



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**POSIBLE PARTICIPACION DE LOS FIBROCITOS EN LA
EXPANSIÓN TISULAR DE FIBROBLASTOS EN
FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C. Carolina García de Alba Rivas

TUTOR

DR. MOISES SELMAN L.

COMITÉ TUTORAL:

DRA. ANNIE PARDO SEMO

DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ

MEXICO, D. F.

OCTUBRE DE 2010



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.

Éste trabajo fue realizado en parte con financiamiento

de CONACYT. Apoyo: 80473

Así como la beca otorgada a la alumna

Por parte de CONACYT.

Becaria # 177021

Índice

Contenido	Página
Resumen en español.	1
Resumen en inglés (Abstract).	5
Introducción	8
Fibrosis pulmonar idiopática.	10
Patogénesis.	10
Formación de focos de fibroblastos.	13
El origen de los fibroblastos en fibrosis pulmonar idiopática.	14
Fibroцитos circulantes.	15
Metaloproteasas de matriz.	19
Justificación.	23
Objetivos Generales	24
Objetivos específicos.	24
Material y Métodos	25
1. Determinación de fibroцитos en pulmones con fibrosis pulmonar idiopática y evaluación del eje CXCR4/CXCL12.	25
Población de estudio.	25
Cuantificación de los focos de fibroblastos.	25
Determinación de la fuente celular de CXCL12 por inmunohistoquímica.	26
Búsqueda de fibroцитos en pulmones con FPI y controles por inmunohistoquímica de fluorescencia y microscopía confocal	26
Lavado bronquioalveolar	28
Cuantificación de CXCL12 por ELISA	28
2. Determinación de la expresión de metaloproteasas de matriz por fibroцитos en cultivo.	28
Separación y caracterización de fibroцитos por inmunofenotipo.	28
Líneas celulares.	30
Análisis de síntesis de colágena.	30

RT-PCR y PCR en tiempo real.	31
Detección múltiple de MMPs.	31
Análisis por zimografía de la actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9.	32
Western Blot para la detección de MMP-8.	33
Inmunocitoquímica de fluorescencia y microscopía confocal.	34
Ensayo de Migración.	35
Análisis estadístico.	36
Resultados	38
Determinación de fibrocitos en pulmones con fibrosis pulmonar idiopática y evaluación del eje CXCR4/CXCL12.	38
Determinación de los niveles de CXCL12 en plasma y LBA.	44
Análisis inmunohistoquímico de la quimiocina CXCL12 en pulmones con FPI y controles.	46
Determinación de la expresión de metaloproteasas de matriz por fibrocitos en cultivo.	49
Separación y caracterización de fibrocitos circulantes por Inmunofenotipo.	49
Síntesis y secreción de colágena.	51
Los fibrocitos expresan diversas metaloproteinasas de matriz.	52
Análisis de proteínas por Western Blot.	55
Zimograma de gelatina	54
Expresión de MMPs en fibrocitos estimulados con TGF- β 1.	56
Inmunocitoquímica y microscopía confocal.	58
Ensayo de migración.	61
Discusión.	64
Conclusiones.	73
Referencias.	75

Palabras Clave: Fibrocitos circulantes, fibrosis pulmonar, metaloproteasas de matriz, fibroblastos, matriz extracelular, inmunocitoquímica, microscopía confocal, western blot, migración.

RESUMEN

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica, progresiva y letal en un plazo relativamente breve de tiempo. La secuencia de los mecanismos patogénicos es aún desconocida, pero recientemente se ha postulado que la lesión primaria ocurre en el epitelio alveolar, con la consecuente activación de las células epiteliales, formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos y excesiva acumulación de matriz extracelular con destrucción del parénquima pulmonar. En este contexto, se ha considerado que el exceso de focos de fibroblastos, que son los responsables de la producción de las moléculas de matriz, es un fuerte factor de mal pronóstico para este padecimiento. Sin embargo, el origen de los fibroblastos se desconoce.

Los fibrocitos son una población recientemente descrita de células progenitoras circulantes de origen hematopoyético implicadas en procesos de reparación y fibrosis tisular en diversos órganos. Muestran un fenotipo único caracterizado por la expresión de moléculas de matriz (colágeno tipo I, prolil 4-hidroxilasa), de leucocitos (CD45+), de monocitos (CD14+) y de células troncales hematopoyéticas (CD34+). Se ha descrito que los fibrocitos tienen capacidad de diferenciarse a fibroblastos y miofibroblastos así como a otras células mesenquimatosas. Sin embargo, su contribución a la expansión de la población de fibroblastos/miofibroblastos en la fibrosis pulmonar humana, incluyendo la FPI, así como los mecanismos involucrados en su trans migración a través de la membrana basal y la matriz extracelular pulmonar y su posible papel en la patogénesis de la FPI se desconocen. Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son una familia de endopeptidasas zinc dependientes que desempeñan un papel importante en múltiples procesos fisiológicos y patológicos incluyendo la FPI. En este contexto, nuestra hipótesis fue que los fibrocitos viajan a los pulmones de pacientes con FPI contribuyendo a la expansión de la población de fibroblastos y que expresan metaloproteasas de matriz que podrían facilitar su capacidad de movilización y migración a través de los tejidos y a su vez participar en los mecanismos de daño en esta enfermedad.

Objetivos: Determinar si existen fibrocitos en el tejido pulmonar de pacientes con FPI y pulmones control. Evaluar los niveles de CXCL12 (quimiocina que participa en la migración de fibrocitos) en lavado bronquioalveolar (LBA) y plasma de pacientes con FPI y controles. Examinar la expresión y localización pulmonar de CXCL12. Evaluar la expresión de metaloproteasas de matriz por fibrocitos humanos.

Material y Métodos: La presencia de fibrocitos en pulmones se evaluó por microscopía confocal utilizando varias combinaciones de anticuerpos específicos. Los niveles de CXCL12 en plasma y en sobrenadante de LBA se determinaron por ELISA y su fuente celular en pulmones por inmunohistoquímica. Posteriormente, se obtuvieron fibrocitos humanos a partir de leucocitos provenientes de donadores sanos separando la población de monocitos CD14+ por selección negativa. Estos monocitos se cultivaron durante 8 días obteniendo a este tiempo fibrocitos con una pureza $\geq 95\%$, la cual se comprobó por citometría de flujo con marcadores específicos. De estas células se obtuvieron los sobrenadantes, RNA y lisados celulares. Se evaluó la expresión de MMP-1, -2, -7, -8 y -9 por PCR en tiempo real y la síntesis de las proteínas se examinó con Luminex xMAP, Western blot (WB), inmunocitoquímica y microscopía confocal. La actividad enzimática de la MMP-2 y -9 se evaluó por zimografía. Los ensayos de migración se hicieron en cámaras de Boyden recubiertas con colágena I o membrana basal con o sin un inhibidor específico para MMP-8 y para MMP-2/-9; como mediadores quimiotáticos se utilizaron el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-B) y la quimiocina CXCL12. En algunos experimentos los fibrocitos fueron estimulados con TGF- β 1.

Resultados: Se identificaron fibrocitos en 8 de 9 pulmones examinados de pacientes con FPI, y en ninguno de los 4 pulmones normales. La combinación que tiñó a mayor número de fibrocitos fue CXCR4/procolágena-I (10.3 ± 2.9 fibrocitos/mm²; $p < 0.05$ comparado con otras combinaciones) mientras que para las otras cuatro combinaciones encontramos valores de 4.1 ± 3.1 (CXCR4/prolil 4-hidroxilasa), 2.8 ± 3.0 (CD34/procolágena-I), 2.2 ± 1.6 (CD34/ α AML), y 1.3 ± 1.6 (CD45RO/prolil 4-hidroxilasa) fibrocitos/mm². Se encontró una correlación positiva

entre la cantidad de focos de fibroblastos y el número de fibrocitos en pulmón ($r=0.79$; $p<0.02$). CXCL12, el ligando específico del receptor CXCR4 se encontró fuertemente expresado por células epiteliales alveolares reactivas en pacientes con FPI y ausente en tejido pulmonar sano. La concentración de CXCL12 fue significativamente mayor en pacientes con FPI ($n=42$) comparado con controles sanos ($n=23$) [mediana: 2707.54 pg/ml (648.1-4884.69) versus 1751.5 pg/ml (192.9-2686.02); $p<0.003$]. De igual manera, esta quimiocina fue detectable en sobrenadante de LBA de 40% (8/20) de los pacientes con FPI y en ninguno (0/5) de los controles normales. Se encontró una correlación negativa entre las concentraciones plasmáticas de CXCL12 con la capacidad pulmonar de difusión de monóxido de carbono (DLCO) ($r=-0.56$; $p<0.03$) y la saturación de oxígeno durante el ejercicio ($r=-0.41$; $p<0.04$). En los estudios in vitro, se encontró que los fibrocitos expresan grandes cantidades de MMP-2, MMP-7, MMP-8 y MMP-9. En los zimogramas de gelatina se revelaron las formas latentes y activas de la MMP-2 y MMP-9 y por WB la presencia de MMP-8. La estimulación de fibrocitos con TGF- β 1 indujo la sobre-expresión de los genes MMP-2 y MMP-9 ($p=0.001$ y 0.008 respectivamente), la que fue corroborada por zimografía. Por inmunocitoquímica comprobamos que los fibrocitos expresan simultáneamente colágena tipo I y MMP-8 o MMP-7. Finalmente, el estudio del efecto de las MMPs sobre la migración de fibrocitos mostró que el inhibidor específico de MMP-8 provocó una reducción significativa en su migración a través de colágena I: 60.9% con CXCL12 y 65.5% con PDGF-B ($p<0.01$ en ambas) mientras que la inhibición específica de MMP-2/MMP-9 produjo una reducción en la migración a través de membranas basales del 42% con CXCL12 y de un 49% con PDGF-B ($p<0.01$ en ambos).

Conclusiones: Nuestros hallazgos revelan por primera vez que los fibrocitos circulantes, probablemente reclutados a través de leje CXCR4/CXCL12, contribuyen a la expansión de la población de fibroblastos/miofibroblastos en los pulmones de pacientes con FPI, y que los fibrocitos expresan diversas MMPs las cuales podrían desempeñar un papel importante en la migración tisular y transendotelial de los fibrocitos, así como en la remodelación de la matriz

extracelular. El incremento de MMP-2 y MMP-9 inducida por TGF- β 1 sugiere que *in vivo* los fibrocitos expresan activamente estas enzimas cuando se encuentran en presencia de un microambiente fibrótico.

ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive and lethal disease in a relatively short period of time. The sequence of the pathogenic mechanisms is unknown but it has been recently postulated that the initial injury occurs in the alveolar epithelium with the consequent activation of the epithelial cells which is followed by the formation of fibroblastic/myofibroblastic foci and finally the exaggerated accumulation of extracellular matrix with the irreversible destruction of the lung parenchyma. In this context, it has been considered that the expansion of the fibroblast population which is responsible for the synthesis of matrix molecules is a strong factor of poor prognosis for the disease. However, the origin of fibroblasts is unknown.

Fibrocytes are a recently described population of hematopoietic-derived circulating progenitors of fibroblasts that have been implicated in processes of tissue repair and fibrosis in several organs. They display a unique phenotype characterized by the expression of matrix molecules (collagen type I, prolyl 4-hydroxylase), leukocyte (CD45+), monocyte (CD14+) and hematopoietic stem cell (CD34+) markers. Fibrocytes can differentiate to fibroblasts and myofibroblasts as well as other mesenchymal cells. However, their contribution to the expansion of the fibroblasts/myofibroblasts population in human pulmonary fibrosis, including IPF, as well as the molecular mechanisms involved in their transmigration through the basement membrane and pulmonary extracellular matrix, and their possible role in the pathogenesis of IPF are still unknown. Matrix metalloproteases (MMPs) are a family of zinc dependent endopeptidases that play an important role in multiple physiologic and pathologic processes including IPF. In this context, our hypothesis was that fibrocytes migrate to the lungs of patients with IPF contributing to the expansion of the fibroblasts population and that they express matrix metalloproteases that could facilitate their capacity of mobilization and migration through tissues and at the same time participate in the mechanisms of lesion of this disease.

Aims: 1) To determine if fibrocytes are present in IPF and control lungs. 2) To evaluate the CXCL12 levels (chemokine that participates in migration of fibrocytes) in bronchoalveolar lavage (BAL) and plasma of IPF patients and controls. 3) To examine the expression and pulmonary localization of CXCL12. 4) To evaluate the expression of matrix metalloproteases by human fibrocytes.

Material and Methods: The presence of fibrocytes in lungs was evaluated by confocal microscopy using several specific antibody combinations. CXCL12 levels in plasma and BAL fluids were determined by ELISA and their cellular source in the lung was analyzed by immunohistochemistry. Subsequently, fibrocytes were purified from leukopheresis packs obtained from healthy donors by negative selection of CD14⁺ monocytes which were then cultured for eight days; purity of fibrocytes in the cultures was $\geq 95\%$ determined by flow cytometry using specific markers. Conditioned media, cell lysates and total RNA were collected and the expression of MMP-1, -2, -7, -8 and -9 was evaluated by real time PCR. Protein synthesis was examined using a Multiplex assay, Western blot, fluorescent immunocytochemistry and confocal microscopy. MMP-2 and -9 enzymatic activities were evaluated by gelatin zymography. Migration was assessed using collagen I coated Boyden chambers. The chemokine stromal cell derived factor-1 (CXCL12) and platelet derived growth factor (PDGF-B) were used as chemoattractant with or without a specific MMP-8 and MMP-2/-9 inhibitors.

Results: Fibrocytes were identified in 8 out of 9 fibrotic lungs while no fibrocytes were found in normal lungs (4). The combination that stained significantly more fibrocytes was CXCR4/procollagen-I (10.3 ± 2.9 fibrocytes/mm²; $p < 0.05$ compared with other combinations) while the other four combinations showed values of 4.1 ± 3.1 (CXCR4/prolyl-4-hydroxylase), 2.8 ± 3.0 (CD34/procollagen-I), 2.2 ± 1.6 (CD34/ α SMA) and 1.3 ± 1.6 (CD45RO/prolyl-4-hydroxylase) fibrocytes/mm². There was a positive correlation between the abundance of fibroblastic foci and the amount of lung fibrocytes ($r = 0.79$; $p < 0.02$). CXCL12, the specific ligand for the receptor CXCR4 was found strongly expressed by reactive alveolar epithelial cells in patients with IPF and was absent in healthy lung tissue. CXCL12 concentration

was significantly increased in plasma of patients with IPF (n=42) compared to healthy controls (n=23) [median: 2707.5 pg/ml (648.1–4884.7) versus 1751.5 pg/ml (192.9–2686.0); p < 0.003]. Likewise, this chemokine was detectable in bronchoalveolar lavage fluid of 40% (8/20) of the patients with IPF but in any normal control (0/5). A negative correlation between plasma levels of CXCL12 with lung diffusing capacity for carbon monoxide (DLCO) ($r = -0.56$; p < 0.03) and oxygen saturation on exercise was found ($r = -0.41$; p < 0.04). In the *in vitro* studies we found that fibrocytes express significant amounts of MMP-2, MMP-7, MMP-8 and MMP-9. Gelatin zymography revealed the active and latent form of MMP-2 and MMP-9 and the WB analysis showed the presence of MMP-8. Stimulation of fibrocytes with TGF- β 1 induced overexpression of MMP-2 and MMP-7 at gene level (p=0.001 and 0.008 respectively) which was corroborated by gelatin zymography. Immunocytochemistry showed that fibrocytes simultaneously express collagen I and MMP-8 or MMP-7. Finally, the study of the effect of MMPs on fibrocytes migration showed that the specific inhibitor for MMP-8 induced a significant reduction of cell migration through collagen I: 60.9% with CXCL12 and 65.5% with PDGF-B (p<0.01 for both of them) while the specific inhibition of MMP-2/MMP-9 induced a reduction of fibrocyte migration of 42% with CXCL12 and 49% with PDGF-B through basal membranes (p<0.01 for both of them).

Conclusion: Our findings reveal for the first time that circulating fibrocytes, probably recruited through the CXCR4/CXCL12 axis, contribute to the expansion of the fibroblast/myofibroblast population in lungs of patients with IPF and that fibrocytes express several MMPs which could in turn play an important role in the fibrocytes tissue and transendothelial migration as well as in the extracellular matrix remodeling. The increase of MMP-2 and MMP-9 induced by TGF- β 1 suggests that *in vivo* fibrocytes actively express these enzymes when they are in a fibrotic microenvironment.

Introducción

La fibrosis pulmonar es el resultado común de un diverso grupo de enfermedades que afectan al parénquima pulmonar conocidas como neumopatías intersticiales difusas (NID). Aunque estos padecimientos son diferentes en muchos aspectos incluyendo la etiología, son agrupadas bajo esta categoría porque comparten características clínicas, radiográficas y fisiológicas, y afectan difusamente al parénquima pulmonar (1, 2).

En condiciones normales el parénquima pulmonar está constituido por los alveolos, los capilares y el espacio intersticial (Figura 1). Las paredes alveolares están formadas por dos clases de células epiteliales (o neumocitos): tipo 1 y tipo 2. Los neumocitos tipo 1 cubren más del 90% del área de la superficie alveolar, son células atenuadas que forman una interfase con las células endoteliales capilares y proveen de una superficie de grosor mínimo que facilita el intercambio gaseoso. Los neumocitos tipo 2 son células grandes de aspecto redondeado, se encuentran en la superficie alveolar en zonas donde las paredes alveolares se unen; estas células descansan sobre la membrana basal en cercanía con las células mesenquimatosas presentes en el intersticio; son células multifuncionales que sintetizan y secretan el surfactante y son las progenitoras de los neumocitos tipo 1 (1, 3, 4).

Los capilares pulmonares están constituidos por células endoteliales cuyo alineamiento es continuo y no fenestrado. El núcleo y otros organelos de estas células se agrupan de tal manera que permiten que el resto de la célula sea extremadamente delgada incrementando con esto la eficiencia del intercambio gaseoso (3).

El intersticio representa el espacio entre las paredes alveolares donde no se realiza intercambio gaseoso. Está constituido por proteínas de matriz extracelular tales como colágenas fibrilares (principalmente tipo I y II), proteoglicanos, y glicoproteínas como fibronectina entre otras. Asimismo, en este espacio intersticial se encuentran fibroblastos, que son las células responsables de la secreción de los componentes de la matriz intersticial y macrófagos, células de defensa que patrullan el intersticio y los espacios alveolares (1, 4). **Figura 1.**

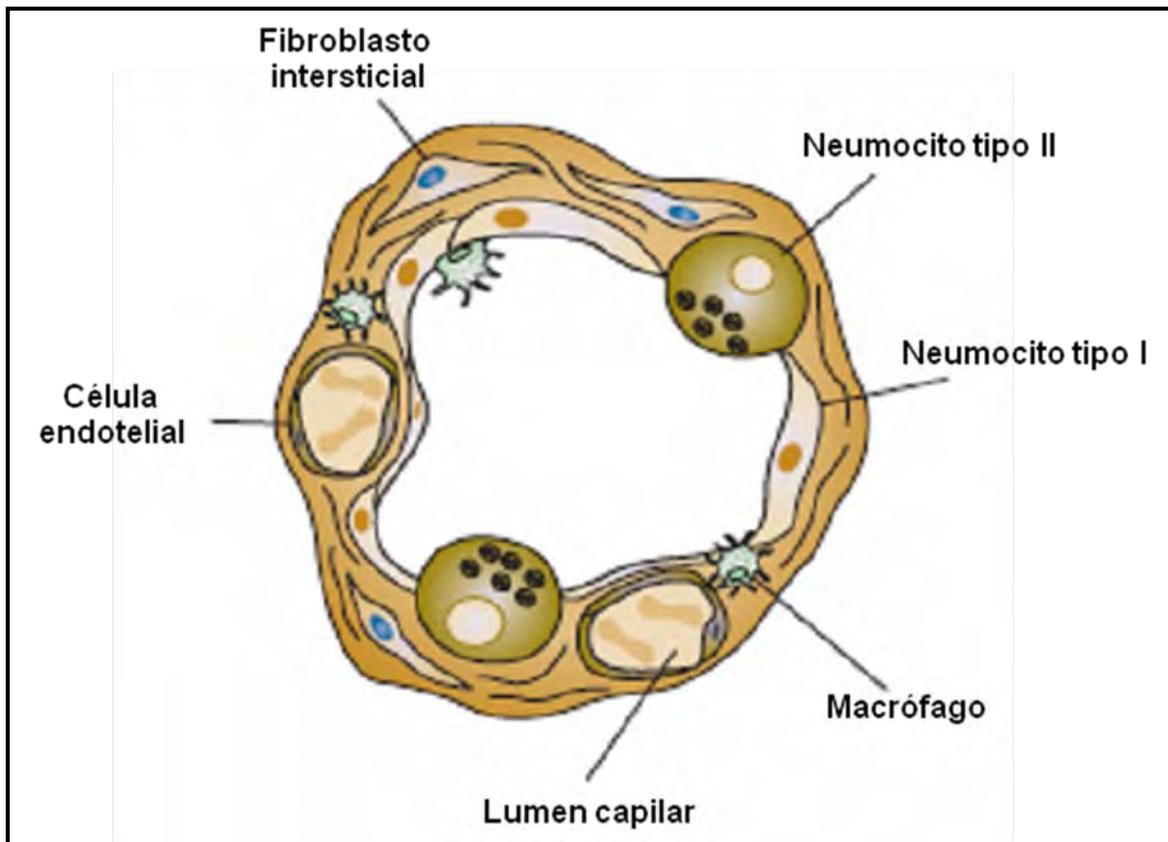


Figura 1. Esquema del parénquima pulmonar*

Descripción esquemática del parénquima pulmonar donde se muestran las principales células que forman parte y delimitan el espacio intersticial.

**Modificada de Selman M, Morrison LD, Noble PW, King T. Idiopathic Interstitial Pneumonias. In: Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine, 5th edition, chapter 57, pp. 1356-1397, 2010.*

Fibrosis pulmonar idiopática

Una de las NID más comunes y con mucho la más agresiva, es la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), una enfermedad progresiva irreversible y letal que generalmente se presenta entre los 50 y 70 años de edad con una proporción de 2:1 entre hombres y mujeres (6, 7). Se estima que su incidencia es de 7-10 casos por 100,000 por año, la cual aumenta notablemente con el envejecimiento (2, 3, 5); Es importante enfatizar que mientras la mayoría de los pacientes con NID presentan un comportamiento clínico heterogéneo, es decir que pueden curar, mejorar o progresar a fibrosis, la FPI siempre progresa a la destrucción del parénquima pulmonar y finalmente a la muerte (8).

Patogénesis

La etiología de la FPI se desconoce; durante mucho tiempo se consideró que la respuesta fibrosante se presentaba como consecuencia de una inflamación crónica que no se resolvía apropiadamente. Sin embargo, datos recientes sugieren que la inflamación no es un evento patogénico importante en esta enfermedad (2, 8). Así por ejemplo, estudios morfológicos revelaron que la alveolitis es leve o moderada tanto en etapas tempranas como avanzadas de la enfermedad mientras que estudios clínicos mostraron claramente la falta de respuesta al tratamiento a largo plazo con anti-inflamatorios potentes (8).

Por otro lado, diferentes estudios morfológicos han revelado que los pulmones con FPI muestran cambios notables en el epitelio alveolar, que incluyen la presencia de células cuboidales recubriendo los alvéolos (hiperplasia de neumocitos tipo 2), así como células epiteliales reactivas, alargadas y grandes que probablemente representan células transicionales entre neumocitos tipo 2 y 1 o células epiteliales en transición a células mesenquimales. También se observan áreas microscópicas con ausencia de células epiteliales y epitelio bronquiolar de limitando lesiones fibroproliferativas con poca o nula inflamación. En términos generales, parece ser que en la FPI, la capacidad de las células epiteliales tipo 2 de reestaurar a las células tipo 1 dañadas está seriamente afectada (9, 10). Aunado a lo anterior, las células epiteliales alveolares parecen ser las responsables de la expresión y secreción de la mayoría, si no de todas, las citocinas pro-fibrosantes y factores de crecimiento (Factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1 entre otros) que inducen la migración y proliferación de fibroblastos así como su diferenciación a miofibroblastos (10, 11).

En este contexto, en 2001 surgió una nueva hipótesis propuesta por los doctores Selman, King y Pardo (8), quienes postularon que la FPI posiblemente resulta de una activación aberrante de las células epiteliales alveolares, lo cual induce la migración y proliferación de fibroblastos y la diferenciación a miofibroblastos, los que a su vez, provocan la acumulación excesiva y remodelación de la matriz extracelular y ruptura de las membranas basales, lo cual tiene como resultado la destrucción de la arquitectura del parénquima pulmonar (8). **Figura 2.**

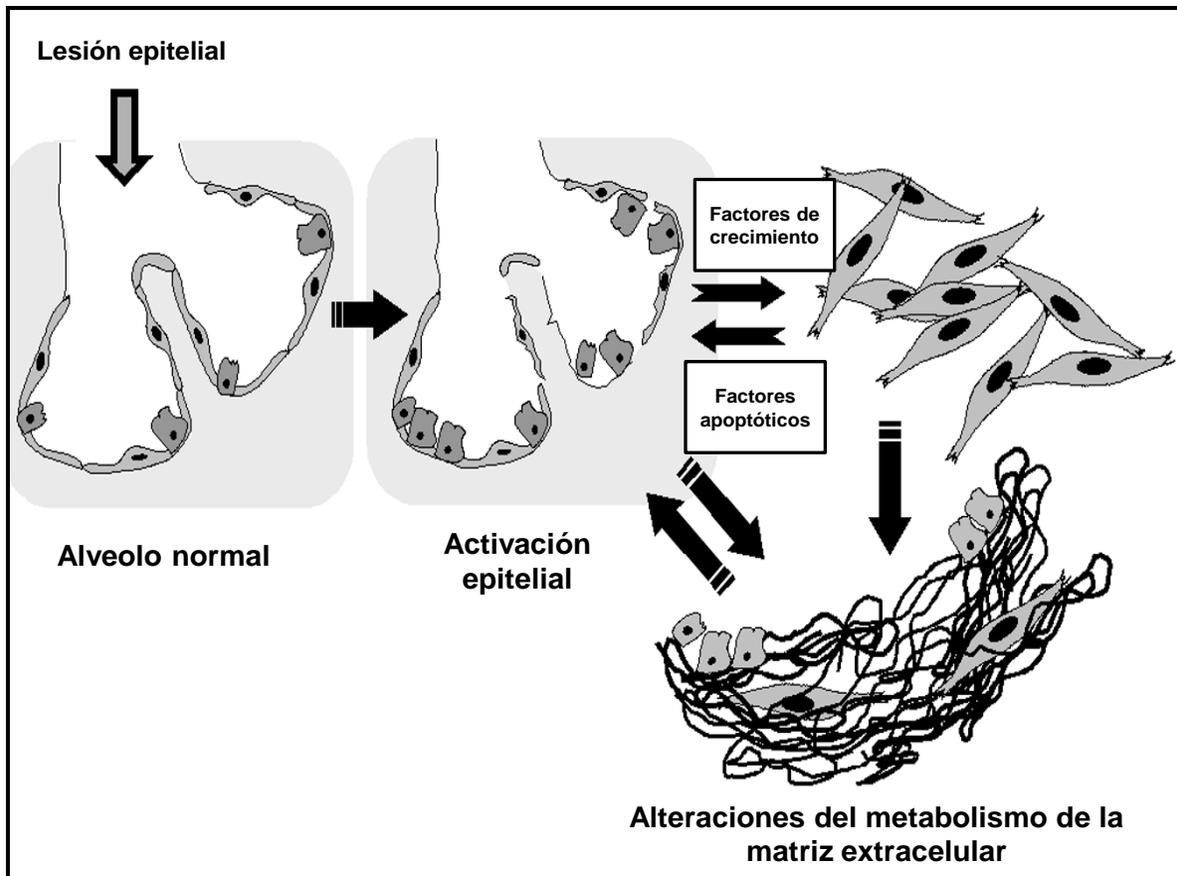


Figura 2. Mecanismos generales de la FPI.

El proceso fibrótico se inicia con la activación a normal de las células epiteliales alveolares después de una lesión, la cual es seguida por la formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos que conducen a una exagerada acumulación de matriz extracelular con la irreversible destrucción del parénquima pulmonar.

Formación de focos de fibroblastos

La alteración que sigue a la activación epitelial y probablemente el único cambio morfológico asociado con la progresión de la fibrosis en FPI es la formación de focos de fibroblastos. Un foco de fibroblastos se caracteriza por ser un grupo

distintivo de fibroblastos / miofibroblastos subepiteliales que corren paralelos a la pared alveolar y que carece de inflamación asociada. **Figura 3.**

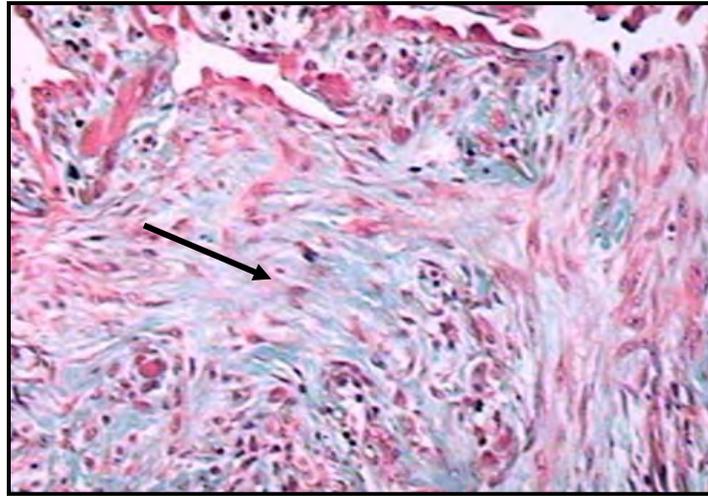


Figura 3. Foco de fibroblastos

Los focos de fibroblastos son característicos de la fibrosis pulmonar idiopática. Se caracterizan por ser un grupo distintivo de fibroblastos/mioblastos subepiteliales que corren paralelos a la pared alveolar. La flecha señala un foco de fibroblastos/mioblastos. 40X

Se ha mostrado tanto por microscopía electrónica como por inmunohistoquímica que los focos de fibroblastos representan zonas microscópicas de lesión pulmonar activa en donde las células alveolares que lo delimitan son destruidas y la membrana basal epitelial es denudada, y en donde se produce y acumula la matriz extracelular (12-14).

De manera interesante, y tomando en cuenta diferentes criterios, incluyendo la expresión de colágeno tipo I, el receptor Thy-1, la α -actina de músculo liso (α -AML), caveolina-1 y algunas enzimas como la ciclooxigenasa y la telomerasa los fibroblastos parecen ser células heterogéneas y aparentemente representan

diferentes sub poblaciones (15-20). Otro punto clave es que estas características fenotípicas parecen estar presentes solo en los pulmones enfermos, sugiriendo que al menos algunos de los fibroblastos que forman los focos aparecen de novo a partir de células progenitoras o precursoras (21).

El origen de los fibroblastos en fibrosis pulmonar idiopática

El posible origen de los fibroblastos en FPI ha estado en debate en los últimos años. Durante décadas, prevaleció la idea de que las células mesenquimatosas locales migraban, proliferaban y sintetizaban matriz extracelular en respuesta a una lesión. Sin embargo, hallazgos recientes sugieren la posible existencia de fuentes alternativas de fibroblastos. Así por ejemplo, se ha propuesto que la llamada transición epitelio-mesénquima (TEM) puede desempeñar un papel importante en este proceso (22). En etapas tempranas del desarrollo embrionario en vertebrados, la TEM es un proceso crucial para la formación de las capas germinales y la migración celular (23) y aunque usualmente se mantiene en estado apagado en el adulto, puede transitoriamente encenderse durante los procesos de reparación de heridas y tejidos (23, 24). Sin embargo la activación anormal de los programas de TEM han sido recientemente asociados con fibrosis así como con invasión y metástasis en cáncer (24-32). Estudios en FPI han revelado que existen células en el pulmón fibrótico que coexpresan marcadores tanto epiteliales como de células mesenquimatosas, sugiriendo que las células del epitelio alveolar pueden servir como fuente de fibroblastos y miofibroblastos en la fibrosis pulmonar idiopática (26-30).

Adicionalmente, cuando menos parte de los fibroblastos en FPI pueden también tener un origen extra-pulmonar. Las células troncales derivadas de la médula ósea (hematopoyéticas y estroma de médula ósea) pueden diferenciarse hacia múltiples linajes y evidencia reciente sugiere que pueden participar en procesos de reparación tisular y fibrosis. Así, se ha demostrado que células troncales hematopoyéticas migran de la médula ósea a pulmón, se diferencian a fibroblastos y proliferan durante el desarrollo de fibrosis pulmonar experimental inducida por radiación y bleomicina (33, 34). La capacidad de las células troncales del estroma de la médula ósea de migrar a pulmón también había sido ya reportada (35-37) y muy recientemente se analizó por primera vez las características de estas células en pacientes con FPI encontrando un incremento en la expresión del receptor CXCR4 en las células del estroma de estos pacientes sugiriendo una mayor movilización de estas células en respuesta a, o precediendo una lesión pulmonar. El papel potencial de estas células en la fisiopatología de la FPI aún queda por demostrarse (38).

Fibrociitos circulantes

Otra posible fuente extra-pulmonar de fibroblastos en la FPI son los fibrociitos circulantes, ya que existen datos recientes de que estas células de origen hematopoyético son una fuente de fibroblastos/miofibroblastos que participan en los mecanismos de reparación y fibrosis en diferentes órganos (39-43). Los fibrociitos son una población de células progenitoras que muestran un espectro molecular e inmunofenotípico único caracterizado por la expresión simultánea de marcadores del mesénquima (colágeno tipo I, II y fibronectina), leucocitarios

(CD45), de monocitos (CD14) y de células troncales hematopoyéticas (CD34) (44, 45) así como de diversas citocinas y factores de crecimiento (Interleucina-1 beta (IL-1 β), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), PDGF) (46, 47).

El término fibrocito fue utilizado por primera vez en 1994 para definir a una subpoblación de leucocitos que se acumulaban en sitios de lesión tisular y mostraban propiedades parecidas a los fibroblastos (48). La información más reciente sugiere que los precursores de fibrocitos circulantes pueden estar presentes en pequeñas fracciones del subgrupo de células mononucleares CD14+/CD16- (49-51). La hipótesis de que los fibrocitos, al igual que algunas subpoblaciones de células dendríticas, derivan de precursores del linaje de los monocitos se apoya en que estas células expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y clase II y las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (48, 51-53). Sin embargo no expresan marcadores específicos de células dendríticas derivadas de monocitos tales como CD1a, CD10 y CD83.

La combinación de la producción de colágena y la expresión de CD45 o uno de los antígenos hematopoyéticos (CD34) o mieloides (CD11b, CD13) es considerada como suficiente criterio para discriminar a los fibrocitos del resto de leucocitos, células dendríticas, células endoteliales y fibroblastos de tejido *in vitro* e *in vivo* (48, 49-51, 54, 55). Los fibrocitos pueden distinguirse de las células troncales mesenquimatosas (circulantes o de tejido) por que estas últimas expresan productos de fibroblastos pero son CD90 positivas y no expresan CD34, CD45 o los marcadores de monocitos (56, 57).

Se ha descrito que los fibrocitos tienen capacidad de diferenciarse a fibroblastos y miofibroblastos así como a otras células mesenquimatosas como adipocitos, osteoblastos y condrocitos (58, 59). Aunque se ha mostrado que los fibrocitos en cultivo pueden diferenciarse espontáneamente a miofibroblastos (43, 54, 60), este proceso se incrementa bajo estímulo con TGF- β generando células que producen fibronectina y colágena y expresan el marcador de miofibroblastos α -AML. Además de esto se ha observado que los fibrocitos responden a citocinas tipo Th (*T-helper*)-2 las cuales facilitan su diferenciación. Así, las interleucinas (IL) profibrosantes IL-4 y la IL-13 promueven la diferenciación de fibrocitos a miofibroblastos a partir de células mononucleares de sangre periférica sin inducir proliferación, mientras que la citocina antifibrosante interferón gamma (IFN γ) inhibe la diferenciación de fibrocitos a miofibroblastos (61). También se ha encontrado que los fibrocitos pueden diferenciarse a adipocitos in vitro e in vivo lo cual parece ser un proceso dependiente de PPAR γ e inhibido por TGF- β (58, 62). La información anterior parece entonces indicar que la diferenciación de los fibrocitos a otras células del mesénquima es influenciada por un complejo perfil de citocinas dentro del microambiente local del tejido lesionado.

Además de lo anterior, se ha observado que los fibrocitos circulantes pueden entrar rápidamente a sitios de lesión tisular y contribuir a la síntesis de matriz extracelular, son potentes células presentadoras de antígeno, capaces de sintetizar una variedad de factores prometogénicos y proangiogénicos y se ha descrito que pueden incluso regular las actividades de los fibroblastos locales en lesiones hipertróficas de piel (52, 53, 63, 64). Así mismo, los fibrocitos parecen ser

fuentes de fibroblastos en varias patologías inflamatorias y fibróticas incluyendo artritis reumatoide, enfermedad renal crónica y fibrosis hepática entre otros (65-67).

En el caso de padecimientos respiratorios, se ha encontrado acumulación de fibrocitos en áreas de fibrosis de la mucosa bronquial en pacientes con asma (43, 68, 69) y también se han demostrado fibrocitos infiltrando tejido pulmonar fibrótico en ratones agredidos con isotiocianato de fluoresceína o bleomicina (60-70).

En un estudio reciente, se encontró que los pacientes con FPI presentan un incremento significativo en la cantidad de fibrocitos circulantes comparado con controles sanos y más recientemente se correlacionó el incremento de fibrocitos circulantes con un mal pronóstico de la enfermedad (71, 72). Como dato importante, la mayoría de ellos expresaba el receptor CXCR4, apoyando la noción de que el eje CXCR4/CXCL12 puede ser importante para la migración de los fibrocitos a los tejidos (60, 70, 71, 73). **Figura 4.**

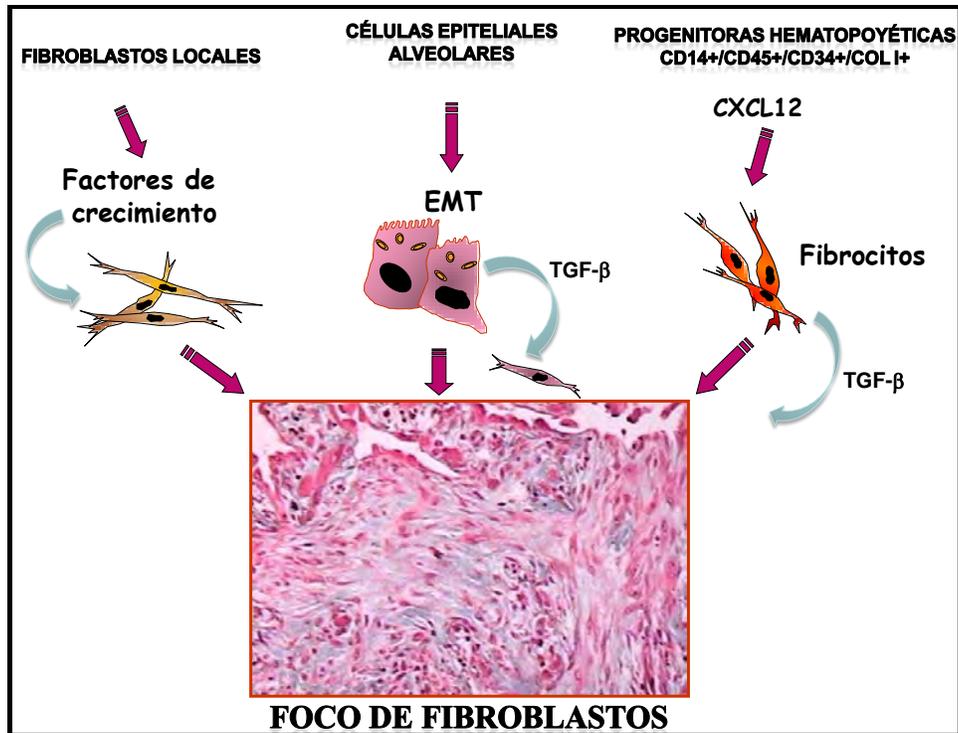


Figura 4. Esquema del posible origen de los fibroblastos en FPI

Se ha propuesto que en la FPI los fibroblastos pueden tener diversos orígenes además de los fibroblastos locales, estos son las células epiteliales o neumocitos tipo I a través de la transición epitelio-mesénquima, células troncales hematopoyéticas y fibrocitos circulantes.

Metaloproteasas de matriz

Las metaloproteasas de matriz (MMPs por sus siglas del inglés *Matrix Metalloproteinases*) son una familia multigénica de endopeptidasas dependientes de zinc que son secretadas o se encuentran ancladas a la membrana celular y desempeñan importantes papeles en múltiples procesos fisiológicos y patológicos.

Los aspectos que hacen que las metaloproteasas de matriz se distingan del resto de las proteasas pueden dividirse en 5 características principales: 1) presencia de un ion zinc en el sitio catalítico; 2) son secretadas de la célula en forma inactiva (zimógeno); 3) tienen una secuencia de aminoácidos conservada; 4) especificidad para degradar cuando menos un componente de matriz extracelular y 5) son inhibidas por los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP) (74)

Dependiendo de sus características estructurales y funcionales las MMPs se han clasificado en 6 subgrupos diferentes de miembros cercanamente relacionados que poseen afinidad de sustratos. Estos subgrupos son: a) colagenasas, b) gelatinasas, c) estromelisininas, d) matrilisininas, e) MMPs asociadas a membrana (MT-MMPs) y f) otras MMPs (74).

En un principio estas enzimas fueron descritas estrictamente como procesadoras de la matriz extracelular (MEC) con un papel predominante en la homeostasis de ésta, sin embargo, ahora es claro que su función va más allá del solo hecho de degradar MEC (75). Numerosas pruebas demuestran que las MMPs procesan, activan y degradan una gran variedad de sustratos pericelulares. Sus blancos incluyen otras proteasas, inhibidores de proteasas, factores de coagulación, quimiocinas, factores de crecimiento latentes, proteínas de unión a factores de crecimiento, receptores de superficie, moléculas de adhesión célula-célula y virtualmente todas las proteínas de matriz extracelular, entre otros (76). De esta manera su actividad enzimática controla un significativo número de funciones celulares tales como proliferación, migración, adhesión y apoptosis (76-79).

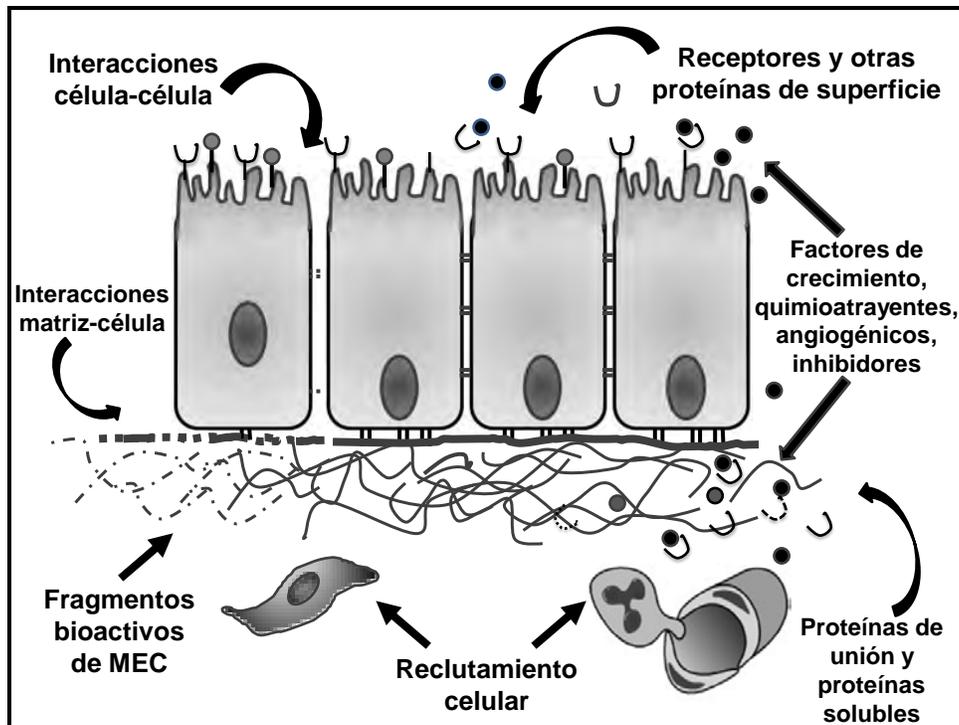


Figura 5. Funciones biológicas de las MMPs

Originalmente se había considerado que la actividad de las metaloproteasas de matriz estaba restringida a la degradación de la matriz extracelular, sin embargo en años recientes ha sido evidente que estas enzimas pueden modificar otros sustratos y afectar muchas funciones celulares como migración, proliferación y apoptosis a través de su acción sobre factores de crecimiento, receptores de superficie e interacciones célula-célula entre otros.

**Modificado de: Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2001. 17:463–516*

La migración celular es un evento crítico durante el desarrollo, la respuesta inmune y diferentes procesos patológicos, incluyendo al cáncer, inflamación crónica y fibrosis (80). El tránsito de los leucocitos circulantes como de las células

presentes en los tejidos es un proceso complejo que no solamente involucra a la presencia y liberación de quimiocinas. Por ejemplo, las células circulantes deben interactuar con el endotelio en un proceso compuesto por diversos pasos, que progresa desde la adhesión a la pared endotelial, activación de integrinas y trans migración endotelial o extravasación. La extravasación requiere que las células migratorias atraviesen cuando menos dos barreras anatómicas, la monocapa de células endoteliales y su membrana basal asociada (80, 81). En este último paso se ha implicado a la MMP-9 como un componente importante en la migración celular e invasión tisular. Finalmente, al degradar una amplia variedad de proteínas, que constituyen a la matriz extracelular y la membrana basal del epitelio alveolar, las MMPs participan en la migración de estas células a través del intersticio y hacia los espacios alveolares por lo que se considera que la capacidad de expresar MMPs debe formar parte del fenotipo migratorio que las células deben adquirir para finalmente alojarse en los tejidos blanco, en este caso en pulmón (82-84).

JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento no existe prueba de que los fibrocitos migren a pulmón en pacientes con FPI u otras enfermedades intersticiales fibrosantes del pulmón. Por esto y en base a los antecedentes señalados, decidimos examinar si los fibrocitos contribuyen a la expansión de fibroblastos/miofibroblastos en pulmones de pacientes con FPI, si la presencia de estas células en pulmón se relaciona con la cantidad de focos de fibroblastos y si el eje CXCR4/CXCL12 es importante para su reclutamiento; además, decidimos explorar los posibles mecanismos involucrados en la migración de los fibrocitos a través de la membrana basal y la matriz extracelular así como el subsiguiente alojamiento en los tejidos, procesos que también permanecen sin esclarecer. En este contexto, hipotetizamos que los fibrocitos expresan metaloproteinasas de matriz que podrían facilitar su capacidad de movilización y migración a través de los tejidos.

OBJETIVOS GENERALES:

1. Determinar la presencia de fibrocitos en los pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.
2. Examinar la expresión de diferentes metaloproteasas de matriz por fibrocitos *in vitro*.

Objetivos específicos:

1. Determinar si en el tejido pulmonar de pacientes con FPI y pulmones control se encuentran células que expresan los receptores típicos de fibrocitos CD34+/CD45+/CXCR4+.
2. Cuantificar los niveles séricos y en lavados bronquioalveolares de CXCL12 en pacientes con FPI e individuos normales.
3. Determinar si en pulmones con FPI se expresa la quimiocina CXCL12 e identificar qué tipo de células la expresan.
4. Determinar por PCR en tiempo real, por análisis múltiple de proteínas y Western blot, si los fibrocitos expresan las metaloproteasas de matriz (MMP)-1, -2, -7, -8, y -9.

MATERIAL Y MÉTODOS

1) Determinación de fibrocitos en pulmones con fibrosis pulmonar idiopática y evaluación del eje CXCR4/CXCL12

Población en estudio

Se incluyeron 42 pacientes con FPI vírgenes a tratamiento (27 hombres y 15 mujeres, 67.1 ± 7.4 años). El diagnóstico de FPI se basó en criterios establecidos por la Asociación Americana del Tórax y fue confirmado por biopsia pulmonar que mostraba hallazgos microscópicos consistentes con neumonía intersticial usual, la marca histopatológica de la FPI (85). Se estudiaron de 5 a 23 voluntarios sanos como controles para los ensayos en plasma y lavado bronquioalveolar. Las muestras control para inmunohistoquímica y microscopía confocal incluyeron piezas de pulmón sin lesiones, de individuos que murieron por causas no respiratorias. El proyecto fue aprobado por el comité de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y se obtuvo el consentimiento informado de pacientes y controles.

Cuantificación de los focos de fibroblastos

Los focos de fibroblastos (FF) fueron cuantificados por un patólogo ajeno al resto del estudio, utilizando tinción de hematoxilina y eosina. Los cortes de pulmón fueron analizados a un aumento de 40x y se contó el número total de FF para cada muestra. Posteriormente se midió el área que ocupaban los especímenes en cada laminilla y los resultados se expresaron como FF/cm^2 .

Determinación de la fuente celular de CXCL12 por inmunohistoquímica

Los cortes de tejido con FPI y controles fueron tratados como se ha descrito previamente en nuestro laboratorio (86-87). Se aplicó el anticuerpo monoclonal anti-CXCL12 humano (10 μ g/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN) y los tejidos se incubaron a 4° C durante toda la noche. Posteriormente se utilizó un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina biotinilado, seguido de peroxidasa de rábano conjugada a estreptavidina (BioGenex, San Ramon, CA). Finalmente, las preparaciones se trataron con el sustrato 3-amino-9-etil-carbazol (BioGenex) en amortiguador de acetato con 0.05% H₂O₂. Las laminillas fueron contra-teñidas con hematoxilina. Para corroborar la especificidad de la reacción, en preparaciones control se reemplazó el anticuerpo primario por suero no inmune.

Búsqueda de fibrocitos en pulmones con FPI y controles por inmunohistoquímica de fluorescencia y microscopía confocal

Las muestras de pulmón fueron bloqueadas con PBS con 0.05% BSA e incubadas con anticuerpos monoclonales anti (humano): CD34, CD45 (BD Biosciences, Pharmingen, Leiden, Holanda), CXCR4 (R&D Systems, Minneapolis MN) prolyl-4-hidroxilasa (Dako, Glostrup, Dinamarca), procolágena tipo I (Chemicon, Europa Ltd, Hampshire, UK) y α -AML conjugado a Cy3 (Sigma Aldrich, Estocolmo, Suecia). Para la detección de procolágena tipo I (procol-I) las laminillas fueron pre-tratadas con tripsina al 1% y para prolyl-4-hidroxilasa (p4-OH) se procesaron con calor para desenmascaramiento de lepitope. Se utilizaron cinco diferentes combinaciones de tinción: CD34/procol-I, CD45/ α AML, CXCR4/procol-I,

CXCR4/p4-OH y CD45/p4-OH. Como anticuerpos secundarios se usaron Alexa Fluor 488, 633 o 647 (Molecular Probes, Eugene, OR) con suero de cabra al 1% (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Los núcleos se tiñeron con conjugado nucleico Hoechst (H33342 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). En todos los experimentos se incluyeron controles con/sin el anticuerpo primario o con/sin el anticuerpo secundario tanto en pulmones normales como en tejidos con FPI para corrección de la fluorescencia de fondo.

Las preparaciones se analizaron en un microscopio confocal láser (Leica confocal-scanning TCS SP2 II Leica, Wetzlar, Alemania) y un microscopio óptico de fluorescencia (Microscopio Olympus BX60, equipado con una cámara digital Olympus DP50). Se hizo escaneo secuencial de los diferentes fluoróforos y posteriormente se sobrepusieron las imágenes. Para cuantificar los fibrocitos pulmonares, se escogieron al azar áreas de 0.141mm^2 considerándose como sitios positivos donde hubiera doble marca.

Para identificar fibrocitos en el lavado bronquioalveolar, las células se incubaron con los anticuerpos anti-CXCR4 y anti-p4-OH con los correspondientes anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 y 633 con suero de cabra al 1% en TBS con 0.25% BSA y 0.25% Triton X-100. Los núcleos se tiñeron con conjugado nucleico Hoechst y se analizaron aproximadamente 500 células de LB A por individuo para identificar fibrocitos.

Lavado bronquioalveolar

El LBA se realizó como hemos descrito previamente (85, 87). Las células (10^6 /ml) se resuspendieron en 10% de DMSO y 90% de suero fetal bovino y se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su uso. Las células del LBA se descongelaron a 37°C, se lavaron dos veces con PBS y se hicieron preparaciones con citocentrífuga para posteriormente examinarse por microscopía confocal. Los sobrenadantes fueron congelados a -70° hasta su uso.

Cuantificación de CXCL12 por ELISA

Se obtuvieron alícuotas de 5 ml de suero en tubos con EDTA las cuales se centrifugaron inmediatamente durante 15 min a 1000 x g. Posteriormente, los plasmas se centrifugaron a 10,000 x g por 10 minutos a 2-8° C y se guardaron a -20° C hasta su utilización. La concentración de CXCL12 en plasma y LBA se determinó por método de ELISA usando un estuche comercial (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis MN). Los resultados se expresan en pg/ml.

2) Determinación de la expresión de metaloproteasas de matriz por fibrocitos en cultivo

Separación y caracterización de fibrocitos por inmunofenotipo

Se utilizó un gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) para la obtención de células mononucleares de suero periférica a partir de concentrados leucocitarios provenientes de donadores sanos. Posteriormente se

hizo una selección de monocitos utilizando un estuche de selección negativa de células CD14⁺ (Stem Cell Technologies, Vancouver, Can). Las células CD14⁺ obtenidas (aproximadamente 75-80% de pureza determinado por citometría de flujo) fueron cultivadas en cajas Falcon de 25-cm² o sobre cubreobjetos en cajas de cultivo de 6 pozos a 37° C y 5% CO₂-95% utilizando medio Eagle modificado por Dulbecco (Dubelcco's modified Eagle médium (DMEM); Invitrogen, Carlsbad, CA) con 20% de suero humano A B (Valley Biomedical, Winchester, Virginia); después de 48 hs las células no adherentes fueron eliminadas y las células adherentes se cultivaron hasta el día 8; en este momento se evaluó la pureza de los cultivos por citometría de flujo, utilizando marcadores específicos de fibrocitos: cabra anti-colágena I humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), CD45-PeCy5 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), CXCR4-FITC (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA) y el secundario de burro anti-cabra conjugado a PE (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA). Para esto, los fibrocitos fueron levantados de las cajas de cultivo utilizando un amortiguador de disociación celular a base de PBS, libre de enzimas (GIBCO); las células fueron fijadas y permeabilizadas con una solución comercial de fijación y permeabilización (BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) y posteriormente se procedió a la tinción con los anticuerpos primarios y secundarios. Se utilizaron controles de isotipo para cada uno de los anticuerpos utilizados. Las muestras fueron analizadas en un citómetro FACS Calibur utilizando el software Cell Quest 3.2.1f1 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). En algunos experimentos, los fibrocitos se estimularon con

10ng/ml de TGF- β 1 por 12 horas para evaluar expresión génica y 72 hs para analizar la expresión de proteínas.

Líneas celulares

Se utilizaron líneas celulares de fibroblastos humanos de pulmón sano (CCD25) y osteoblastos (U2OS) (ATCC, Rockville, Maryland), como controles en algunos experimentos.

Análisis de síntesis de colágena

La biosíntesis de colágena se determinó mediante un ensayo radioactivo en tres muestras independientes (88, 89). Para esto, las células fueron cultivadas con DMEM con 20% de suero humano AB en cajas de 6 pozos. Después de ocho días el medio fue reemplazado con medio fresco libre suero que contenía [3H] prolina 15 mCi/ml (New England Nuclear, Boston, MA), ácido ascórbico 50 mg/ml y β -aminopropionitrilo 50 mg/ml. Al final de 8 hs de incubación se recuperaron los sobrenadantes y se dializaron en agua destilada con inhibidores de proteasas. Las alícuotas obtenidas se incubaron con o sin colagenasa bacteriana (tipo VII, Sigma, St. Louis, MO) y posteriormente se precipitaron con ácido tricloroacético al 10%. Los sobrenadantes se resuspendieron en 10 ml de fluido para conteo de centelleo (Aquasol; New England Nuclear) para evaluar la síntesis de proteínas colagénicas. El porcentaje de síntesis de colágena se calculó con la siguiente fórmula: % de síntesis de colágena = $(\text{dpm colágena} \times 100) / (\text{dpm proteínas no colágenas} \times 5.4) + (\text{dpm colágena})$.

Además de esto, se realizó un ensayo colorimétrico de Sircol en tres experimentos independientes, siguiendo las instrucciones del fabricante (Biocolor, UK). Los resultados se expresaron como microgramos de colágena/ml/24hs.

RT-PCR y PCR en tiempo real

Se extrajo el RNA total de fibrocitos humanos y fibroblastos pulmonares utilizando TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY). Se hizo transcripción reversa de 1 µg de RNA utilizando el kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la amplificación en tiempo real utilizando sondas TaqMan® marcadas con FAM (Applied Biosystems, Wellesley, CA), Hs00899655_m1 para MMP-1, Hs00234422_m1 para MMP-2, Hs01042797 para MMP-7, Hs00233972_m1 para MMP-8, Hs00957555_m1 para MMP-9 y 4352930E para el rRNA 18S, que fue utilizado como control endógeno. Los resultados de tres muestras diferentes por triplicado se expresaron como promedio ± desviación estándar del número de copias del gen blanco normalizado con el rRNA 18S.

Detección múltiple de MMPs

Se realizó cuantificación simultánea de la concentración de diversas MMPs en sobrenadantes de cultivo de fibrocitos y fibroblastos CCD25 utilizando el kit Fluorokine® MultiAnalyte Profiling (F-MAP) (R&D Systems, Minneapolis MN) que contenía anticuerpos anti- MMP-1, -2, -7, -8 y -9. Para el desarrollo de esta técnica se generaron curvas estándar para cada MMP utilizando las concentraciones de referencia contenidas en el manual del kit. Las muestras experimentales

(provenientes de tres ensayos independientes) se analizaron por triplicado y sin diluir. El ensayo se realizó en una caja de 96 pozos con filtro utilizando los componentes contenidos en el kit. Todos los pasos de incubación fueron llevados a cabo a temperatura ambiente y en oscuridad dado que las perlas están acopladas a un fluoróforo. El procedimiento fue el siguiente: primero la caja de 96 pozos se pre-humedeció con 200 μ L de solución de lavado y posteriormente esta solución se eliminó por aspirado utilizando una bomba de vacío. Se colocaron las perlas (25 μ L) y después se lavó dos veces con solución de lavado utilizando la bomba de vacío. Se colocó la muestra o la curva estándar (μ 50 respectivamente) en cada uno de los pozos y se incubaron durante 2 h; posteriormente los pozos se lavaron y se agregó el anticuerpo específico para cada una de las MMPs conjugado a biotina. Después de ser incubados durante 1h se lavaron una vez y se incubaron por 30 min con estreptavidina conjugada a la proteína fluorescente R-ficoeritrina. Después de lavar para eliminar la estreptavidina libre, las muestras se analizaron con la plataforma Luminex 100 en un aparato Bio-Plex Suspension Array System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Análisis por zimografía de la actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9

La actividad de la MMP-2 y la MMP-9 se determinó en los medios condicionados de fibrocitos control y fibrocitos estimulados con TGF- β por medio de un zimograma. Se utilizaron 0.3 μ g de proteína, mezcladas (V/V) con buffer de muestra (agua destilada 3.6 ml, Tris-HCl 0.5M pH 6.8 1 ml, 2.4 ml de SDS al 10%, 0.8 ml de glicerol (10%), 0.2 ml de azul de bromofenol al 0.05% w/v) y se cargaron

en un gel de SDS-PAGE al 8% que contenía gelatina a una concentración de 1mg/ml y bajo condiciones no reductoras. Los geles se sometieron a un flujo de corriente de 150 V durante 1 hora a 4°C. Una vez terminada la electroforesis, los geles se lavaron 1 vez durante 30 minutos con Tritón X-100 al 2.5% y posteriormente se incubaron en una solución de Glicina 0.1M pH8, CaCl₂ 5mM, ZnCl₂ 50mM durante 20 horas a 37°C. Los geles se tiñeron durante 1 hora con Azul Coomassie al 0.1% (Brillant Blue R-250, Sigma) y después se destiñeron 30 minutos con una solución de metanol-ácido acético (50%-30%). Las zonas de actividad enzimática se observaron como bandas claras contra un fondo azul. Los pesos moleculares de las bandas con actividad gelatinolítica se estimaron usando controles positivos para la MMP-2 y MMP-9 (sobrenadantes de cultivo de células CCD25 y U2OS, respectivamente).

Western Blot para la detección de MMP-8

Se obtuvieron sobrenadantes de cultivo de fibrocitos y fibroblastos CCD25 (ATCC, Rockville, Maryland), los cuales fueron tratados con un coctel de inhibidores de proteasas (Sigma) y se guardaron a -70°C hasta el momento de ser utilizados para el inmunoblot. Los lisados celulares se prepararon con amortiguador RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 1% Triton X-100 plus protease inhibitors; Sigma). La concentración de proteínas de los sobrenadantes y los lisados celulares se determinó por el método de Bradford. Las muestras a una concentración de 40 µg de proteína fueron posteriormente fraccionadas en geles SDS-PAGE al 10%. Como control positivo se utilizó la proteína recombinante de MMP-8 humana (10µl; R&D Systems). Posteriormente

las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot (Bio-Rad). Después de bloquear con leche al 5% en buffer PBS-T (NaCl 136.77 mM, Na₂HPO₄ 10.14 mM, KH₂PO₄ 1.74mM, 0.01% Tween 20) durante una hora a 37°C, las membranas fueron incubadas 18 horas a 4°C con el anticuerpo primario de ratón anti-MMP-8 (1:500; R & D Systems, Minneapolis, MN). La proteína inmunorreactiva fue revelada con un sistema de detección de quimioluminiscencia (Amersham Biosciences).

Inmunocitoquímica de fluorescencia y microscopía confocal

Fibroцитos y fibroblastos fueron cultivados sobre cubreobjetos y fijados y permeabilizados con etanol al 100% a -20°C. Posteriormente se bloqueó durante una hora con PBS-Tween 20 0.05% con 10% de suero normal de caballo. Las células fueron incubadas durante una hora con el anticuerpo primario de cabra anti-colágena I humana (col I) o con una IgG normal de cabra (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y al término de la incubación se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 .05% y se incubaron por 1hr con el anticuerpo secundario de conejo anti-cabra acoplado a FITC o con uno de burro anti-cabra acoplado a DyLight 649 (5µg/ml, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, o 1:600 Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA respectivamente). Para las colocalizaciones las células fueron incubadas 1hr con un anticuerpo de ratón anti-MMP-8 o MMP-7 humana (1:100, R & D Systems, Minneapolis, MN) y/o con anticuerpo de rata anti-CD45 humano (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Posteriormente se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa 647 (5µg/ml, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) o de cabra anti-rata

Alexa 546 (5µg/ml, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). Finalmente las preparaciones se montaron en medio con DAPI para tinción nuclear (Ultra Cruz Mounting Medium; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Se hicieron también controles con y sin anticuerpo primario o secundario en todos los experimentos para hacer corrección de la fluorescencia de fondo. Se utilizó un equipo Leica de barrido-confocal (TCS SP5 Leica, Wetzlar Germany) para el análisis de fluorescencia realizando barridos secuenciales para cada fluorocromo.

Ensayo de migración

El ensayo de migración de fibroцитos se realizó como ya se ha descrito previamente (87) utilizando cámaras de Boyden comerciales con poros de 8-µm, cubiertas con colágena I o EMatrix™ (matriz de proteínas de membrana basal) (Millipore, Billerica, MA). Los fibroцитos se levantaron de las cajas utilizando un amortiguador de disociación celular a base de PBS, libre de enzimas (GIBCO), se centrifugaron y se resuspendieron en DMEM. Las suspensiones celulares (2×10^5 cel/300µl) se colocaron en la cámara superior y en la cámara inferior se puso 0.5ml de medio solo o con CXCL12 (125 ng/ml, Millipore) o factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-B) (25 ng/ml, Sigma) recombinantes. En experimentos paralelos, la migración inducida por CXCL12 o PDGF-B se evaluó en presencia de un inhibidor específico de MMP-8 [(3R)-(+)-[2-(4-Methoxybenzenesulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinoline-3-hydroxamate] 32nM o un inhibidor específico de MMP-2/9 II, 90nM, (Calbiochem) (90, 91). En ambos experimentos los inhibidores se agregaron tanto a la cámara superior como a la

inferioridad o que existe cierto grado de difusión entre ambas cámaras y las molaridades del inhibidor podrían variar entre cada pozo.

Para el ensayo de migración sobre colágena I, se utilizaron adicionalmente cámaras de las mismas características cubiertas con BSA como control de migración. Después de incubar por 8hs a 37°C en una incubadora con 5% CO₂ y 95% aire, las células que no migraron se eliminaron y las cámaras de Boyden fueron lavadas. Las células que migraron fueron cuantificadas con un método colorimétrico utilizando un lector de Elisa. Todos los ensayos fueron hechos por triplicado.

Análisis Estadístico

Los resultados se muestran como promedio \pm desviación estándar o como mediana y valor mínimo-máximo. Las diferencias en las concentraciones plasmáticas de CXCL12 entre casos y controles se determinaron utilizando la prueba T de Student. Las diferencias en el número de fibrocitos identificados con las diferentes combinaciones de anticuerpos fueron comparadas con el método de Kruskal-Wallis. Se utilizó correlación de Spearman para evaluar la relación entre el número de fibrocitos y el número de focos de fibroblastos por paciente.

Los datos obtenidos de los experimentos *in vitro* fueron expresados como promedio \pm DE de tres experimentos. Los valores de p se calcularon con t de Student. Se consideró diferencia significativa cuando el valor de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Determinación de fibrocitos en pulmones con fibrosis pulmonar idiopática y evaluación del eje CXCR4/CXCL12

La posible presencia de fibrocitos se examinó en 9 pulmones de pacientes con FPI y 4 controles por medio de microscopía confocal utilizando cinco diferentes combinaciones específicas de anticuerpos que permiten identificar a estas células: CD34/procol-I, CD34/ α AML, CD45RO/p-4-OH, CXCR4/procol-I, y CXCR4/p-4-OH. En 8 de los 9 pulmones de los pacientes con FPI examinados se encontraron fibrocitos en diferentes cantidades según las combinaciones de anticuerpos utilizadas. La combinación que mostró una cantidad significativamente mayor de fibrocitos fue CXCR4/procol-I (10.3 ± 2.9 fibrocitos/mm²; $p < 0.05$ comparado con las otras combinaciones), mientras que para las otras cuatro combinaciones encontramos valores de 4.1 ± 3.1 (CXCR4/p-4-OH), 2.8 ± 3.0 (CD34/procol-I), 2.2 ± 1.6 (CD34/ α AML), y 1.3 ± 1.6 (CD45RO/p-4-OH) fibrocitos/mm². Las **figuras 6-8** muestran imágenes representativas de fibrocitos, identificados utilizando diferentes combinaciones de anticuerpos en 8 de 9 pulmones con FPI. Como se muestra en la **figura 6, panel a** los fibrocitos se localizaron principalmente cerca de los focos de fibroblastos.

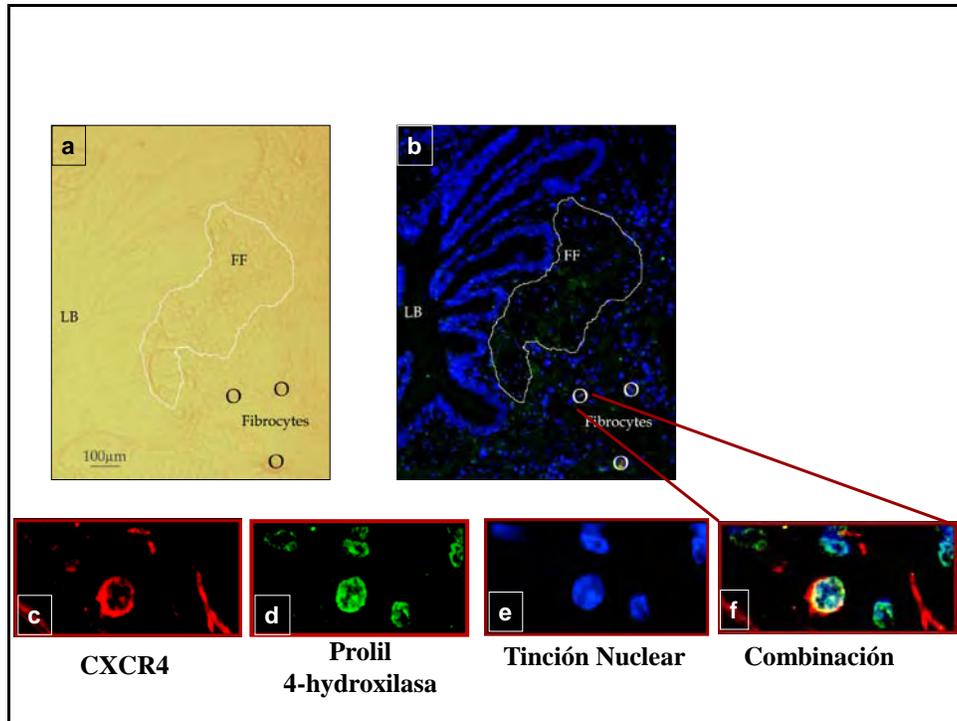


Figura 6: Imágenes de microscopía de fluorescencia representativa de tejido pulmonar con FPI utilizando CXCR4/prolil-4-hidroxisilasa para la identificación de fibrocitos. **Panel a** muestra tres fibrocitos cercanos a un foco de fibroblastos (FF) y también al lumen de un bronquiolo (LB). **En los paneles b, c y d** se muestran las tinciones individuales de los marcadores para CXCR4, prolil-4-hidroxisilasa y tinción nuclear, mientras que el **panel e** se ilustra un fibrocito con la combinación de filtros coexpresando ambos marcadores. Aumento original 20X (a y b) y 40X (c-f).

En las **figuras 7 y 8** se ilustran ejemplos de fibrocitos identificados en pulmones de FPI con otras combinaciones de anticuerpos tales como: CD34/ α AML (**Figura 7A**), CD45RO/prolil 4-hidroxisilasa (**Figura 7B**), y CXCR4 y procolágena-1 (**Figura 8**). No se identificaron fibrocitos en pulmones normales (Figura 9).

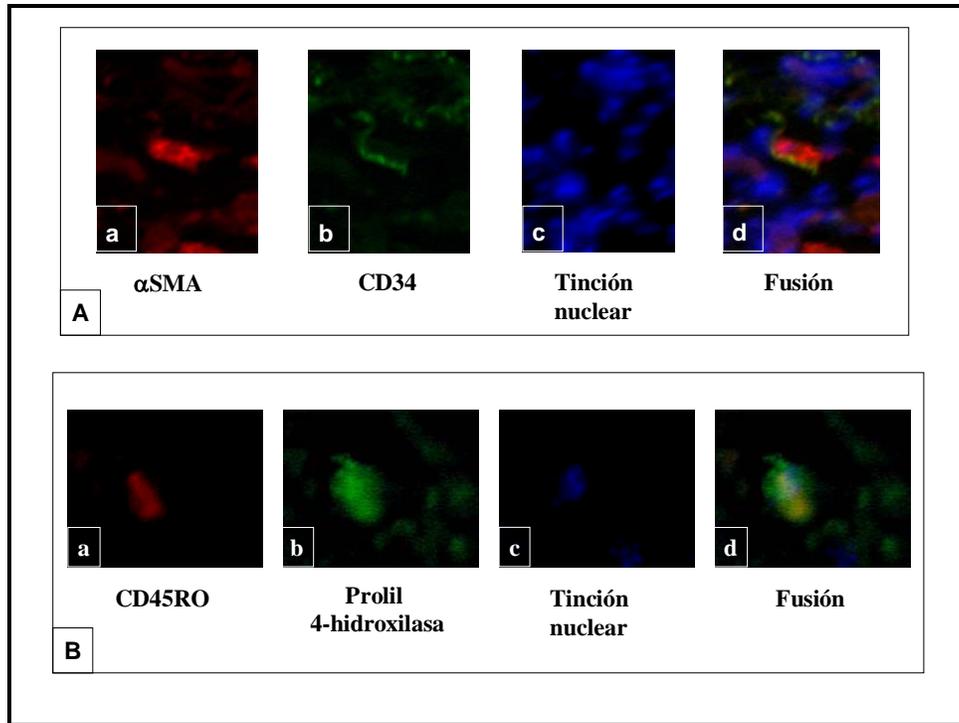


Figura 7: Imagen representativa de la identificación de fibrocitos en pulmones con FPI utilizando diferentes marcadores hematopoyéticos/mesenquimatosas. **Panel A** a, b, c y d representan la tinción para α -AML, CD34, núcleo y una imagen de la combinación, respectivamente. **Panel B:** a, b, c y d muestran la tinción para CD45RO, prolif-4-hidroxilasa, núcleo y la imagen combinada respectivamente. Aumento original 40X.

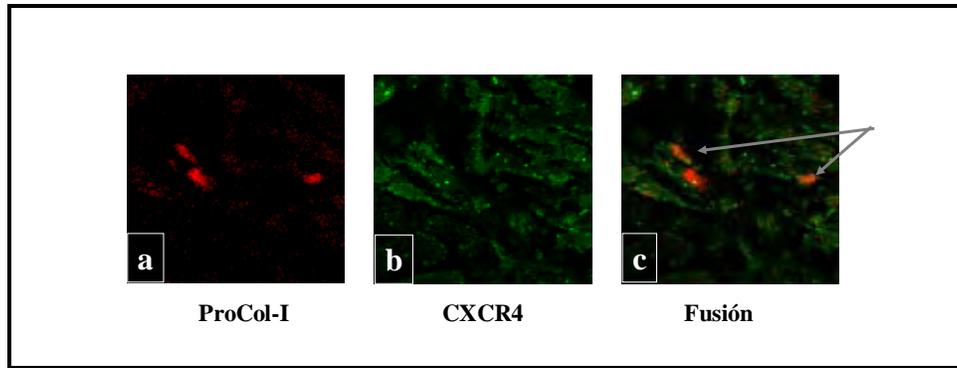


Figura 8: Identificación de fibrocitos usando (a) procolágena tipo I y (b) CXCR4. Dos células que coexpresan ambos marcadores se indican con flechas (panel c) (40X).

Todos los experimentos se corrigieron para autofluorescencia e inespecificidad mediante la incubación con los anticuerpos secundarios y la tinción nuclear Hoechst, sin el anticuerpo primario (**Figura 9, panel f**).

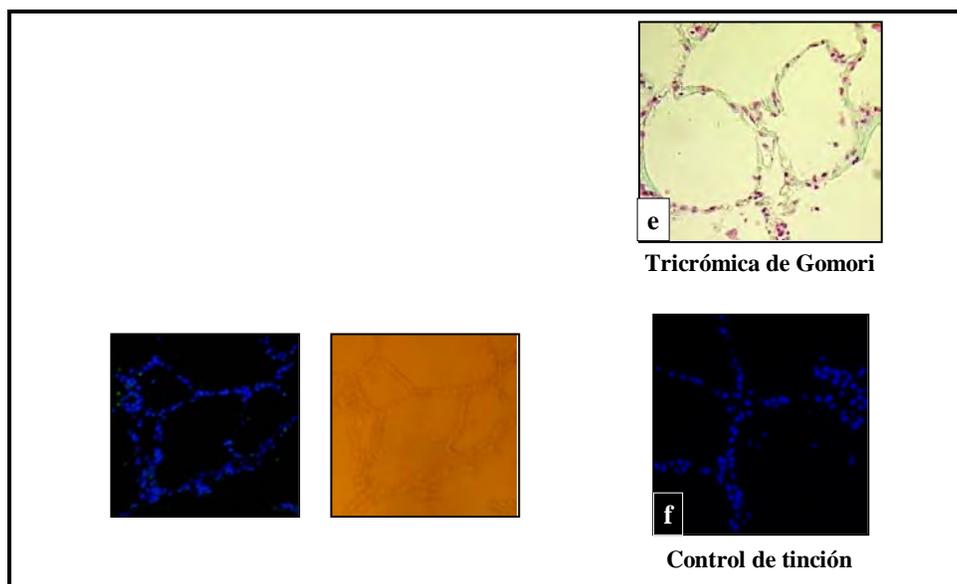


Figura 9: No se encontraron fibrocitos en pulmones normales. **Páneos a, b, c y d** muestran la tinción para prolil-4-hidroxilasa, CXCR4, una imagen de la combinación (incluyendo la tinción nuclear) y una imagen de microscopía de luz respectivamente. La tinción tricrómica de Gomori muestra la arquitectura del pulmón normal (**panel e**). Se incluyeron análisis de control en todos los experimentos para descartar unión inespecífica de los anticuerpos y fluorescencia de fondo. Esto se ejemplifica en el **panel f**, donde el tejido fue incubado con la exclusión de los anticuerpos primarios para CXCR4/prolil 4-hidroxilasa. Aumento 20X.

Por otro lado, en el análisis morfométrico se encontró una correlación positiva entre la cantidad de focos de fibroblastos (FF) y el número de fibrocitos en pulmón, como se muestra en la **figura 10** para la combinación de CXCR4/p-4-OH y número de FF/cm² ($r=0.79$; $p<0.02$).

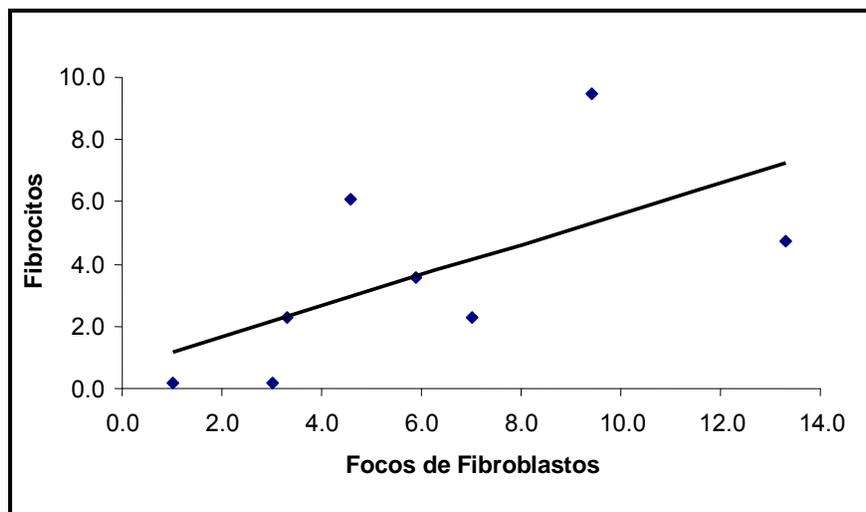


Figura 10: Correlación entre la cantidad de fibrocitos y la cantidad de focos de fibroblastos en pulmones de pacientes con FPI ($r=0.79$; $p<0.02$).

Posteriormente analizamos la presencia de fibrocitos en los lavados bronquioalveolares de los mismos pacientes con FPI utilizando las mismas combinaciones de anticuerpos específicos. Sin embargo no se encontraron células que compartieran marcadores típicos como se ilustra con la combinación de prolil 4-hidroxilasa y CXCR4 en la **figura 11**. La tinción con marcadores mesenquimatosos reveló que 1.0-3.4% del total de células de LBA eran células tipo fibroblastos.

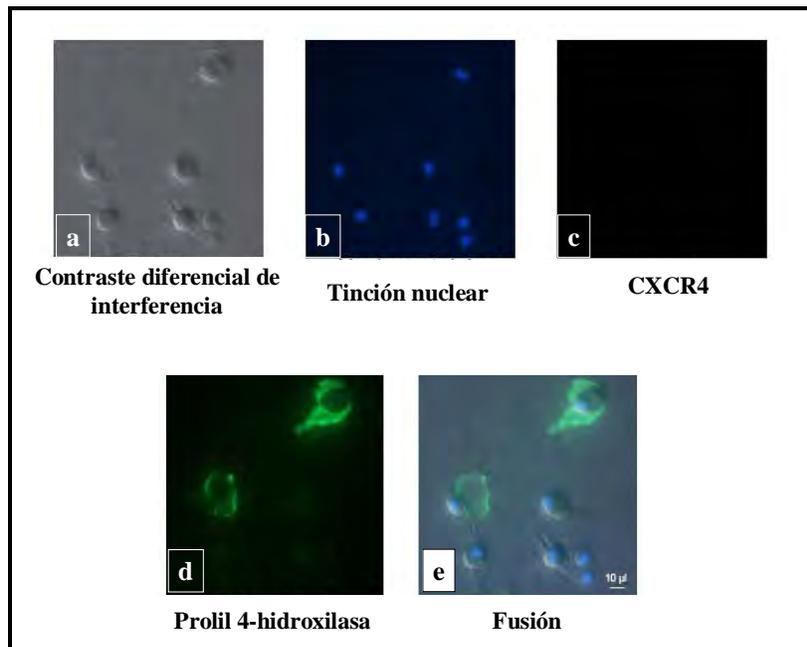
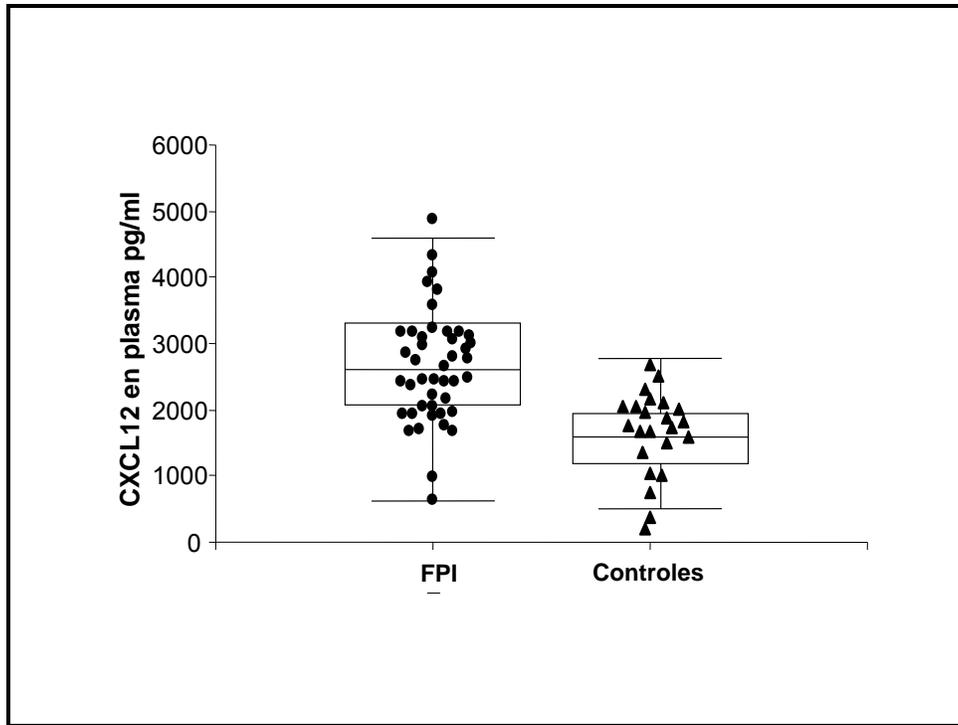


Figura 11: Imágenes de microscopía de fluorescencia de células obtenidas del LBA de pacientes con FPI combinando marcadores hem atopoyéticos y mesenquimatosos. Panel a: Contraste diferencial de interferencia según Nomarski.

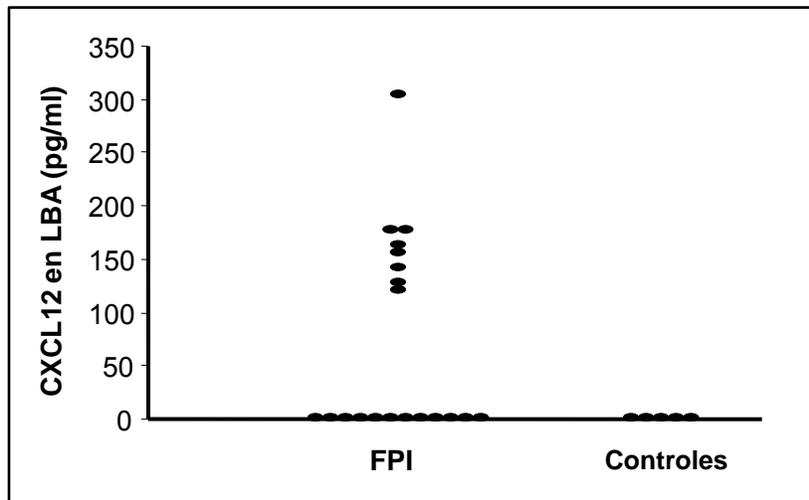
Panel b: tinción nuclear. **Panel c:** tinción para el receptor CXCR4. **Panel d:** tinción para prolil-4-hidroxilasa. **Panel e:** fusión de b, c y d. No se identificaron fibrocitos en las células del LBA pero se encontraron células positivas para prolil-4-hidroxilasa en todos los pacientes. Aumento 40X.

Determinación de los niveles de CXCL12 en plasma y LBA

Para evaluar la posible contribución de la quimiocina CXCL12, ligando único del receptor CXCR4, en la migración de fibrocitos, medimos su concentración en el plasma de 42 pacientes con FPI sin tratamiento previo (27 hombres, 67 ± 7.4 años de edad) y 23 controles sanos (16 hombres 50 ± 12.4 años de edad). Como se ilustra en la **figura 12A**, la concentración de CXCL12 en el plasma del grupo de pacientes con FPI fue significativamente mayor que la observada en los controles [mediana: 2707.54 pg/ml (648.1-4884.7) versus 1751.5 pg/ml (192.9-2686.0); $p < 0.003$]. De igual manera se pudo detectar CXCL12 en el sobrenadante de LBA del 40% (8/20) de los pacientes con FPI estudiados y en ninguno (0/5) de los individuos control (**Figura 12B**). Se encontró una correlación negativa entre la concentración plasmática de SDF-1 α / CXCL12 y la capacidad pulmonar de difusión de monóxido de carbono (DLCO) y saturación de oxígeno ($r = -0.56$; $p < 0.03$ y $r = -0.41$; $p < 0.04$ respectivamente). No se encontró correlación con ninguna otra variable clínica o funcional incluyendo capacidad vital forzada (FVC) (**Figura 13**).



A



B

Figura 12: Distribución de las concentraciones de CXCL12 en plasma (A) y LBA (B) de pacientes con FPI y voluntarios sanos. Todos los experimentos fueron hechos por duplicado.

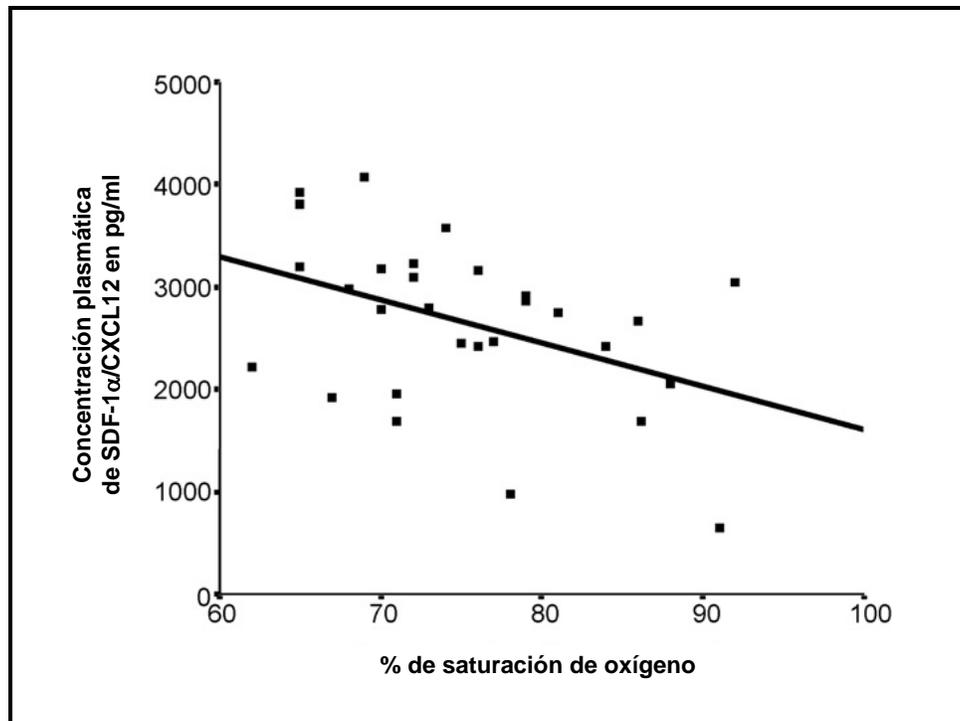


Figura 13. Asociación entre la concentración plasmática de CXCL12 y la saturación de oxígeno en ejercicio (Correlación de Spearman: $r = -0.41$; $p < 0.04$)

Análisis inmunohistoquímico de la quimiocina CXCL12 en pulmones con FPI y controles

El posible origen celular de CXCL12 fue examinado por inmunohistoquímica en secciones de tejido pulmonar de los 8 pacientes con FPI e en los cuales se

determinó la presencia de fibrocitos y en 3 pulmones control. Como se muestra en la **Figura 14**, la proteína se expresó fuertemente en células epiteliales hiperplásicas que delimitaban espacios aéreos remanentes así como por células alveolares epiteliales apiladas que frecuentemente se encontraron sobre los focos de fibroblastos. La tinción para CXCL12 se apreció también en células endoteliales y algunos macrófagos alveolares. No se observó tinción en pulmones normales.

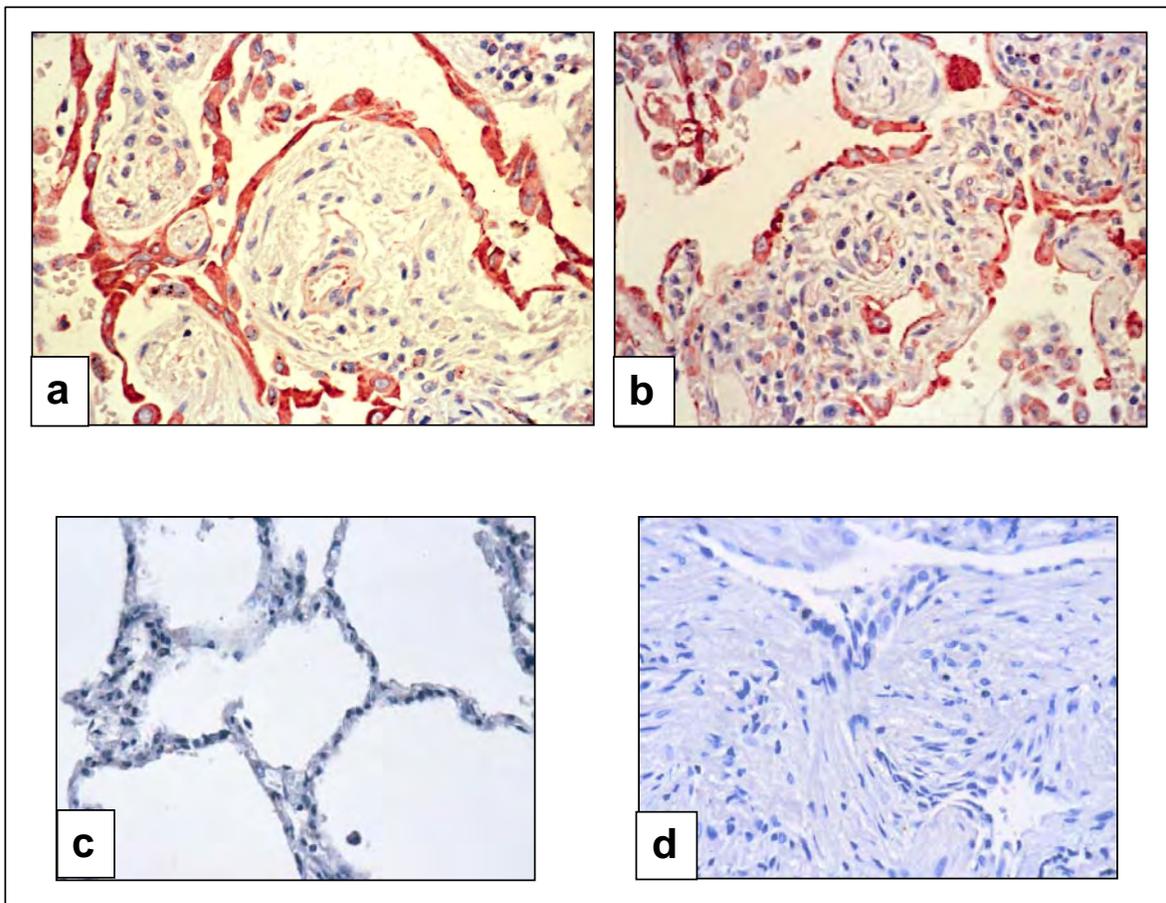


Figura 14: Inmunolocalización de CXCL12 en pulmones con FPI y normales.

Páneles a y b: La proteína inmunorreactiva fue detectada principalmente en células epiteliales alveolares, frecuentemente rodeando los focos de fibroblastos

(aumento original 40X). **Panel c:** Los pulmones normales fueron negativos para CXCL12 (40X). **Panel d** ilustra el control negativo en el cual se omite el anticuerpo primario (40X).

Determinación de la expresión de metaloproteasas de matriz por fibrocitos en cultivo

Separación y caracterización de fibrocitos circulantes por inmunofenotipo

Se ha de mostrado previamente que los fibrocitos se diferencian a partir de una sub-población de monocitos CD14+ de sangre periférica (92), por esto los purificamos utilizando perlas magnéticas para la selección negativa de monocitos CD14+. Después de 8 días de cultivo se recuperaron generalmente de $6-8 \times 10^5$ fibrocitos a partir de un cultivo inicial de 5×10^6 células CD14+. El inmunofenotipo de las células fue analizado por citometría de flujo, evaluando la expresión de marcadores distintivos de fibrocitos, como: colágena I, CXCR4 y CD45. Como se muestra en la **figura 15**, aproximadamente 95% de las células expresaban ya sea los tres marcadores de fibrocitos o eran dobles positivas para Col I/CXCR4 o Col I/CD45. Un cierto porcentaje de los fibrocitos mantenía la expresión de CD14. Las células contaminantes ($\leq 5\%$ en todos los casos) eran principalmente linfocitos T y en menor porcentaje linfocitos B.

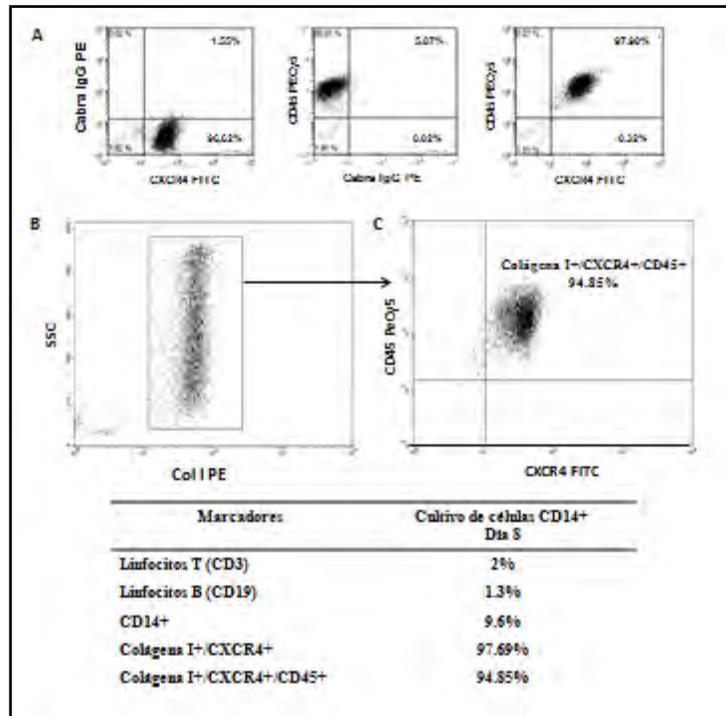


Figura15: Análisis del inmunofenotipo de fibrocitos por FACS.

El enriquecimiento de la población de fibrocitos se llevó a cabo haciendo primero una selección negativa de monocitos CD14+ con perlas magnéticas. A los 8 días de cultivo los fibrocitos fueron marcados con anticuerpos contra colágena I, CXCR4 y CD45. **A:** Gráfica de puntos mostrando el control de isotipo para colágena I. **B:** Gráfica de puntos mostrando a las células colágena I positivas a partir de una ventana de SSC/Col I PE. **C:** Porcentaje de células colágena I+, CXCR4+ y CD45+. La contaminación por linfocitos se verificó usando anticuerpos específicos (CD3 y CD19 para linfocitos T y B respectivamente). La tabla muestra los porcentajes de marcadores de fibrocitos y células contaminantes.

Síntesis y secreción de colágena

La capacidad de los fibrocitos para sintetizar colágena in vitro se analizó por dos métodos distintos y se comparó con la síntesis de esta proteína por fibroblastos pulmonares humanos. Los fibrocitos mostraron una síntesis de colágena relativa a la síntesis total de proteínas de $31 \pm 5.1\%$, mientras que la de los fibroblastos, en el mismo periodo de tiempo, fue de $46 \pm 3.2\%$ (**Figura 16** panel A). También se cuantificó la colágena en los medios de cultivo de fibrocitos y fibroblastos utilizando el ensayo de Sircol, observándose que los fibrocitos liberaron al medio $100.8 \pm 8.7\mu\text{g/ml}$ de colágena y los fibroblastos $131.3 \pm 7.6 \mu\text{g/ml}$ en 24 hs (**Figura 16** panel B).

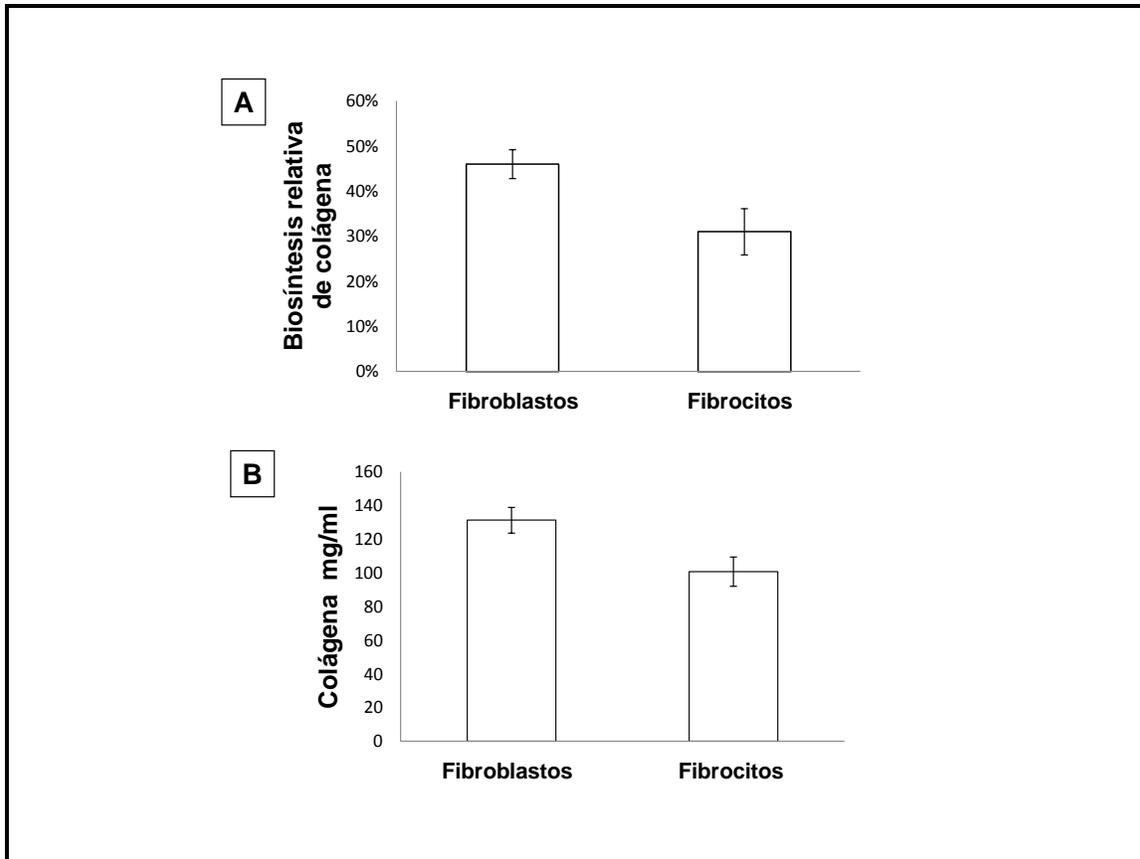


Figura 16: Los fibrocitos sintetizan colágena in vitro

A: Ensayo de biosíntesis de colágena por fibrocitos humanos y fibroblastos pulmonares. **B:** Concentración de colágena en medios condicionados de fibrocitos y fibroblastos humanos cultivados 24 hs. Las gráficas muestran el promedio y desviaciones estándar de tres experimentos diferentes en ambos casos.

Los fibrocitos expresan diversas metaloproteinasas de matriz.

Para evaluar la posible producción de MMPs por fibrocitos en cultivo, analizamos primero la expresión génica de diversas MMPs, incluyendo MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-8 y MMP-9 por RT-PCR en tiempo real. Nuestros resultados mostraron

una gran expresión de MMP-8 y MMP-9, seguida por MMP-2 y moderada expresión de MMP-7 (Figura 17). No se detectó expresión de MMP-1. Con la finalidad de evaluar estos hallazgos a nivel de proteína, se midieron las concentraciones de estas MMPs en sobrenadantes de cultivo de fibrocitos y fibroblastos utilizando un ensayo multiplex. Los resultados fueron consistentes con los obtenidos en el análisis de expresión génica. Así, los fibrocitos produjeron abundantes cantidades de MMP-2, -8 y -9 y moderadas cantidades de MMP-7 mientras que la MMP-1 no fue detectada (Figura 18). Los fibroblastos pulmonares utilizados como controles produjeron altas cantidades de MMP-2 (5.6×10^5 versus 3.9×10^5 pg/ml) y MMP-1 (0.3×10^5 pg/ml), pero no sintetizaron MMP-7, MMP-8 y MMP-9.

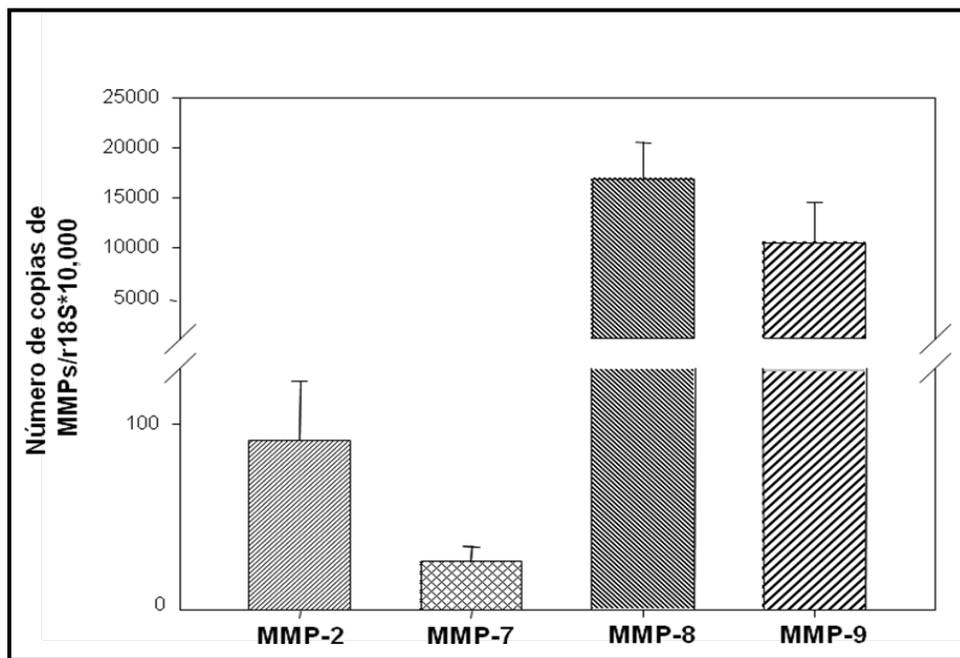


Figura 17: Expresión génica de MMPs por fibrocitos.

La expresión génica fue evaluada por PCR en tiempo real, utilizando sondas TaqMan® para cada gen. Las muestras provienen de tres diferentes cultivos y fueron analizadas por triplicado. Los resultados fueron normalizados con el R18S rRNA y se expresaron como promedio \pm DE.

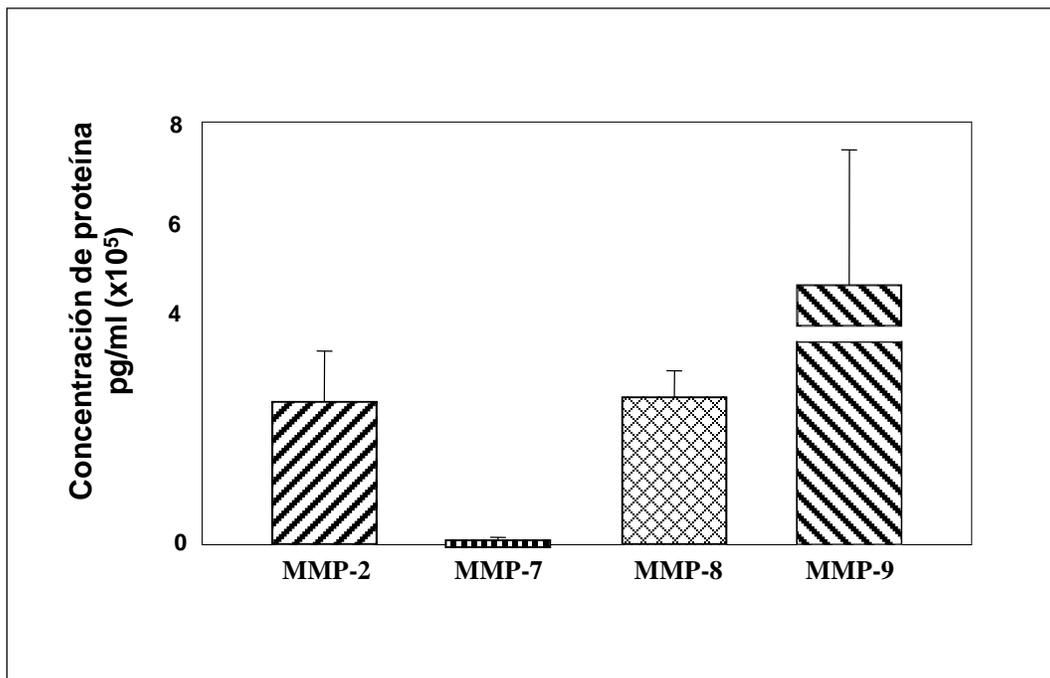


Figura 18: Expresión de proteínas de MMPs por fibroцитos.

La expresión de proteínas se examinó por Luminex. Se analizaron muestras de tres diferentes cultivos por triplicado. Los resultados se expresaron como promedio \pm DE.

Análisis de proteínas por Western Blot

La MMP-8 es una enzima característica de neutrófilos. En este contexto, para corroborar la presencia de esta metaloproteasa se analizaron lisados celulares y sobrenadantes de cultivo de fibrocitos por Western blot. Como se muestra en la **figura 19A**, se revelaron dos bandas positivas de aproximadamente 50 y 45kDa en los medios y lisados de fibrocitos mientras que en fibroblastos humanos no fue detectada. La proteína de MMP-8 recombinante migró de 75-70 kDa.

Zimograma de gelatina

Para evaluar la actividad de MMP-2 y MMP-9, los medios condicionados de fibrocitos y controles fueron analizados por zimografía. Como se muestra en la **figura 19B**, con este análisis se revelaron fuertes bandas gelatinolíticas correspondientes a MMP-9 tanto la pro-enzima como la forma activa. La actividad de MMP-2 también fue detectada (pro-enzima y forma activa) aunque en menor cantidad que la MMP-9. Los medios condicionados de fibroblastos humanos CCD25 y de la línea celular U2OS fueron usados como control positivo para MMP-2 y MMP-9 respectivamente.

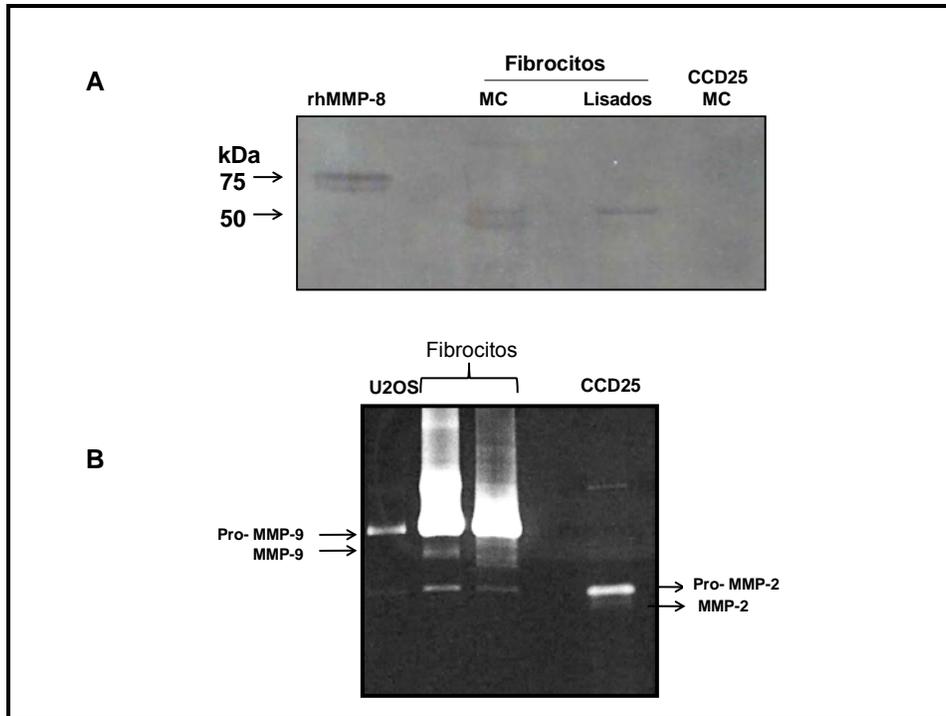


Figura 19: Análisis de Western Blot y zimograma de gelatina.

A: Inmunoblot de MMP-8 en medios condicionados y lisados celulares. Se utilizó una proteína recombinante de MMP-8 como control positivo. **B:** A lícuas de medio condicionado de fibrocitos fueron corridas en un gel de SDS-PAGE 8% con gelatina. Medio condicionado de fibroblastos de pulmón CCD25 y línea celular U2OS fueron utilizados como control positivo de MMP-2 y MMP-9 respectivamente.

Expresión de MMPs en fibrocitos estimulados con TGF- β 1

Se ha demostrado que el TGF- β 1 induce la diferenciación de fibrocitos a miofibroblastos. Con base en este antecedente quisimos evaluar el efecto de este mediador sobre la expresión de MMPs por fibrocitos. El análisis por PCR en

tiempo real de los fibrocitos estimulados con TGF- β 1 (**Figura 20A**) demostró una sobre-expresión de MMP-2 y MMP-9 ($p=0.001$ y 0.008 respectivamente) que fue corroborada por un zimograma de gelatina (**Figura 20B**), en donde se observa un incremento en las bandas de actividad gelatinolítica. En contraste, la MMP-7 y MMP-8 fueron disminuidas significativamente ($p=0.008$ y 0.007 respectivamente) como se muestra en la **figura 20A**.

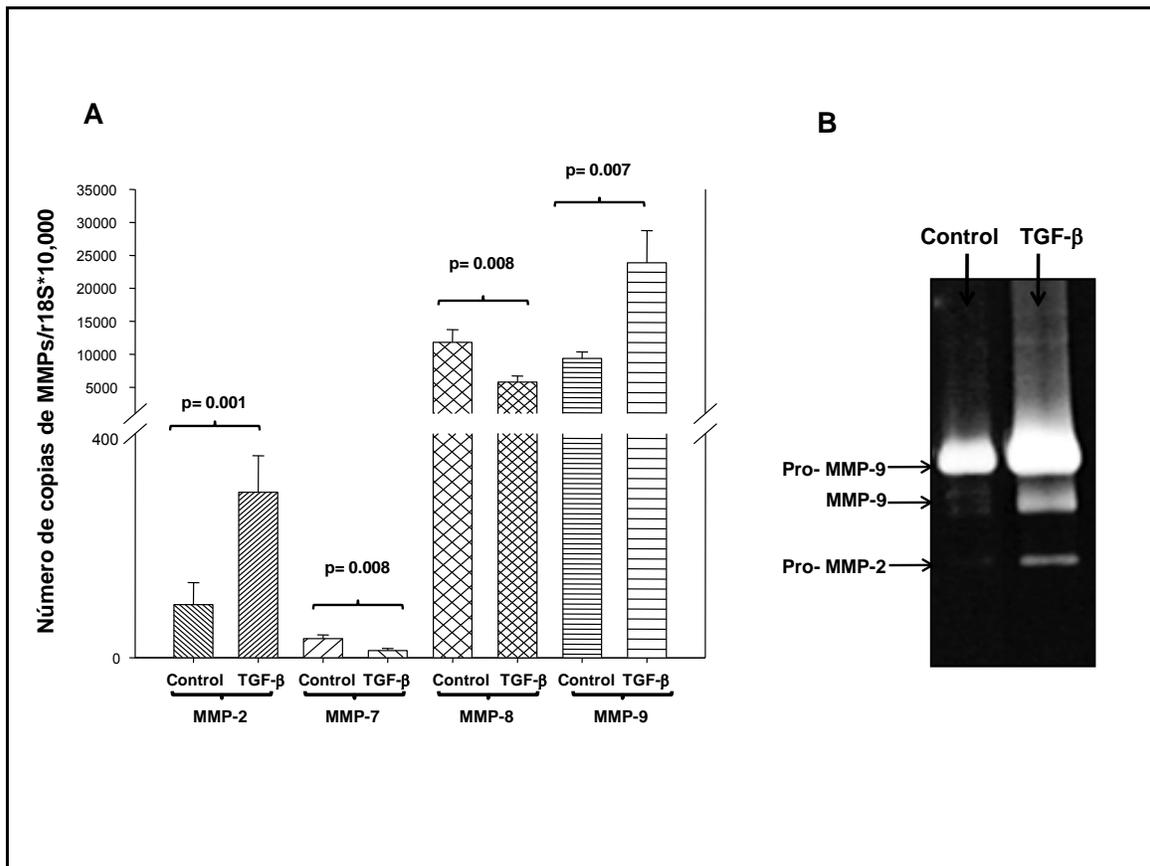


Figura 20: Efecto del TGF- β 1 en la expresión de MMPs por fibrocitos.

Muestras de tres diferentes cultivos fueron analizadas por triplicado por PCR en tiempo real. Los resultados fueron normalizados con el R 18S rRNA y se expresaron como promedio \pm DE. (**Panel A**). El incremento en la expresión de MMP-2 y MMP-9 fue corroborado con un zimograma de gelatina (**Panel B**).

Inmunocitoquímica y microscopía confocal.

Para corroborar la síntesis de MMP-8 y MMP-7 por fibrocitos, decidimos colocalizar estas enzimas, simultáneamente con colágena I, por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Los resultados se compararon con los obtenidos en fibroblastos pulmonares humanos que no hacen estas enzimas. Como se muestra en la **figura 21** y **figura 22** paneles A, se demostró la presencia tanto de MMP-8 y MMP-7 expresada simultáneamente con colágena I en más de 95% de los fibrocitos. Los fibroblastos pulmonares utilizados como control fueron positivos para colágena I pero no para MMP-7 ni MMP-8 (**figuras 21 y 22** paneles B). También encontramos que la mayoría de los fibrocitos coexpresaban el marcador común de leucocitos CD45 con colágena I y MMP-8 (**figura 23** A y B), mientras que los fibroblastos fueron negativos para CD45 (**figura 23C**). En la **figura 23D** se muestran los controles de isotipo para colágena I.

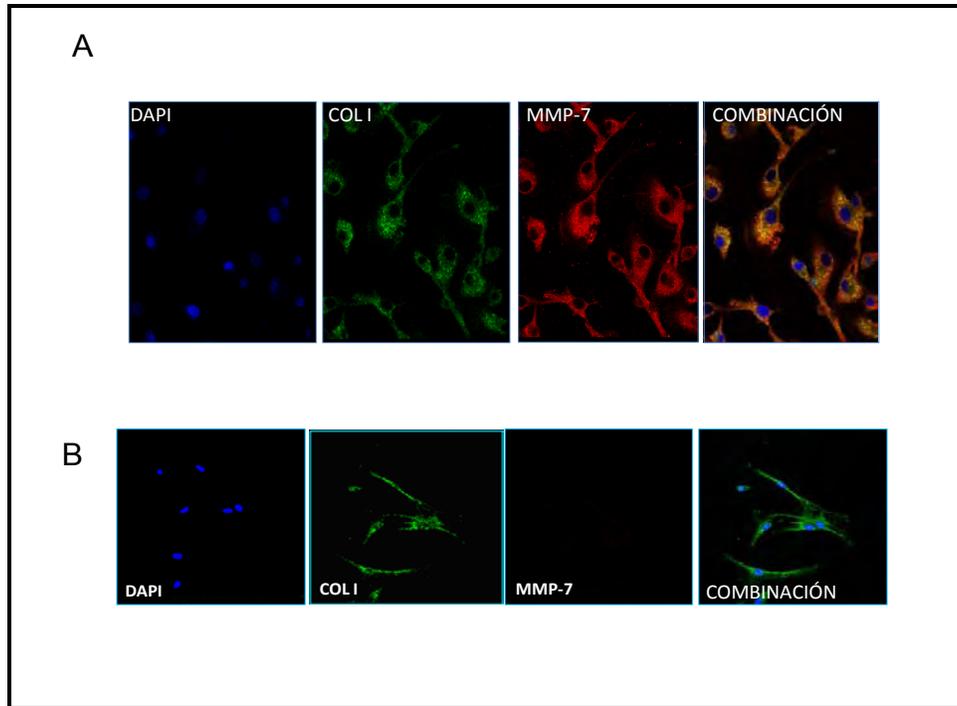


Figura 21: Inmunocitoquímica de fluorescencia.

Panel A: Los fibrocitos en cultivo muestran la expresión simultánea de colágena I y MMP-7. **Panel B:** Los fibroblastos de pulmón humano CCD25 fueron positivos para colágena I pero no para MMP-7. Fibrocitos y fibroblastos fueron teñidos con colágena I (FITC, verde), MMP-8 (Alexa 647, rojo) y DAPI para tinción nuclear (azul), (aumento 40X).

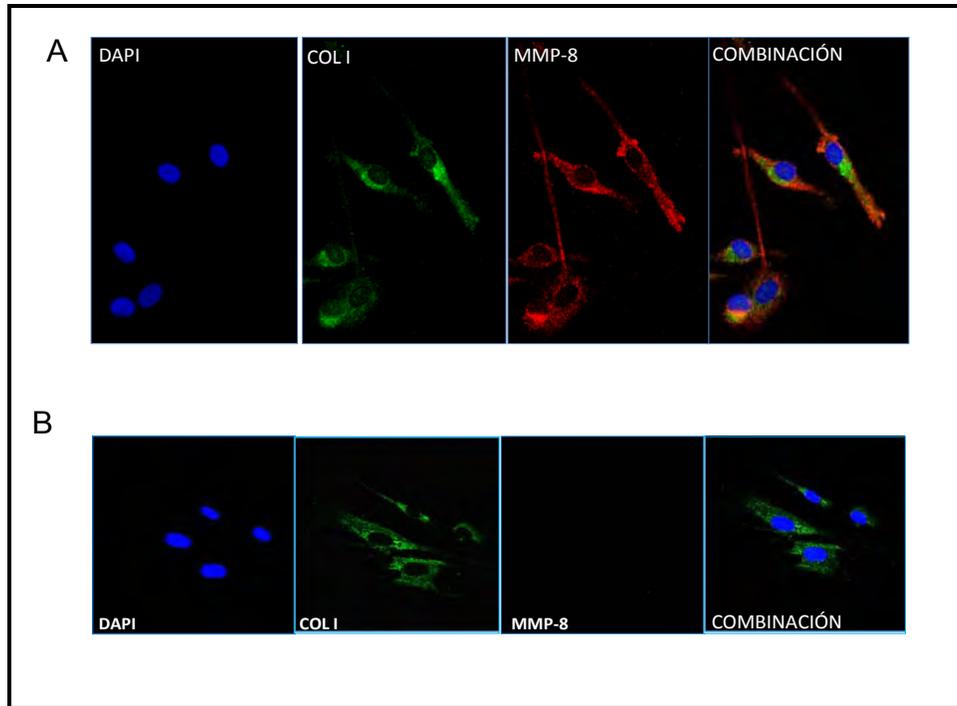


Figura 22: Los fibrocitos también mostraron expresión simultánea de MMP-8 y colágena I (panel A).

Los fibroblastos CCD25 utilizados como controles fueron negativos para MMP-8 y positivos para colágena I (panel B). Los fibrocitos y fibroblastos fueron teñidos con colágena I (FITC, verde), MMP-8 (Alexa 647, rojo) y DAPI para tinción nuclear (azul), (aumento 40X).

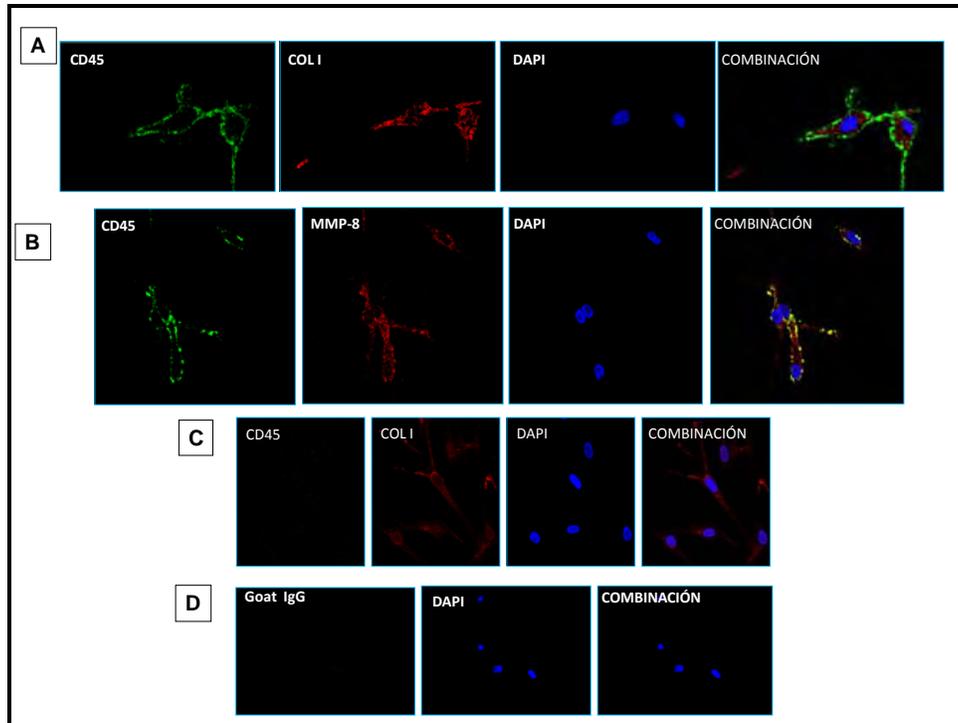


Figura 23: Los fibrocitos coexpresan el antígeno común de leucocitos CD45 con colágena I y MMP-8 (páneles A y B).

Los fibroblastos de pulmón humano fueron negativos para CD45 (panel C). El control de isotipo para colágena I (IgG de cabra) se muestra en el panel D. Los fibrocitos y fibroblastos fueron teñidos con CD45 (verde), MMP-8 o colágena I (rojo) y DAPI para tinción nuclear (azul). (Aumento 40X).

Ensayo de migración

Con el fin de evaluar el posible papel de la MMP-8 en la migración de fibrocitos, se analizó la participación de esta enzima en la migración de estas células a través de cámaras de Boyden cubiertas con colágena I. Como se muestra en la **figura 24A**, se detectó una migración importante de fibrocitos hacia la cámara inferior

donde que contenía PDGF-B o CXCL12. Los fibrocitos mostraron un aumento significativo en su capacidad migratoria (2.3 veces más) cuando se utilizó PDGF-B como quimioatrayente comparado con CXCL12 ($p=.001$). Una observación interesante fue que la migración de fibrocitos hacia PDGF-B fue ~1.8 veces más que la observada para fibroblastos plmonares humanos. Cuando se utilizó un inhibidor específico para MMP-8 se evidenció una reducción significativa en la migración de fibrocitos: 60.9% cuando se usó CXCL12 ($p=0.01$) y 65.5% cuando el quimioatrayente fue PDGF-B ($p= 0.002$).

Por otro lado, también analizamos el efecto de la inhibición de MMP-2/MMP-9 en la migración de los fibrocitos a través de cámaras de Boyden cubiertas con ECMatrix™ (un sucedáneo de membranas basales). Como se ilustra en la **figura 24B**, la inhibición específica de MMP-2 y MMP-9 produjo una reducción del 42% en la migración inducida por CXCL12 ($p= 0.002$) y de un 49% en la migración inducida por PDGF-B ($p=0.0008$).

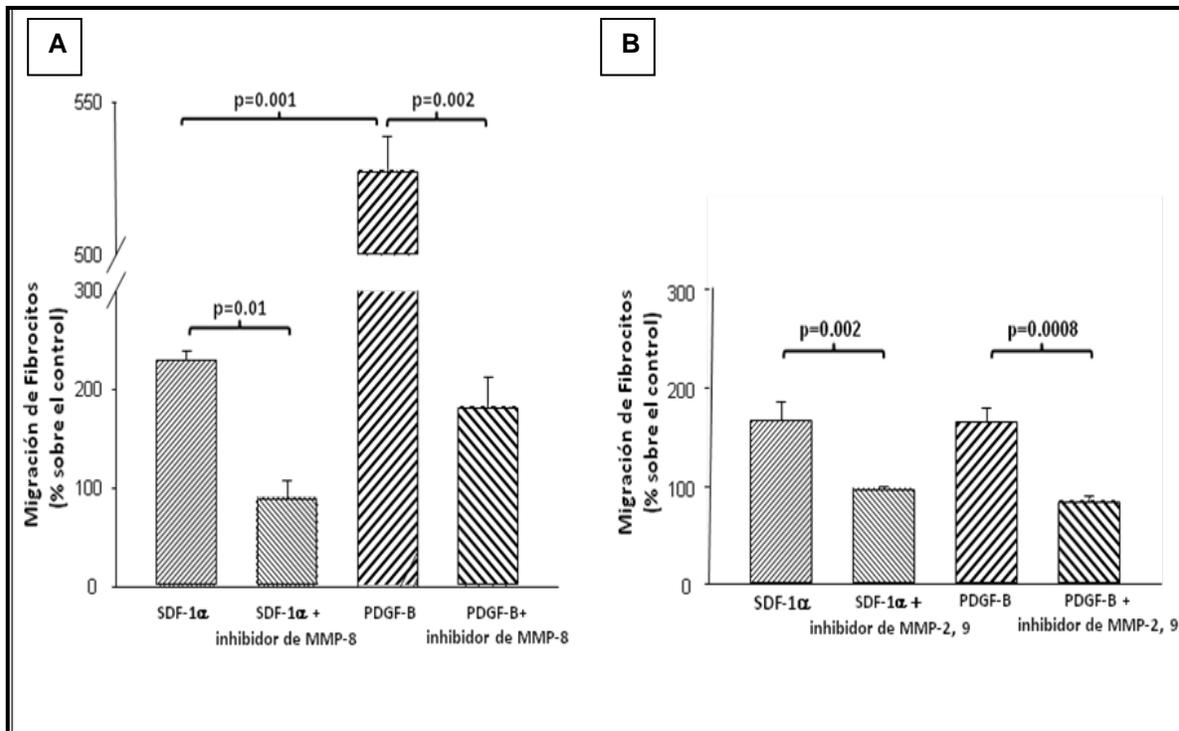


Figura 24: La inhibición de MMP-8 o MMP-2 y MMP-9 disminuye la migración de los fibrocitos a través de diferentes matrices.

Los fibrocitos fueron colocados en el compartimento superior de cámaras de Boyden recubiertas con colágena I o con una matriz de proteínas de membrana basal. CXCL12 o PDGF-B fueron utilizados como quimioatrayentes en el compartimento inferior. El inhibidor específico de MMP-8 o MMP-2/MMP-9 fue añadido tanto al compartimento superior como al inferior. Cada barra representa el promedio \pm DE de tres experimentos.

DISCUSION

La fibrosis pulmonar idiopática se caracteriza por lesión y activación epitelial, formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos y finalmente por la progresiva remodelación con acumulación de matriz extracelular lo que produce una destrucción irreversible de la arquitectura pulmonar. En este contexto, el desarrollo de estos peculiares focos de células mesenquimales desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la lesión fibrosante.

Sin embargo, el origen de los fibroblastos en esta enfermedad aún se desconoce. Existen datos de que los fibroblastos obtenidos de pulmones con FPI son fenotípicamente y funcionalmente heterogéneos (93), lo cual puede reflejar no solo diversos procesos de activación y diferenciación que toman lugar en el microambiente pulmonar, sino también que los fibroblastos tengan diferentes sitios de origen.

Las fuentes potenciales intrapulmonares de fibroblastos incluyen migración y proliferación de precursores mesenquimatosos presentes en el órgano, tales como fibroblastos peribronquiolares, perivascular y de la septoalveolar, así como la transición epitelio-mesénquima (22, 26, 30, 94).

Una posible fuente extra-pulmonar de fibroblastos/miofibroblastos es la población de fibrocitos derivados de la médula ósea, los cuales muestran propiedades parecidas a las de los fibroblastos y sintetizan macromoléculas de matriz. Más aún, existen diversas pruebas que indican que los fibrocitos pueden ser reclutados a sitios de lesión tisular y participar en el proceso de remodelación. En este

sentido, se han identificado fibrocitos en diferentes modelos de reparación tisular y fibrosis experimentales incluyendo heridas en piel, asma, remodelación vascular pulmonar y fibrosis pulmonar y hepática (41, 43, 65, 67, 68, 95). También se han detectado fibrocitos en algunas patologías fibrosantes humanas incluyendo asma, dermatopatía nefrogénica fibrosante y escleroderma (43, 68, 96). Más aún, en estas enfermedades se ha detectado que el número de fibrocitos parece ser proporcional al grado de fibrosis y cuando menos en piel, se han encontrado en mayor abundancia en cicatrices hipertróficas que en cicatrices maduras (55). Sin embargo, hasta la fecha, no existían estudios tratando de determinar la presencia de estas células en pulmones de pacientes con FPI.

Nuestros resultados revelan que los fibrocitos migran hacia pulmones con FPI y sugieren que pueden contribuir a la expansión de fibroblastos/miofibroblastos en el microambiente local. El número de fibrocitos fue variable en los pulmones con FPI, pero de manera interesante, su cantidad correlacionó con la cantidad de focos de fibroblastos presentes en los tejidos. Este hallazgo es importante dado que la abundancia de estos focos en el tejido pulmonar se ha relacionado con un mal pronóstico de la enfermedad (97, 98).

Por otro lado, nuestro estudio apoya la hipótesis de que el eje CXCR4/CXCL12 desempeña un papel importante en el reclutamiento de fibrocitos y a que virtualmente todos los fibrocitos detectados en los pulmones expresaban CXCR4. Más aún, la quimiocina CXCL12 se encontró incrementada en plasma y presente en aproximadamente la mitad de los sobrenadantes de LBA de pacientes con FPI. Esta quimiocina, que es el único ligando del receptor CXCR4, se encontró

fuertemente expresada en células epiteliales alveolares hiperplásicas reactivas, apoyando la noción de que el epitelio desempeña un papel crucial en la patogénesis de la FPI (8).

Los fibrocitos circulantes también expresan otros receptores tales como CCR7 y se ha sugerido que el eje CCR7/CCL21 puede participar en la migración de fibrocitos a los tejidos (49, 73). Sin embargo, recientemente se demostró que el receptor CCR7 no colocaliza con colágeno I en pulmones de pacientes con FPI, indicando que el eje CXCR4/CXCL12 puede ser el más importante (99). En apoyo a este concepto, se ha identificado previamente una población de fibrocitos humanos circulantes que tienen fundamentalmente el receptor CXCR4⁺ (60, 71). Asimismo, en un modelo experimental de lesión pulmonar inducida por bleomicina, se demostró que fibrocitos humanos CXCR4⁺ previamente inyectados por vía endovenosa, infiltran los pulmones de los ratones precediendo a la fibrosis a través de un gradiente pulmón-plasma de CXCL12 sugiriendo un tránsito activo a través de esta vía (60). Más aún, el tratamiento de estos ratones con un anticuerpo neutralizante para CXCL12 produjo una reducción significativa en el reclutamiento de estas células al pulmón lesionado con la consiguiente disminución de la fibrosis. En este contexto, nuestros hallazgos sugieren que una vía similar se sigue en el reclutamiento de fibrocitos a los pulmones con FPI. En contraste, en el ratón parecen participar también los ejes CCR2/CCL12 y CCR7/CCL21, sugiriendo la existencia de mecanismos redundantes en la migración de fibrocitos a los tejidos lesionados (70, 73).

Es importante enfatizar que las combinaciones en las cuales se utilizaron marcadores hematopoyéticos (ej. CD45 y CD34) revelaron una cantidad significativamente menor de fibrocitos pulmonares comparado con aquellos que expresaban CXCR4. Estos hallazgos concuerdan con varios estudios realizados *in vitro* e *in vivo* donde se demuestra una pérdida progresiva de marcadores hematopoyéticos después de algunos días de cultivo, o después de un tiempo de estar en los tejidos. Por ejemplo, el análisis del fenotipo de fibrocitos en modelos animales de remodelación de vías aéreas ha revelado que la adquisición del fenotipo de miofibroblasto ocurre paralelamente con el decremento en la expresión de CD45 y CD34 (43, 45). Asimismo, se ha observado una disminución de la expresión de CD34 y CD45 en los fibrocitos durante su diferenciación a miofibroblastos en un modelo de herida en piel, a los 7 días de producida la herida (41).

Estos hallazgos indican que después de cierto tiempo en tejidos, los fibrocitos pierden progresivamente los marcadores de células troncales /hematopoyéticas, lo cual dificulta la tarea de evaluarlos en patologías fibrosantes crónicas. Esta situación puede explicar la ausencia de células coexpresando prolil-4-hidroxilasa (enzima clave en la síntesis de colágena) con CD45 o CD34 en el lavado bronquioalveolar a pesar de que generalmente se pueden encontrar fibroblastos en este fluido tanto en FPI como en otras enfermedades fibrosantes del pulmón o vías aéreas (100, 101).

En este contexto, la identificación de fibrocitos como células que coexpresan marcadores tanto del mesénquima como hematopoyéticos puede en gran medida

subestimar su número en los sitios de lesión tisular crónica, principalmente después de que han completado su diferenciación a miofibroblastos.

Por otro lado, es importante enfatizar que además de su contribución a la síntesis de matriz extracelular, los fibrocitos pueden tener otros efectos sobre las células vecinas en el microambiente tisular ya que son potentes células presentadoras de antígeno, son capaces de sintetizar una variedad de factores promitogénicos y proangiogénicos y pueden incluso regular las actividades de los fibroblastos locales como ha sido ya demostrado en lesiones por quemaduras (46, 47, 52, 63).

En resumen, los hallazgos de la primera parte de nuestro estudio demuestran que los fibrocitos CXCR4 positivos migran a los pulmones de pacientes con FPI, probablemente en respuesta a la quimiocina CXCL12 sintetizada por las células epiteliales alveolares, contribuyendo por lo tanto a la expansión de la población de fibroblastos/miofibroblastos.

Como se mencionó previamente, además de su contribución a la síntesis de matriz extracelular, los fibrocitos parecen tener diversas funciones, pero hasta el momento, el papel de estas células en la fibrosis pulmonar es muy poco conocido.

En el presente trabajo, describimos por primera vez que los fibrocitos son capaces de sintetizar y liberar al medio importantes cantidades de MMP-2, MMP-7, MMP-8 y MMP-9. Estas enzimas pertenecen a una gran familia de endoproteasas con un sitio activo de zinc, que colectivamente son capaces de degradar todos los componentes de la matriz extracelular (MEC). Sin embargo, la MEC representa solo una fracción de sus blancos proteolíticos y más aún, una MMP puede actuar

sobre varias proteínas y a su vez afectar diferentes procesos biológicos. De hecho, las MMPs modulan las actividades de un amplio rango de proteínas extra e intracelulares y por lo tanto regulan procesos como proliferación celular, adhesión, migración, biodisponibilidad de factores de crecimiento, quimiotaxis y señalización. La única documentación previa de la expresión de metaloproteasas por fibrocitos fue publicada por Hartlapp y cols (46), quienes describieron la expresión de MMP-9 por fibrocitos, proponiendo que estas células podrían estar involucradas en angiogénesis en fases muy tempranas de la reparación de tejidos.

En nuestro estudio, corroboramos este hallazgo a nivel de gen y de proteína y demostramos que existe una importante actividad gelatinolítica atribuible a la MMP-9 en los sobrenadantes de cultivo de fibrocitos. Adicionalmente, nuestros resultados revelaron que los fibrocitos producen también tanto la forma activa como la pro-enzima de MMP-2. Este hallazgo es importante porque se ha demostrado que las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) se encuentran sobre-expresadas en la fibrosis pulmonar humana y en modelos animales de fibrosis pulmonar (102-104). El efecto de cantidades excesivas de MMP-2 y MMP-9 en el microambiente tisular se ha asociado principalmente con su capacidad de provocar disrupción de la membrana basal del epitelio alveolar con el consecuente incremento de la invasión de fibroblastos hacia los espacios alveolares (105). En este contexto, la expresión de estas enzimas podría facilitar el proceso de migración de fibrocitos de la circulación hacia los espacios intersticiales y alveolares en respuesta al CXCL12 sintetizado por las células epiteliales alveolares. Nuestro hallazgo de que los fibrocitos estimulados con TGF- β 1 incrementan

significativamente la expresión tanto a nivel de gen como de proteína de MMP-2 y MMP-9 *in vitro*, sugiere que *in vivo* los fibrocitos expresan activamente estas enzimas cuando se encuentran en presencia de un microambiente fibrótico que habitualmente es rico en TGF- β 1. De manera importante, MMP-2 y MMP-9 y el TGF- β 1 pueden mostrar una forma de retroactivación bidireccional ya que se ha demostrado que MMP-2 y MMP-9 son a su vez capaces de activar al TGF- β latente (106). En este contexto, en el microambiente pulmonar se puede producir un círculo vicioso profibrosante, en el que el TGF- β incrementa la expresión de MMP-2 y MMP-9 (como se demostró en este estudio) y estas enzimas a su vez, aumentan los niveles de TGF- β activo.

Un hallazgo importante de este trabajo, fue la demostración por diversas técnicas, de que los fibrocitos sintetizan MMP-7 y MMP-8, dado que la producción de estas metaloproteinasas parece estar restringida a un número limitado de tipos celulares, principalmente células epiteliales y macrófagos para MMP-7 y neutrófilos para MMP-8 (107).

La síntesis de MMP-7 por fibrocitos es interesante ya que esta metaloproteasa fue recientemente asociada a fibrosis pulmonar (108). En ese trabajo se demostró por un lado que la MMP-7 es uno de los genes más sobre-expresados en FPI, lo cual fue confirmado por inmunohistoquímica de tejidos pulmonares y por el otro se encontró que el ratón deficiente de MMP-7 está protegido de la lesión fibrosante inducida por bleomicina. La MMP-7 así como la MMP-1 ha sido relacionada a la migración de células epiteliales a alveolares y bronquiolares sobre diferentes matrices durante la remodelación que ocurre en el pulmón con FPI (103). Sumado

a esto, la MMP-7 puede romper E-caderina y el fragmento extracelular que es liberado interfiere con la agregación celular (109); la ruptura de E-caderina puede también influenciar diversos aspectos del comportamiento celular tales como la transición epitelio-mesénquima, que como se mencionó, es un proceso que participa en muchos cánceres y que recientemente ha adquirido gran importancia como mecanismo patogénico en el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática (22, 110-112).

En resumen, las funciones de la MMP-7 son variadas (muerte celular, inflamación crónica y actividad pro-coagulante entre otras) y no está limitada a la degradación y recambio de la matriz extracelular (108, 113, 114). En este contexto, el hecho de que los fibrocitos secreten constitutivamente la MMP-7 es un hallazgo importante que puede implicar a los fibrocitos en diversos procesos biológicos y patológicos.

La MMP-8 también es secretada en grandes cantidades por los fibrocitos en cultivo. Curiosamente, el peso molecular de esta forma particular de MMP-8 (~50 kDa) difiere del de la colagenasa encontrada en neutrófilos (usualmente 75-80 kDa), aunque es similar a la que sintetizan otros tipos celulares tales como sinoviocitos y células endoteliales. Se ha sugerido que esta diferencia en el peso molecular de MMP-8 obtenida de diferentes tipos celulares está relacionada con una menor glicosilación de la enzima comparada con la MMP-8 derivada de neutrófilos (115-118).

La MMP-8 o colagenasa 2 es principalmente producida por neutrófilos, degrada específicamente colágenas fibrilares tipo I, II y III y se sabe que desempeña un papel regulatorio importante tanto en la inflamación aguda como en la inflamación

crónica (119). Sin embargo, la MMP-8 tiene también muchos otros sustratos que incluyen otras proteasas y proteínas de matriz, proteínas de adhesión celular, inhibidores de proteasas, factores de crecimiento y quimiocinas. Más aún, estudios *in vivo* han mostrado que la MMP-8 y algunos otros miembros de la familia de MMPs pueden tener una función anti-tumoral (120).

En un intento por entender el papel de la MMP-8, MMP-2 y MMP-9 en la función biológica de los fibrocitos, evaluamos la hipótesis de que estas metaloproteasas podrían estar participando en el proceso de migración de los fibrocitos a través de los tejidos. Nuestros resultados del ensayo de migración apoyan ampliamente esta hipótesis y a que demostraron que los fibrocitos migran a través de cámaras recubiertas con proteínas de membrana basal o colágena I (matriz extracelular) hacia un gradiente de dos importantes quimioatrayentes (CXCL12 y PDGF-B). La transmigración de los fibrocitos a través de colágena I estuvo altamente asociada con la MMP-8 dado que fue significativamente bloqueada por un inhibidor específico de esta enzima. En este mismo contexto, demostramos que el inhibidor de MMP-2/MMP-9 disminuyó la quimiotaxis hacia CXCL12 y PDGF-B a través de una capa de proteínas componentes de membranas basales. Estos resultados indican que los fibrocitos pueden migrar a través de las membranas basales endoteliales o epiteliales secretando MMP-2/MMP-9 y a través de la matriz extracelular (intersticio) de los tejidos, secretando MMP-8.

Como ya se mencionó, esta enzima tiene la habilidad de degradar colágenos fibrilares, que son las más abundantes en los tejidos fibróticos. En trabajos previos se ha descrito que existen grandes cantidades de MMP-8 en lavados bronquioalveolares de pacientes con FPI pero esta enzima se encuentra

prácticamente ausente en el tejido pulmonar de estos enfermos (102, 121). En este contexto el hallazgo de que el estímulo con TGF- β indujo una disminución significativa en la expresión de MMP-8 por los fibrocitos parece correlacionar con lo anterior y podría indicar que al ingresar en el tejido pulmonar lesionado, estas células adquieren el fenotipo profibrosante característico de esta enfermedad.

Conclusiones

Al momento de su descubrimiento, los fibrocitos representaban una población de células circulantes progenitoras de fibroblastos/miofibroblastos con funciones limitadas a la síntesis de matriz. Al paso del tiempo han surgido nuevos datos de que los fibrocitos son células versátiles y multifacéticas con capacidad de sintetizar una gran variedad de factores promitogénicos y proangiogénicos, son potentes presentadoras de antígenos y pueden regular las actividades de los fibroblastos locales (52, 63, 64). En este estudio, corroboramos que los fibrocitos llegan al parénquima pulmonar de pacientes con FPI donde posiblemente contribuyen a la expansión de la población de fibroblastos/miofibroblastos en el microambiente pulmonar. Además, nuestros hallazgos revelan por primera vez que los fibrocitos expresan diversas MMPs incluyendo MMP-8 y MMP-7, ambas metaloproteinasas comúnmente expresadas por estirpes celulares específicas. La síntesis de estas enzimas podría desempeñar un papel importante en la migración tisular y transendotelial de estas células, así como en la remodelación de la matriz extracelular.

Aún cuando nuestros resultados de la estimulación de fibrocitos con TGF- β 1 nos dan una idea de lo que podría pasar en el microambiente fibrótico, se requiere de mayores estudios para saber si los fibrocitos aislados de pacientes con enfermedades fibrosantes del pulmón difieren de aquellos provenientes de individuos sanos como los utilizados en nuestro estudio y si los fibrocitos circulantes difieren de los fibrocitos de tejido que son parte y a de un microambiente fibrótico.

REFERENCIAS

1. Selman M , Morrison LD, Noble P W, King T. Idiopathic Interstitial Pneumonias. In: Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine, 5th edition, chapter 57, pp. 1356-1397, 2010.
2. Pardo A , Selman M . Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. Int J Biochem Cell Biol; 2002, 34: 534–1538.
3. Mescher AL, "Chapter 17. The Respiratory System" (Chapter). Mescher AL: Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas, 12e : <http://www.accessmedicine.com.ezproxy.galter.northwestern.edu/content.aspx?aID=6182422>.
4. Selman M, Pardo A . Role of Epithelial Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: from innocent targets to serial killers. Proc Am Thorac Soc. 2006; 3: 364-372
5. Raghu G , Weycker D , Edelsberg J , Bradford WZ, Oster G . Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med; 174:810-816, 2006.
6. Johnston I DA, Prescott R J, Chalmers J C, Rudd R M. British Thoracic Society's study of cryptogenic fibrosing alveolitis: current presentation and initial management. Fibrosing Alveolitis Subcommittee of the Research Committee of the British Thoracic Society. Thorax. 1997; 52: 38-44.
7. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial lung disease. Am J Respir Crit Care Med. 1994; 150:967-72.

8. Selman M, King T.E, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy, *Ann. Int. Med.* 2001; 134: 136–151.
9. Kasper M , H aroske G . Alterations i n t he a lveolar ep ithelium af ter i njury leading to pulmonary fibrosis. *Histol Histopathol*; 1996, 11:463-483.
- 10.Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res.* 2002; 3: 3- 10.
- 11.Pardo A , S elman M . Molecular M echanisms of Pulmonary F ibrosis. *Frontiers in Bioscience* 2002;7 :d1743-1761.
- 12.Kuhn C III, B oldt J , King T E Jr, C ouch E , V artio T , M cDonald J A. An immunohistochemical s tudy of ar chitectural r emodeling and c onnective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1989, 140:1693-1703.
- 13.Kuhn C , M cDonald J A, The r oles of t he myofibroblast i n idiopathic pulmonary f ibrosis. U ltrastructural and i mmunohistochemical f eatures of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol* 1991, 138: 1257-1265.
- 14.Fukuda Y, Basset F , Ferrans VJ, Yamanaka N , Significance of early intra-alveolar fibrotic lesions and integrin expression in lung biopsy specimens from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol* 1995, 26: 53-61.

15. Derdak S, Penney DP, Keng P, Felch ME, Brown D, Phipps RP. Differential collagen and fibronectin production by Thy 1+ and Thy 1- lung fibroblast subpopulations. *Am J Physiol*; 1992, 263: L283–L290.
16. Hagood JS, Prabhakaran P, Kumbla P, Salazar L, MacEwen MW, Barker TH, Ortiz LA, Schoeb T, Siegal GP, Alexander CB, Pardo A, Selman M. Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am J Pathol*; 2005, 167: 365–379.
17. Sanders YY, Kumbla P, Hagood JS. Enhanced myofibroblastic differentiation and survival in Thy-1(2) lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 2007, 36: 226–235.
18. Wilborn J, Crofford LJ, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM, Peters- Golden M. Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1995; 95: 1861–1868.
19. Nozaki Y, Liu T, Hatano K, Gharraee-Kermani M, Phan SH. Induction of telomerase activity in fibroblasts from bleomycin-injured lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 460–465.
20. Wang XM, Zhang Y, Kim HP, Zhou Z, Feghali-Bostwick CA, Liu F, Ifedigbo E, Xu X, Oury TD, Kaminski N, Choi AM. Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 2006; 203: 2895–2906.

21. Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc*; 2008, 5: 334–337.
22. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G: The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 2007; 170(6):1807-1816.
23. Aclouque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 119: 1438-1449, 2009.
24. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119: 1420-1428, 2009.
25. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110: 341-350, 2002.
26. Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13180-13185, 2006.
27. Larsson O, Diebold D, Fan D, Peterson M, Nho RS, Bitterman PB, Henke CA. Fibrotic myofibroblasts manifest genome-wide derangements of translational control. *PLoS One* 3: e3220, 2008.

28. Omenetti A, Porrello A, Jung Y, Yang L, Popov Y, Choi SS, Witek RP, Alpini G, Venter J, Vandongen HM, Syn WK, Baroni GS, Benedetti A, Schuppan D, Diehl A M. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest* 118: 3331-3342, 2008.
29. Selman M, Pardo A and Kaminski N. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Aberrant Recapitulation of Developmental Programs? *PLoS Med* 5(3): e62, 2008.
30. Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Brok Z. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial-like cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 166: 1321-1332, 2005.
31. Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A, Wei G, Shen L, Tanner SM, Creasap N, Rosol TJ, Robinson ML, Eng C, Ostrowski MC, Leone G. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res* 68: 937-945, 2008.
32. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28: 15-33, 2009.
33. Epperly MW, Guo H, Gretton JE, Greenberger JS. Bone marrow origin of myofibroblasts in irradiation pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, 29:213-224.

34. Hashimoto N, Jin H, Liu T, Chensue SW, Phan SH. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2004, 113:243-252.
35. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:8407–8411.
36. Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, Brigham KL. Bone marrow derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33:145e52.
37. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:4857e61
38. Antoniou KM, Papadaki HA, Soufla G, Kastrinaki MC, Damianaki A, Koutala H, Spandidos DA, Siafakas NM. Investigation of bone marrow mesenchymal stem cells (BM MSCs) involvement in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *Respiratory Medicine*. 2010; 104:1535-1542
39. Ebihara Y, Masuya M, Larue AC, Fleming PA, Visconti RP, Minamiguchi H, Drake CJ, Ogawa M. Hematopoietic origins of fibroblasts: II. In vitro studies of fibroblasts, CFU-F, and fibrocytes. *Exp Hematol* 2006; 34(2):219-229

40. Strieter RM, Keeley EC, Hughes MA, Burdick MD, Mehrad B. The role of circulating mesenchymal progenitor cells (fibrocytes) in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *J Leukoc Biol.* 2009; 86(5):1111-8.
41. Mori L, Bellini A, Stacey MA, Schmidt M, Mattoli S. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Experimental Cell Research* 2005; 304: 81–90
42. El-Asrar AM, Struyf S, Van Damme J, K Geboes. Circulating fibrocytes contribute to the myofibroblast population in proliferative vitreoretinopathy epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol* 2008; 92:699-704
43. Schmidt M, Sun G, Stacey MA, Mori L, Mattoli S. Identification of Circulating Fibrocytes as Precursors of Bronchial Myofibroblasts in Asthma. *J Immunol* 2003; 170: 380–389.
44. Quan TE, Cowper S, Wu SP, Bockenstedt LK, Bucala R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(4):598-606
45. Aiba S, Tagami H. Inverse correlation between CD34 expression and proline-4-hydroxylase immunoreactivity on spindle cells noted in hypertrophic scars and keloids. *J Cutan Pathol* 1997; 24(2):65-69
46. Hartlapp I, Abe R, Saeed RW, Peng T, Voelter W, Bucala R, Metz CN. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *FASEB J* 2001; 15(12):2215-2224

47. Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol* 1998; 160: 419–425
48. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Horgan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1994; 1:71–81.
49. Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 2001; 166(12):7556-7562
50. Yang L, Scott PG, Giffre J, Shankowsky HA, Gahary A, Tredget EE. Peripheral blood fibrocytes from burn patients. Identification and quantification of fibrocytes in adherent cells cultured from peripheral blood mononuclear cells. *Lab Invest* 2002; 82: 1183–1192.
51. Pilling D, Buckley CD, Salmon M, Gomer RH. Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P. *J Immunol* 2003; 171(10):5537-46
52. Chesney J, Bacher M, Bender A & Bucala R. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6307–6312
53. Balmelli C, Ruggli N, McCullough K, Summerfield A. Fibrocytes are potent stimulators of anti-virus cytotoxic T cells. *J Leukoc Biol* 2005, 77:923-933.

54. Pilling D, Tucker NM, Gomer RH. Aggregated IgG inhibits the differentiation of human fibrocytes. *J Leukoc Biol* 2006; 79:1242–1251.
55. Yang L, Scott PG, Dodd C, Medina A, Jiao H, Shankowsky HA, Ghahary A, Tredget E E. Identification of fibrocytes in post burn hypertrophic scar. *Wound Repair Regen* 2005;13:2215–2224.
56. He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells* 2007; 25:69–77.
57. Henrick KT, Keeton AG, Nana S, Kijek TG, Goldsmith AM, Sajjan US, Bentley JK, Lam VN, Moore BB, Schumacher RE, Hannickal VJ, Hershenson MB. Lung cells from neonates show a mesenchymal stem cell phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:1158–1164.
58. Hong KM, Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Strieter RM. Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor- β and peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J Biol Chem* 2007; 282 (31): 22910–22920
59. Choi YH, Burdick MD, Strieter RM. Human circulating fibrocytes have the capacity to differentiate osteoblasts and chondrocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42 (5): 662-671
60. Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* 2004, 114:438-446.

61. Shao D. D, Suresh R, Vakil V, Gomer R. H, Pilling D. Pivotal advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation. *J. Leukoc Biol* 2008; 83: 1323–1333.
62. Hong K. M, Burdick MD, Phillips RJ, Heber D, Strieter RM. Characterization of human fibrocytes as circulating adipocytes progenitors and the formation of human adipose tissue in SCID mice. *FASEB J.* 2005; 19, 2029 –2031.
63. Wang JF, Jiao H, Stewart TL, Shankowsky HA, Scott PG & Tredget EE. Fibrocytes from burn patients regulate the activities of fibroblasts. *Wound Repair Regen* 2007; 15: 113–121
64. Quan TE, Cowper SE, Bucala R. The role of circulating fibrocytes in fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 2006, 8:145-150.
65. Postlethwaite AE, Shigemitsu H, Kanangat S. Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2004, 16:733-738.
66. Sakai N, Furuichi K, Shinozaki Y, Yamauchi H, Toyama T, Kitajima S, Kumura T, Kokubo S, Kobayashi M, Takasawa K, Takeda SI, Yoshimura M, Kaneko S, Wada T. Fibrocytes are involved in the pathogenesis of human chronic kidney disease. *Hum Pathol.* 2010; 41:672-678
67. Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, Brenner DA. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol* 2006; 45: 429–438

68. Nihlberg K, Lar sen K, H ultgårdh-Nilsson A, M almström A, Bjermer L, Westergren-Thorsson G. Tissue fibrocytes in patients with mild asthma: a possible link to thickness of reticular basement membrane? *Respir Res* 2006, 7: 50.
69. Wang CH, Huang CD, Lin HC, Lee KY, Lin SM, Liu CY, Huang KH, Ko YS, Chung KF, Kuo HP. Increased circulating fibrocytes in asthma with chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 15:178:583-91
70. Moore BB, Murray L, Das A, Wilke CA, Herrygers AB, Toews GB. The role of CCL12 in the recruitment of fibrocytes and lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006, 35:175-181.
71. Mehrad B, Burdick MD, Zisman DA, Keane MP, Belperio JA, Strieter RM. Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 353:104–108.
72. Moeller A, Gilpin SE, Ask K, Cox G, Cook D, Gauldie J, Margetts PJ, Farkas L, Dobranowski J, Boylan C, O'Byrne PM, Strieter RM, Kolb M. Circulating fibrocytes are an indicator for poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 179:588–594.
73. Strieter RM, Gomperts BN, Keane MP. The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2007, 117:549-556.
74. David G. Armstrong, Edward B. Jude J. The Role of Matrix Metalloproteinases in Wound Healing *Am Podiatr Med Assoc* 92(1): 12-18, 2002

75. Bode W, Grams F, Reinemer P, Gomis-Rüth FX, Baumann U, McKay DB, Stöcker W. The metzincin-superfamily of zinc-peptidases. *Adv Exp Med Biol.* 1996;389:1-11
76. Sternlicht MD, Bergers G. 2000. Matrix metalloproteinases as emerging targets in anticancer therapy: status and prospects. *Emerging Ther. Targets* 4:609–33
77. Endo K, Takino T, Miyamori H, Kinsen H, Yoshizaki T, Furukawa M, Sato H. Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J Biol Chem* 2003; 278:40764–40770.
78. Cauwe B, Van den Steen P, Opdenakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2007; 42:113–185.
79. Egeblad, M. and Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161–174.
80. Rowe R.G, Weiss SJ. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol.* 2008; 18:560-574.
81. Lessner SM, Galis ZS. Matrix Metalloproteinases and Vascular Endothelium-Mononuclear Cell Close Encounters. *Trends Cardiovasc Med.* 2004 ; 14: 105-111

82. Van Li nt P , L ibert C . C hemokine an d c ytokine pr ocessing by m atrix metalloproteinases and its effect on l eukocyte migration and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 82: 1375–1381; 2007
83. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor c ells f rom t he bone m arrow ni che requires M MP-9 m ediated release of kit-ligand. *Cell* 2002; 109:625–637
84. Madri JA, Graesser D. Cell Migration in the Immune System: the Evolving Inter-Related Roles of Adhesion Molecules and Proteinases *Developmental Immunology*, 2000, Vol. 7(2-4), pp. 103-116
85. American T horacic S ociety: I diopathic pulmonary f ibrosis: d iagnosis and treatment. I nternational c onsensus s tatement. A merican T horacic S ociety (ATS) and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161:646-664.
86. Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Aziz N, Kaminski N , Zlotnik A . Gene expression pr ofiles distinguish i diopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, 173:188-198.
87. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becerril C, Yousem S, Herrera I, Ruiz V, Selman M, Kaminski N. Up-regulation and profibrotic role

- of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med* 2005, 2(9):e251.
88. Becerril C, Pardo A, Montaña M, Ramos C, Ramírez R, Selman M. Acidic fibroblast growth factor induces an antifibrogenic phenotype in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20(5):1020-1027
89. Peterkofsky B, Diegelmann R. Use of a mixture of proteinase free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochem* 1971; 10:988-994
90. Prager GW, Breuss JM, Steurer S, Mihaly J, Binder BR. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid pro-urokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells. *Blood* 2004; 103(3):955-962
91. Matter H, Schwab W. Affinity and selectivity of Matrix Metalloproteinase Inhibitors: A chemometrical study from the perspective of Ligands and Proteins. *J Med Chem* 1999; 42: 4506-4523
92. Pilling D, Vakil V, Gomer RH. Improved serum-free culture conditions for the differentiation of human and murine fibrocytes. *J Immunol Methods* 2009; 351:62-70
93. Phan SH. Fibroblast phenotypes in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, 29:S87-92.

94. Lama VN, Phan SH. The extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/progenitor cells and beyond. *Proc Am Thorac Soc* 2006, 3:373-376.
95. Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, Roedersheimer MT, van Rooijen N, S tenmark KR. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol* 2006, 168:659-669.
96. Bucala R. Circulating fibrocytes: cellular basis for NSF. *J Am Coll Radiol* 2008; 5(1):36-39
97. King TE, Schwarz MI, Brown K, Toozé JA, Colby TV, Waldron JA, Flint A, Thurlbeck W, Cherniack RM. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1025-1032.
98. Nicholson AG, Fulford LG, Colby TV, du Bois RM, Hansell DM, Wells AU. The relationship between individual histologic features and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:173-177.
99. Choi ES, Pierce EM, Jakubzick C, Carpenter KJ, Kunkel SL, Evanoff H, Martinez FJ, Flaherty KR, Moore BB, Toews GB, Colby TV, Kazerooni EA, Gross BH, Travis WD, Hogaboam CM. Focal interstitial CCL20 chemokine

receptor 7 (CCR7) ex pression in idiopathic i nterstitial pneum onia. J C lin Pathol 2006, 59:28-39.

100. Scheja A, Larsen K, Todorova L, Tufvesson E, Wildt M, Akesson A, Hansson L, Ellis S, Westergren Thorsson G. BAL fluid derived fibroblasts differ from biopsy derived fibroblasts in systemic sclerosis. Eur Respir J 2007; 29(3): 446-52.
101. Larsen K , Tufvesson E , M almström J , M örgelin M , Wildt M , Andersson A , Lindström A , M almström A , Löf dahl C G, M arko-Varga G , Bjermer L, W estergren-Thorsson G . Presence of ac tivated m obile fibroblasts in bronchoalveolar lavage from patients with mild asthma. Am J Respir Crit Care Med 2004, 170:1049-1056.
102. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, Pardo A. TIMP-1, -2, -3 and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing non degradative lung microenvironment? Am. J. Physiol. 279 (2000) L562–L574.
103. Oikonomidi S , K ostikas K , T silioni I , T anou K , G ourgoulianis K I, Kiropoulos T S. Matrix m etalloproteinases in r espiratory d iseases: from pathogenesis t o pot ential c linical implications. Curr Med Chem 2009; 16(10):1214-1228
104. Swiderski R E, D encoff J E, F loerchinger C S, S hapiro S D, Hunninghake GW. Differential expression of extracellular matrix remodeling

- genes in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1998; 152: 821-828
105. Ruiz V, Ordóñez RM, Berumen J, Ramírez R, Uhal B, Becerril C, Pardo A, Selman M. Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003; 285:L1026-36.
106. Yu Q, Stamenkovic. Cell surface localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000; 14:163–176
107. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:463–516
108. Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, Lollini L, Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M, Heller RA. Gene expression analysis reveals matrylisin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6292–6297
109. McGuire JK, Li Q, Parks WC. Matrylisin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. *Am J Pathol* 2003; 162(6):1831-1843
110. Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M. Release of an invasion promoter E-

- cadherin fragment by matrylisin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 2001; 114:111–118
111. Sternlicht M D, Bissell M J, Werb Z. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene* 2000; 19:1102–1113
112. Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 1997; 139:1861–1872
113. Bernard Burke. The role of matrix metalloproteinase 7 in innate immunity. *Immunobiology* 2004; 209: 51–56
114. Busiek DF, Baragi V, Nehring LC, Parks WC, Welgus HG. Matrylisin expression by human mononuclear phagocytes and its regulation by cytokines and hormones. *J Immunol* 1995; 154: 6484-6491
115. Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen YT, Ding Y, Sutinen M, Visser H, W. M. van Hinsbergh V, Helaakoski T, Kainulainen T, Rönkä H, Tschesche H, and Salo T. Matrix Metalloproteinase-8 Is Expressed in Rheumatoid Synovial Fibroblasts and Endothelial Cells: Regulation by tumor necrosis factor- α and doxycycline. *J Biol Chem* 1997; 272 (50): 31504–31509
116. Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, Salo T and Sorsa T. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult

- periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 224–232
117. Kostamo K, Sorsa T, Leino M, Tervahartiala T, Alenius H, Richardson M, Toskala E. In vivo relationship between collagenase-2 and interleukin-8 but not tumor necrosis factor- α in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Allergy* 2005; 60: 1275–1279
118. Van Lint P, Libert C. Matrix metalloproteinase-8: Cleavage can be decisive. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17(4):217-223
119. Prikk K, Maisi P, Pirila E, Sepper R, Salo T, Wahlgren J and Sorsa T. In vivo collagenase-2 (MMP-8) expression by human bronchial epithelial cells and monocytes/macrophages in bronchiectasis. *J Pathol* 2001; 194: 232–238
120. López-Otín C, Palavalli LH, Samuels Y. Protective roles of matrix metalloproteinases: From mouse models to human cancer. *Cell Cycle* 2009; 8:3657-3662.
121. Henry MT, McMahon K, Mackarel AJ, Prikk K, Sorsa T, Maisi P, Sepper R, Fitzgerald MX, and O'Connor CM. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in sarcoidosis and IPF. *Eur Respir J* 20: 1220–1227, 2002.