en el pulmón, a través de la inactivación de quimiocinas y del rasurado del ectodominio o *shedding* de receptores específicos para éstas. Es importante considerar que la expresión de MMP9 está dirigida en macrófagos, los cuales son orquestadores de la respuesta inflamatoria. Finalmente, determinamos que la MMP9 procesa directamente a IGFBP3. La degradación de IGFBP3 podría inhibir sus efectos en la inducción de síntesis de colágena en fibroblastos, y en procesos de apoptosis en células epiteliales. Además, desconocemos si los fragmentos de IGFBP3 podrían tener actividad biológica. El efecto de IGFBP3 en células epiteliales, así como la actividad biológica de los fragmentos generados por proteólisis, podrían ser temas investigados en un futuro.

Conclusiones

En este trabajo se estudió el efecto de la sobre-expresión de MMP9 en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, utilizando un ratón transgénico que expresa MMP9 de humano específicamente en macrófagos y se concluye lo siguiente:

- La fibrosis desarrollada por los ratones TG MMP9h fue significativamente menor en comparación con los ratones WT, en un período de 8 semanas posteriores al tratamiento con bleomicina.
- El número de neutrófilos en el LBA, durante la primera semana post-instilación fue significativamente menor en los ratones TG MMP9h, en comparación con los ratones WT.
- La actividad de mieloperoxidasa en el pulmón y en el LBA de los ratones TG MMP9h, fue significativamente menor, en comparación con los ratones WT, durante la primera semana post-intilación.
- El número de linfocitos en el LBA, durante la cuarta semana post-instilación fue significativamente menor en los ratones TG MMP9h, en comparación con los ratones WT.
- El nivel de TIMP1 en el LBA de los ratones TG MMP9h, fue significativamente menor, en comparación con los ratones WT, durante la primera semana post-intilación.
- El nivel de IGFBP-3 en el LBA de los ratones TG MMP9h, fue significativamente menor, en comparación con los ratones WT, durante la primera y cuarta semana post-instilación.
- La MMP9 procesa proteolíticamente a IGFBP-3.

Referencias bibliográficas

Aston C, Jagirdar J, Lee TC, Hur T, Hintz RL, Rom WN. (1995). Enhanced insulin-like growth factor molecules in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J Respir. Crit. Care Med.*, 151, 1597-1603.

Atkinson JJ, Senior RM. (2003). Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am. J Respir. Cell Mol. Biol.*, 28, 12-24.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14(2):163-76

Betsuyaku T, Y. Fukuda, W. C. Parks, J. M. Shipley, and R. M. Senior. (2000). Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin. *Am. J Pathol.*, 157, 525-535.

Bonner JC, Brody AR. (1995). Cytokine-binding proteins in the lung. *Am. J Physiol.*, 268, L869-L878.

Brule S, Charnaux N, Sutton A, Ledoux D, Chaigneau T, Saffar L, Gattegno L (2006). The shedding of syndecan-4 and syndecan-1 from HeLa cells and human primary macrophages is accelerated by SDF-1/CXCL12 and mediated by the matrix metalloproteinase-9. *Glycobiology.* 16(6):488-501.

Buckley S, Driscoll B, Shi W, Anderson K, Warburton D (2001). Migration and gelatinases in cultured fetal, adult, and hyperoxic alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281(2):L427-34.

Cauwe B, Van den Steen PE, Opdenakker G (2007). The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 42(3):113-85.

Chakrabarti S, Patel KD (2005). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res.* 31(6):599-621.

Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Ramos C, Selman M, Pardo A. (2003). Cigarette smoke exposure potentiates bleomycin-induced lung fibrosis in guinea pigs. *Am. J Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 285, L949-956.

Fernandes DJ, Bonacci JV, Stewart AG (2006). Extracellular matrix, integrins, and mesenchymal cell function in the airways. *Curr Drug Targets.* 7(5):567-77.

Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. (2004). Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int. J Dev. Biol.*, 48, 411-424.

Fowlkes JL, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H. (1994). Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol. Chem.*, 269, 25742-25744.

- Fridman R**, Toth M, Chvyrkova I, Meroueh SO, Mobashery S (2003). Cell surface association of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Cancer Metastasis Rev.* 22(2-3):153-66.
- 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.
- Garcia-Alvarez J**, Ramirez R, Checa M, Nuttall RK, Sampieri CL, Edwards DR, et al. (2006). Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 is up-regulated by transforming growth factor-beta1 in vitro and expressed in fibroblastic foci in vivo in idiopathic pulmonary fibrosis. *Exp. Lung Res.*, 32, 201-214.
- Gijbels K**, Proost P, Masure S, Carton H, Billiau A, Opdenakker G (1993). Gelatinase B is present in the cerebrospinal fluid during experimental autoimmune encephalomyelitis and cleaves myelin basic protein. *J Neurosci Res.* 1;36(4):432-40.
- Gu Z**, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA (2002). S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 297(5584):1186-90.
- Hayashi T**, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, et al. (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.
- Heissig B**, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell.* 109(5):625-37.
- Hemers E**, Duval C, McCaig C, Handley M, Dockray GJ, Varro A (2005). Insulin-like growth factor binding protein-5 is a target of matrix metalloproteinase-7: implications for epithelial-mesenchymal signaling. *Cancer Res.* 65:7363-7369.
- Jones JI**, Clemmons DR. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrinol. Rev.*, 16, 3-34
- Kabir-Salmani M**, Shimizu Y, Sakai K, Iwashita M (2005). Posttranslational modifications of decidual IGFBP-1 by steroid hormones in vitro. *Mol Hum Reprod.* 9:667-71.
- Kaviratne M**, Hesse M, Leusink M, Cheever AW, Davies SJ, McKerrow JH, Wakefield LM, Letterio JJ, Wynn TA (2004). IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *J Immunol.* 173(6):4020-9.
- Kim KH**, Burkhart K, Chen P, Frevert CW, Randolph-Habecker J, Hackman RC, et al. (2005). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 deficiency amplifies acute lung injury in bleomycin-exposed mice. *Am. J Respir. Cell Mol. Biol.*, 33, 271-279.
- Kolb M**, Bonniaud P, Galt T, Sime PJ, Kelly MM, Margetts PJ, et al. (2002). 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.*, 27, 141-150.

- Kotra LP**, Zhang L, Fridman R, Orlando R, Mobashery S (2002). N-Glycosylation pattern of the zymogenic form of human matrix metalloproteinase-9. *Bioorg Chem.* 5:356-70.
- Lanone S**, Zheng T, Zhu Z, Liu W, Lee CG, Ma B, et al. (2002). Overlapping and enzyme specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and -12 in IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Clin. Invest.*, 110, 463-474.
- Lee CG**, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteliansky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, Senior RM, Elias JA (2001). Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med.* 194(6):809-21
- Lee KW**, Cohen P. (2002). Nuclear effects: unexpected intracellular actions of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Endocrinol.*, 175, 33-40.
- Legrand C**, Gilles C, Zahm JM, Polette M, Buisson AC, Kaplan H, et al. (1999). Airway epithelial cell migration dynamics: MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling. *J Cell Biol.*, 146, 517-529.
- Lemaitre V**, O'Byrne TK, Borczuk AC, Okada Y, Tall AR, D'Armiento J. (2001). ApoE knockout mice expressing human matrix metalloproteinase-1 in macrophages have less advanced atherosclerosis. *J Clin. Invest.*, 107, 1227-34.
- Lemaitre V**, O'Byrne TK, Dalal SS, Tall AR, D'Armiento JM. (1999). Macrophage specific expression of human collagenase (MMP-1) in transgenic mice. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 878, 736-9.
- Lemjabbar H**, Gosset P, Lechapt-Zalcman E, Franco-Montoya ML, Wallaert B, Harf A, et al. (1999). Overexpression of alveolar macrophage gelatinase B (MMP-9) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: effects of steroid and immunosuppressive treatment. *Am. J Respir. Cell Mol. Biol.*, 20, 903-913.
- Li Q**, Park PW, Wilson CL, Parks WC. (2002). Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell.*, 111, 635-646.
- Lim DH**, Cho JY, Miller M, McElwain K, McElwain S, Broide DH (2006). Reduced peribronchial fibrosis in allergen-challenged MMP-9-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2:L265-71.
- Liu, X.** Zhou, S.D. Shapiro, J.M. Shipley, S.S. Twining, L.A. Diaz, R.M. Senior and Z. Werb (2000). The serpin $\alpha 1$ -proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo, *Cell* 102: 647–655.
- Ma Z**, Shah RC, Chang MJ, Benveniste EN (2004). Coordination of cell signaling, chromatin remodeling, histone modifications, and regulator recruitment in human matrix metalloproteinase 9 gene transcription. *Mol Cell Biol.* 12:5496-509.
- Manes S**, Llorente M, Lacalle RA, Gomez-Mouton C, Kremer L, Mira E, et al. (1999). The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J Biol. Chem.*, 274, 6935-6945.

McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, Overall CM (2001). Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem.* 276:43503-8.

Mochizuki S, Shimoda M, Shiomi T, Fujii Y, Okada Y. (2004). ADAM28 is activated by MMP-7 (matrilysin-1) and cleaves insulin-like growth factor binding protein-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315, 79-84.

Mott JD, Werb Z (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* 5:558-64.

Nagase H, Visse R, Murphy G (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.*, 69, 562-573.

Nair RR, Boyd DD (2005). Expression cloning of novel regulators of 92 kDa type IV collagenase expression. *Biochem Soc Trans.* 5:1135-6.

Nuzzo D, Vasto S, Balistreri CR, Di-Carlo D, Listi F, Caimi G, Caruso M, Hoffmann E, Incalcaterra E, Lio D, Caruso C, Candore G (2006). Role of proinflammatory alleles in longevity and atherosclerosis: results of studies performed on -1562C/T MMP-9 in centenarians and myocardial infarction patients from Sicily. *Ann N Y Acad Sci.* 1089:496-501.

Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, Van Damme J (2001). Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol.* 6:851-9.

Opdenakker G, Van den Steen PE, Van Damme J (2001). Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol.* 10:571-9.

Pala L, Giannini S, Rosi E, Cresci B, Scano G, Mohan S, et al. (2001). Direct measurement of IGF-I and IGFBP-3 in bronchoalveolar lavage fluid from idiopathic pulmonary fibrosis. *J Endocrinol. Invest.*, 24, 856-864.

Pardo A, Barrios R, Gaxiola M, Segura-Valdez L, Carrillo G, Estrada A, et al. (2000). Increase of lung neutrophils and upregulation of neutrophil gelatinase B and collagenase in hypersensitivity pneumonitis. *Am. J Respir. Crit. Care Med.*, 161, 1698-1704.

Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becerril C, Yousem S, Herrera I, Ruiz V, Selman M, Kaminski N (2005). Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med.* 9:e251.

Pardo A, Ruiz V, Arreola JL, Ramírez R, Cisneros-Lira J, Gaxiola M, et al. (2003). Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in gamma glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Am. J Respir. Crit. Care Med.*, 167, 925-932.

Pardo A, Selman M (2002). Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front. Biosci.*, 7, d1743-1761.

Pardo A, Selman M (2006). Matrix metalloproteases in the aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 3, 383-388.

- Patterson BC, Sang QA (1997).** Angiotensin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem.* 272(46):28823-5.
- Pérez-Ramos J, Segura L, Ramírez R, Vanda B, Selman M, Pardo A. (1999).** Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in early and late lesions of experimental lung silicosis. *Am. J Respir. Crit. Care Med.*, 160, 1274- 1282.
- Pérez-Tamayo R (1974).** Morphostasis: regulation of structure. *Bol Estud Med Biol.; Suppl* 1:145-61.
- Pilewski JM, Liu L, Henry AC, Knauer AV, Feghali-Bostwick CA. (2005).** Insulin-like growth factor binding proteins 3 and 5 are overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis contribute to extracellular matrix deposition. *Am. J Pathol.*, 166, 399-407.
- Raghu G, Mageto YN, Lockhart D, Schmidt RA, Wood DE, Godwin JD (1999).** The accuracy of the clinical diagnosis of new-onset idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung disease: A prospective study. *Chest.* 116:1168-74.
- Ruiz V, Ordonez RM, Berumen J, Ramirez R, Uhal B, Becerril C, et al. (2003).** Unbalanced collagenase/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis. *Am. J Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 285, L1026-1036.
- Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F, Sedlacek R. (2003).** Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3. *Mol. Biol. Cell*, 14, 4569-4580.
- Schonbeck U, Mach F, Libby, (1998).** Generation of biologically active IL-1 β by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 β processing. *J Immunol* 161:3340-3346.
- 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(2):136-51.
- Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, et al. (2006).** Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am. J Respir. Crit. Care Med.*, 173, 188-198.
- Selman M, Pardo A (2002).** Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res.*3:3.
- Selman M, Pardo A (2003).** The epithelial/fibroblastic pathway in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 29: S93-7.
- Selman M, Pardo A (2006).** Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc.* 3(4):364-72.
- Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramírez R, Barrios R, et al. (2000).** TIMP -1, -2, -3 and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing non degradative lung microenvironment? *Am. J Physiol.*, 279, L562-L574.

- Sheu BC**, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH (2001). A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res.* 61(1):237-42
- Singh B**, Charkowicz D, Mascarenhas D. (2004). Insulin-like growth factor-independent effects mediated by a C-terminal metal-binding domain of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Biol. Chem.*, 279, 477-487.
- Somerville RP**, Oblander SA, Apte SS (2003). Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol.* 4(6):216.
- Suga M**, Iyonaga K, Okamoto T, Gushima Y, Miyakawa H, Akaike T, et al. (2000). Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am. J Respir. Crit. Care Med.*, 162, 1949-1956.
- Swiderski RE**, Dencoff JE, Floerchinger CS, Shapiro SD, Hunninghake GW. (1998). Differential expression of extracellular matrix remodeling genes in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J Pathol.*, 152, 821-828.
- Takino T**, Koshikawa N, Miyamori H, Tanaka M, Sasaki T, Okada Y, Seiki M, Sato H (2003). Cleavage of metastasis suppressor gene product KiSS-1 protein/metastin by matrix metalloproteinases. *Oncogene.* 22: 4617-26
- Tian L**, Stefanidakis M, Ning L, Van Lint P, Nyman-Huttunen H, Libert C, Itohara S, Mishina M, Rauvala H, Gahmberg CG (2007). Activation of NMDA receptors promotes dendritic spine development through MMP-mediated ICAM-5 cleavage. *J Cell Biol.* 178(4):687-700
- Toth M**, Chvyrkova I, Bernardo MM, Hernandez-Barrantes S, Fridman R (2003). Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 308(2):386-95
- Van den Steen PE**, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G (2002). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 6:375-536.
- Van den Steen PE**, Husson SJ, Proost P, Van Damme J, Opdenakker G (2003). Carboxyterminal cleavage of the chemokines MIG and IP-10 by gelatinase B and neutrophil collagenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 310(3):889-96
- Van den Steen PE**, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G (2000). Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood.* 96(8):2673-81
- Van Den Steen PE**, Wuyts A, Husson SJ, Proost P, Van Damme J, Opdenakker G. (2003). Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *Eur. J Biochem.*, 270, 3739-3749.
- Visse R**, Nagase H (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 92(8):827-39.

Willis BC, duBois RM, Borok Z (2006). Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc.* 4:377-82.

Woessner JF. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 93, 440-447.

Yaguchi T, Fukuda Y, Ishizaki M, Yamanaka N. (1998). Immunohistochemical and gelatine zymography studies for matrix metalloproteinases in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Pathol. Int.*, 48, 954-963.

Yasuoka H, Zhou Z, Pilewski JM, Oury TD, Choi AM, Feghali-Bostwick CA. (2006). Insulin-like growth factor-binding protein-5 induces pulmonary fibrosis and triggers mononuclear cellular infiltration. *Am J Pathol.*, 169, 1633-1642.

Yu Q, Stamenkovic I (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14(2):163-76.

Yu X, Collin-Osdoby P, Osdoby P (2003). SDF-1 increases recruitment of osteoclast precursors by upregulation of matrix metalloproteinase-9 activity. *Connect Tissue Res.* 1:79-84.

Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, et al. (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.